PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO – PPGAN
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO – UNIRIO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Luana Sarpa Reis

INFLUÊNCIA DO ARMAZENAMENTO NA EXTRAÇÃO SEQUENCIAL DE MICRONUTRIENTES E ELEMENTOS TRAÇO EM FARINHA DE RESÍDUO DE FRUTAS E HORTALIÇAS

Rio de Janeiro/RJ

2013

Luana Sarpa Reis

INFLUÊNCIA DO ARMAZENAMENTO NA EXTRAÇÃO SEQUENCIAL DE MICRONUTRIENTES E ELEMENTOS TRAÇO EM FARINHA DE RESÍDUO DE FRUTAS E HORTALIÇAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como requisito para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

Orientadora: Profa. Dra. Édira Castello Branco de Andrade Gonçalves

Rio de janeiro/ RJ

2013

Reis, Luana Sarpa.
R375 Influência do armazenamento na extração sequencial de micronutrientes e elementos traço em farinha de resíduo de frutas e hortaliças / Luana Sarpa Reis, 2013.
70 f. : 30 cm

Orientadora: Édira Castello Branco de Andrade Gonçalves.
Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

1. Elementos traço - Nutrição. 2. Micronutrientes. 3. Especiação química. 4. Extração sequencial. 5. Farinha de resíduo de frutas e hortaliças. I. Gonçalves, Édira Castello Branco de Andrade.
II. Universidade Federal do Estado do Rio Janeiro. Centro de Ciências Biológicas e de Saúde. Curso de Mestrado em Alimentos e Nutrição.
III. Título.

Luana Sarpa Reis

INFLUÊNCIA DO ARMAZENAMENTO NA EXTRAÇÃO SEQUENCIAL DE MICRONUTRIENTES E ELEMENTOS TRAÇO EM FARINHA DE RESÍDUO DE FRUTAS E HORTALIÇAS

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição
da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovado em _22_/_08/_2013__

Profa. Dra. Édira Castello Branco de Andrade Gonçalves
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO

Prof. Dr. Anderson Junger Teodoro
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO - PPGAN

Profa. Dra. Iracema Takase
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

Dedico este trabalho aos meus pais, Marlene e Gilberto, por todo apoio, amor, carinho, compreensão e pelo investimento na minha educação.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade, força, perseverança e fé em todos os momentos.

Aos meus pais, Marlene e Gilberto.

À minha família e amigos.

Ao meu namorado Ronie, por toda ajuda, apoio, paciência e companheirismo.

À Profa. Dra. Édira, pela oportunidade, orientação e ensinamentos proporcionados.

Aos membros da banca: Prof. Dr. Anderson Teodoro, Profa. Dra. Iracema Takase e aos suplentes: Profa. Dra. Mariana Simões Larraz Ferreira e Profa. Dra. Paula de Miranda Costa Maciel.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição (PPGAN), sempre solícitos para qualquer eventualidade.

À UFRJ e à professora Iracema pela oportunidade de realizar as análises.

À PUC, pelas primeiras análises realizadas.

Ao Douglas e Rodrigo, pela ajuda e amizade.

Às amigas do mestrado: Dayane, Natália, Patrícia, Roberta e Thaísa, pela troca de ideias, pelos momentos de alegria, conforto, companheirismo e pela amizade construída.

Aos amigos da UNIRIO: Alex, Camila, Joel e Monica.

Aos técnicos Ana, Jeane e Fernando, por estarem a disposição sempre quando foi preciso.

À UNIRIO e ao Programa REUNI pelo apoio financeiro.

RESUMO

Cascas, talos, bagaços e sementes são geralmente removidos durante o processamento, principalmente nas etapas de descascamento e prensagem, resultando em perda nutricional considerável. A extração sequencial consiste no uso de uma série de extratores com naturezas químicas distintas que são aplicados de forma progressiva. São poucos os estudos relacionados à especiação química nos alimentos. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da extração sequencial de Cu, Fe, Mn, Mg e Zn em farinha de resíduo de frutas e hortaliças (FFH) durante o armazenamento por até 60 dias. A FFH foi obtida de dois lotes de resíduo gerado na produção de bebida isotônica. O teor total do metais foi determinado por espectrometria de absorção atômica em chama após calcinação das amostras em mufla a 550 ^{o}C. A extração sequencial foi realizada com aplicação dos seguintes extratores: Cloreto de cálcio 1M; Ácido acético 0,1M / Acetato de amônio 5% (pH 5,0); Ácido acético 0,5M; Ácido clorídrico 0,5M, nos tempos de armazenamento 0, 30 e 60 dias. O armazenamento por até 60 dias não influenciou no teor total dos metais analisados. No entanto, uma diferença significativa foi encontrada entre os lotes, mas do ponto de vista nutricional, tal diferença é irrelevante. Após a extração sequencial, a recuperação média dos metais analisados foi de 93%. Foi observada diferença no perfil de extração e nos teores extraídos entre os lotes para Cu, Fe Mn; Zn e Mg, mesmo apresentando diferença nos teores extraídos, mantiveram o perfil de extração entre os lotes. Foi avaliada também a estrutura química da FFH e dos resíduos após extração em cada etapa da extração sequencial nos tempos 0 e 60 dias Após o armazenamento por 60 dias, foi observada uma mudança da estrutura química da amostra, que influencia no perfil de extração da maioria dos metais analisados. É possível afirmar que, no mínimo, cinco espécies químicas distintas de cada metal analisado se encontram na amostra, referentes às frações extraídas e a residual, influenciando na biodisponibilidade dos mesmos e em todos os processos metabólicos inerentes da própria amostra.

Palavras-chave: especiação química; micronutrientes; farinha de resíduo de frutas e hortaliças.

ABSTRACT

Peels, stalks, bagasse and seeds are generally removed during processing, particularly in the stages of stripping and pressing, resulting in significant nutritional loss. Sequential extraction consists in the use of a number of extractors with different chemical properties that are progressively applied in a sample. Few studies are described in the literature related to chemical speciation in food. The objective of this study was to evaluate the influence of sequential extraction of Cu, Fe, Mn, Mg and Zn in fruits and vegetables residue flour (FFH) during storage for up to 60 days. The FFH was obtained from two batches based on the residue generated in an isotonic drink production. The total metal content was determined by flame atomic absorption spectrometry after samples calcination at 550 °C. The sequential extraction was carried out with the following extractors: 1M calcium chloride, 0.1 M acetic acid / 5% ammonium acetate (pH 5.0), 0.5 M acetic acid, 0.5 hydrochloric acid on the storage times: 0, 30 and 60 days. Storage for up to 60 days did not affect the total content of the metals analyzed. However, a significant difference was found between batches, although in a nutritional point of view such difference, is irrelevant. After sequential extraction, the mean recovery of the metals analyzed was 93%. Differences were observed in the profile extraction and in the extracted contents between batches for Cu, Fe, Mn. Even presenting variation in the extracted contents, Zn and Mg kept the same profile extraction between batches. Chemical structure of FFH and residue were also analyzed after each step of the sequential extraction at 0 and 60 days. After 60 days, it was observed modifications in the chemical structure of the sample, which influence in the profile extraction of the most metals analyzed. It is possible to affirm that at least five distinct chemical species of each metal were analyzed in the sample. It concerns the extracted and the residual fractions. These chemical species can influence on the bioavailability and on metabolic processes inherent in the sample itself.

Keywords: chemical speciation; micronutrients; fruits and vegetables residue flour

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Evolução do número de artigos publicados sobre especiação química em alimentos de 1995 a 2011._____ 30

Figura 2 - Fluxograma de produção da FFH._____ 35

Figura 3 – Perfil de extração do Cobre (%) nos lotes 1 e 2 da FFH durante armazenamento por até 60 dias (N = 3)._____ 48

Figura 4 - Perfil de extração do Ferro (%) nos lotes 1 e 2 da FFH durante armazenamento por até 60 dias (N = 3)._____ 49

Figura 5 - Perfil de extração do Manganês (%) nos lotes 1 e 2 da FFH durante armazenamento por até 60 dias (N = 3)._____ 50

Figura 6 - Perfil de extração do Zinco (%) nos lotes 1 e 2 da FFH durante armazenamento por até 60 dias (N = 3)._____ 51

Figura 7 - Perfil de extração do Magnésio (%) nos lotes 1 e 2 da FFH durante armazenamento por até 60 dias (N = 3)._____ 52

Figura 8 – Microscopia da FFH entre os tempos de armazenamento 0 e 60 dias._____57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição centesimal da farinha de resíduo de frutas e hortaliças (FFH).____ 19

Tabela 2 - Extratores utilizados para matrizes sólidas e suas respectivas frações._____26

Tabela 3 - Condições operacionais para análise de metais com Espectrômetro de Absorção Atômica em Chama._____ 39

Tabela 4 - Teor total (mg%) de cobre, ferro, manganês, magnésio e zinco de FFH armazenada por até 60 dias (N = 3)._____ 41

Tabela 5 - Avaliação da influência da agitação no processo de extração sequencial na FFH lote 1 na análise de cobre, ferro, manganês, magnésio e zinco (N=3)._____ 43

Tabela 6 - Avaliação da influência da agitação no processo de extração sequencial de cobre, ferro, manganês, magnésio e zinco na FFH lote 1 (N=3)._____ 44

Tabela 7 - Extração sequencial de cobre, ferro, manganês, magnésio e zinco na FFH lote 1 armazenada por até 60 dias. (N = 3)._____ 45

Tabela 8 - Extração sequencial de cobre, ferro, manganês, magnésio e zinco na FFH lote 2 armazenada por até 60 dias (N = 3)._____ 46

Tabela 9 - Recuperação dos metais Cu, Fe, Mn, Mg e Zn após extração sequencial de dois lotes de FFH armazenados por até 60 dias (N = 3)._____ 54

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CVAAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Vapor Frio
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
ETAAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica
FAAS	Espectrometria de Absorção Atômica em Chama
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FFH	Farinha de Resíduo de Frutas e Hortaliças
GFAAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite
HGAAS	Espectrometria de Absorção Atômica com geração de Hidretos
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
ICP-MS	Espectrometria de Massas com Plasma Induzido
ICP-OES	Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Acoplado Indutivamente
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
OMS	Organização Mundial da Saúde
PPGAN	Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição
PUC - RIO	Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UNIRIO	Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....13
2. OBJETIVOS.....15
2.1. OBJETIVO GERAL.....15
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....15
3. REVISÃO DE LITERATURA.....16
3.1. DISPONIBILIDADE E CONSUMO DE FRUTAS E HORTALIÇAS.....16
3.2. O DESPERDÍCIO DE FRUTAS E HORTALIÇAS E O APROVEITAMENTO INTEGRAL E DE RESÍDUOS.....17
3.3. FARINHA DE RESÍDUO DE FRUTAS E HORTALIÇAS (FFH).....18
3.4. OS MINERAIS E SUA BIODISPONIBILIDADE.....20
3.5. ESPECIAÇÃO QUÍMICA.....23
3.5.1. A especiação química e os procedimentos de extração.....23
3.5.2. Especiação química por extração sequencial.....24
3.5.2.1. Fração trocável.....27
3.5.2.2. Fração ligada a carbonatos/ Solúvel em ácido/ Carbonácea.....27
3.5.2.3. Fração Redutível/ Oxídica.....28
3.5.2.4. Fração Oxidável/ Orgânica e Sulfídrica.....28
3.5.2.5. Fração Residual.....29
3.5.3. Extração sequencial em alimentos.....29
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....33
4.1. PREPARO DA FARINHA DE RESÍDUO DE FRUTAS E HORTALIÇAS (FFH).....33
4.1.1. Amostras de frutas e hortaliças.....33
4.1.2. Preparo da FFH.....33
4.2. DETERMINAÇÃO DOS METAIS.....36
4.2.1. Garantia de qualidade analítica.....36
4.2.2. Determinação do teor total dos metais.....36
4.2.3. Determinação dos metais cobre, manganês e zinco por processo de extração sequencial.....37
4.2.4. Determinação dos metais ferro e magnésio por processo de extração sequencial.....38
4.2.5. Influência no processo de extração sequencial de cobre, ferro, manganês, magnésio e zinco com a agitação.....38

4.2.6. Influência do armazenamento.....38
4.3. EPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA EM CHAMA.....39
4.4. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....39
4.5. TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....41
5.1. DETERMINAÇÃO DO TEOR TOTAL DOS METAIS.....41
5.2. AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA AGITAÇÃO NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO SEQUENCIAL.....42
5.3. INFLUÊNCIA DO ARMAZENAMENTO NA EXTRAÇÃO SEQUENCIAL DOS METAIS Cu, Fe, Mn, Mg e Zn NA FFH.....44
5.3.1. Extração sequencial.....44
5.3.2. Perfil de extração após armazenamento por até 60 dias.....47
5.3.3. Recuperação dos metais em estudo após extração sequencial.....52
5.3.4. Influência do armazenamento na estrutura química da FFH.....55
6. CONCLUSÃO.....58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....59

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a indústria alimentícia tem sido marcada pelo grande volume de resíduos produzidos. Cerca de um terço dos alimentos processados no mundo todo destinados ao consumo humano é perdido ou desperdiçado, representando cerca de 1,3 bilhões de toneladas por ano. Na América Latina, um dos maiores índices de perda está relacionado às frutas e hortaliças, onde mais de 40% destas ocorrem na pós-colheita e no processamento (FAO, 2011; GUSTAVSSON et al., 2011).

No Brasil, o crescimento das atividades de processamento dos alimentos tem acontecido de forma intensa para atender a demanda do mercado por alimentos processados (MAPA, 2006; SANTOS et al., 2008). Em relação às frutas, por exemplo, o principal segmento é o processamento na forma de sucos, polpas e néctares à base de frutas, que, conjuntamente, representam hoje mais de 1 bilhão de litros por ano (MAPA, 2006). Esse intenso processamento acarreta na produção de elevada quantidade de resíduos que podem apresentar problemas de disposição final e potencial poluente, além de representarem, muitas vezes, perdas de nutrientes de alto valor (PINTO et al., 2005; SANTOS, 2011).

Atualmente, diversas alternativas de aproveitamento dos resíduos alimentícios têm sido propostas, dentre elas, o desenvolvimento de produtos panificáveis, geleias, doces entre outros que, em geral, apresentam valor nutricional relevante e podem suprir deficiências na dieta da população (PEREIRA et al., 2003; PEREZ; GERMANI, 2007). No entanto, a composição dos resíduos do processamento de alimentos é variada e depende da natureza da matéria-prima. Os resíduos vegetais, por exemplo, apresentam quantidades elevadas de nutrientes, principalmente de minerais (SPUNZAR et al., 1999).

Frutas e hortaliças são importantes fontes de minerais, principalmente de elementos-traço para a dieta humana. Os minerais dependem não só do seu teor total, mas também das suas formas físico-químicas individuais, que podem ou não ser absorvidas e utilizadas pelo organismo, caracterizando a biodisponibilidade destes (RUZIK, 2012; SPUNZAR et al., 1999). Sendo assim, a informação em relação à identidade e natureza das espécies químicas de um determinado elemento se faz necessária, já que a determinação do teor total do metal ingerido não possibilita traçar um perfil da eficiência da sua absorção (BARRA et al., 2000; SANZ-MEDEL, 1998; SPUNZAR et al., 1999).

A especiação química é uma ferramenta que possibilita conhecer a concentração das diferentes formas químicas de um mesmo elemento em uma matriz, sendo que estas espécies,

juntas, constituem a concentração total do elemento. Nesta técnica são utilizados procedimentos de extração simples ou sequencial, sendo este último mais detalhado, permitindo que uma série de reagentes (extratores) com propriedades químicas diferentes sejam aplicados em uma amostra, de modo que os elementos possam ser lixiviados por variados mecanismos, proporcionando a separação dos conteúdos totais dos elementos em frações com diferentes disponibilidades (ABOLLINO et al., 2011; BACON; DAVIDSON, 2008; RAO; SAHUQUILLO; LOPEZ SANCHEZ, 2008).

A análise por extração sequencial em alimentos deve apresentar certos cuidados, pois cada gênero alimentício possui uma matriz química diferente. Poucos são os estudos relacionados à especiação química nos alimentos e por isso é de grande interesse expandir estas análises para esta área, uma vez que a especiação de metais já é amplamente reconhecida em análises biológicas e ambientais (DAS et al., 1995). Desta forma, o presente estudo teve como objetivo determinar a concentração total dos metais cobre, ferro, manganês, magnésio e zinco, bem como suas diferentes espécies químicas através da técnica de extração sequencial em uma farinha de resíduo de frutas e hortaliças (FFH). Foram avaliados também a influência no processo de extração sequencial das espécies químicas com e sem o método de agitação e a influência do armazenamento de até 60 dias destas espécies presentes na FFH.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliação da influência da extração sequencial de Cu, Fe, Mn, Mg e Zn durante o armazenamento por até 60 dias de farinha de resíduo de frutas e hortaliças (FFH).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinação do teor total de Cu, Fe, Mn, Mg e Zn na FFH;

- Avaliação da influência no processo de extração sequencial das espécies químicas de Cu, Fe, Mn, Mg e Zn na FFH com ou sem a agitação;

- Determinação das espécies químicas dos metais Cu, Fe, Mn, Mg e Zn nos extratos obtidos após extração sequencial da FFH;

- Influência do armazenamento por até 60 dias na estrutura química da FFH com e sem processo de extração sequencial.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. DISPONIBILIDADE E CONSUMO DE FRUTAS E HORTALIÇAS

O Brasil é um país de grande extensão, dotado de ampla variedade de climas e solos, o que possibilita o cultivo de diversas espécies de frutas, sendo o terceiro produtor mundial depois da China e Índia (JÚNIOR; SIDONIO; MORAES, 2010). A fruticultura responde por mais de 35% do valor da produção agrícola e muitas já conquistaram o mercado externo como a laranja, banana, melão, uva, manga, dentre outras (ALVES; MACHADO; QUEIROGA, 2011; JÚNIOR; SIDONIO; MORAES, 2010). As frutas brasileiras apresentam grande variedade de formas, cores e sabores e podem ser consumidas *in natura* ou na forma de sucos, doces e demais preparações industrializadas (ALVES; MACHADO; QUEIROGA, 2011; JÚNIOR; SIDONIO; MORAES, 2010; MARTINS; FARIAS, 2002). O consumo de frutas no Brasil é avaliado em 24,5 kilos/per capita/ano (IBGE, 2004).

O mercado de hortaliças é fortemente influenciado pela preferência dos consumidores e vem se estruturando em diversos segmentos: os tradicionais produtos *in natura*, congelados, desidratados, liofilizados e hortaliças minimamente processadas. O consumo de hortaliças no Brasil foi estimado em cerca de 40 kilos/per capita/ano, muito inferior ao verificado nos países desenvolvidos. Entre os fatores determinantes dessa condição incluem-se os próprios hábitos socioculturais da população (VILELA; HENZ, 2000).

A ingestão de frutas e hortaliças é indicada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como prioridade nas políticas nutricionais, alimentares e agrícolas. É recomendado o consumo mínimo de 400 gramas de frutas e hortaliças por dia, o que equivale a cinco porções desses alimentos (WHO, 2002). O conhecimento da frequência do consumo de frutas e hortaliças na população, assim como de seus determinantes, é necessário para direcionar estratégias nacionais e locais de incentivo ao consumo das mesmas (JAIME et al., 2009).

Além do incentivo ao consumo destes grupos de alimentos, também se estimula o controle de perdas e desperdícios. Segundo a Food and Agriculture Organization (FAO, 2011), 1,3 bilhões de toneladas de alimentos são desperdiçados por ano, mundialmente. Frutas e hortaliças representam 0,5 bilhões de toneladas deste total, gerando uma perda nutricional significativa e produção de resíduos, causando impacto ao meio ambiente (GUSTAVSSON et al., 2011).

3.2. O DESPERDÍCIO DE FRUTAS E HORTALIÇAS E O APROVEITAMENTO INTEGRAL E DE RESÍDUOS

O desperdício de alimentos ocorre em todas as etapas da cadeia produtiva. Ao se tratar de frutas e hortaliças, alimentos considerados sensíveis, o tempo de armazenamento é limitado, resultando em perdas quantitativas e qualitativas. Do plantio até aos domicílios ou Unidades de Alimentação e Nutrição as perdas variam entre 15 a 35% em média, as quais podem ser ocasionadas na lavoura, excesso ou falta de chuva, ao ataque de pragas, colheita descuidada, transporte e manuseio inadequado, resultando em injúrias e não atendendo aos padrões de qualidade do mercado (CRISOSTO et al., 1997; MARTINS; FARIAS, 2007; IBGE, 2005). Além dessas perdas, há também aquelas ocasionadas pelo próprio consumidor e pelas indústrias de alimentos (SONESSON et al., 2010).

O aproveitamento integral dos alimentos é a utilização de um determinado alimento na sua totalidade (CARVALHO, 2008; GONDIM et al, 2005). A população, de uma forma geral, não tem acesso às informações claras, desconhecem a forma adequada de preparo, não aproveitam o máximo dos alimentos, gerando um desperdício no consumo doméstico em torno de 20% (GONDIM et al., 2005; IBGE, 2005). A utilização dos alimentos de forma integral minimizaria esse desperdício, porém, a falta de hábito em se utilizar partes "não convencionais" dos alimentos, justamente devido à desinformação acerca dos princípios nutritivos presentes nas mesmas, gera o desperdício de toneladas de recursos alimentares (CARVALHO, 2008).

Os resíduos que são gerados pelos setores agrícolas e indústrias de processamento de frutas e hortaliças, quando não aproveitados, podem se tornar fontes de poluição, já que os grandes volumes produzidos são eliminados em locais inadequados (MARTINS; FARIAS, 2007; UCHOA et al., 2008). Estes resíduos são, na sua maioria, constituídos por cascas, caroços, sementes, ramas, bagaços etc, que embora largamente desperdiçados, são importantes fontes de nutrientes (AYALA-ZAVALA et al., 2010; SCHIEBER et al., 2001; SOUSA et al., 2011; SUN-WATERHOUSE et al., 2011), e poderiam ser aproveitados na produção de diferentes produtos (CAVALCANTI et al., 2010; GONDIM et al., 2005).

3.3. FARINHA DE RESÍDUO DE FRUTAS E HORTALIÇAS (FFH)

Pós alimentícios obtidos a partir de resíduos de frutas e hortaliças processados estão sendo cada vez mais utilizados pelas indústrias de alimentos, atuando como uma alternativa para o emprego destes novos ingredientes, enriquecendo o valor nutricional de alimentos tradicionais e alcançando melhor qualidade na alimentação (PEREIRA, et al., 2003; UCHOA et al., 2008). O uso de resíduos na fabricação de farinhas, além de reduzir significativamente o impacto ao meio ambiente, diminuem os custos do processamento e de certas operações (embalagem, transporte, armazenamento e conservação - prolongando sua vida de prateleira) e também agregam valor nutricional ao produto (ALVES; MACHADO; QUEIROGA, 2011; COSTA et al., 2007; ZANATTA; SCHLABITZ; ETHUR, 2010).

Destas farinhas ou pós alimentícios são obtidos pães, biscoitos, massas, dentre outros produtos de boa aceitação, consumidos por todas as faixas etárias (MAURO; SILVA; FREITAS, 2010). Alves, Machado e Queiroga (2011) desenvolveram produtos de panificação com farinha de caju elaborada a partir do pedúnculo do fruto, garantindo excelente aceitabilidade pelos provadores; Garmus et al. (2009) elaboraram biscoitos com diferentes concentrações de farinha de casca de batata, verificando um elevado teor de fibras no produto. Mauro, Silva e Freitas (2010) prepararam *cookies* com farinha de talo de couve e farinha de talo de espinafre, ambos ricos em fibra e com densidade calórica inferior aos presentes no mercado. Assim como exibem uma vasta aplicação tecnológica, estas farinhas também apresentam variadas avaliações físico-químicas. A composição centesimal é vista como fator fundamental devido ao alto teor de carboidratos, fibras, vitaminas e minerais que possuem. Aliar o aproveitamento dos resíduos de frutas e hortaliças com a criação de novas preparações gera uma alternativa viável para a formulação de produtos com características funcionais, como farinhas (CAVALCANTI, et al., 2010; FERREIRA et al., 2013).

Através do projeto "Desenvolvimento de produtos panificáveis à base de cascas, sementes e farinhas de frutas visando a suplementação de fibras e dos metais cobre (Cu), ferro (Fe) e zinco (Zn)", aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (CEP-UNIRIO), foi elaborada uma bebida isotônica a partir do processamento integral de frutas e hortaliças (Martins et al., 2011), que resultou em elevada quantidade de resíduos vegetais. Desta forma, por meio do projeto "Aplicação funcional e tecnológica de farinha de resíduos de frutas e hortaliças (FFH)", do Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição (PPGAN) da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), esses resíduos gerados na bebida isotônica foram transformados em

farinha (FFH), para aplicação no desenvolvimento de produtos funcionais como biscoitos, chocolates e barras de cereais (FERREIRA et al., 2013).

Em trabalho já desenvolvido com a FFH (FERREIRA et al., 2013), foi determinada a composição centesimal da mesma através de análises físico-químicas (AOAC, 2000), conforme mostra a tabela 1.

Tabela 1 - Composição centesimal da farinha de resíduo de frutas e hortaliças (FFH).

Determinação (%)	FFH
Umidade	5,88 ± 0,49
Lipídios	5,09 ± 0,50
Proteína	9,52 ± 1,68
Fibra bruta	21,52 ± 1,61
Resíduo Mineral Fixo	4,93 ± 0,41
Carboidrato (Fração NIFEXT)	53,06

Fonte: FERREIRA et al. (2013).

Na FFH observa-se um elevado teor de proteína (9,52%) quando comparado ao valor encontrado por Costa et al. (2007) em pós alimentícios obtidos da casca de abacaxi (3,27%) e do bagaço de abacaxi (3,18%). O teor de proteína da FFH também foi superior aos teores de proteínas em diversas cascas de frutas determinados por Gondim et al. (2005). Além disso, apresenta valores semelhantes ao da farinha de trigo (Hemery et al., 2007).

O teor de fibra bruta também foi elevado (21,52%). De acordo com a Portaria n º 27, de 1998, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), um produto com 6% de fibras é classificado como alto teor de fibras. Sendo assim, a FFH pode ser considerada um produto com alto teor de fibras.

Em relação ao teor de carboidratos (53,06%), o valor foi superior ao determinado na casca de tangerina (35%) por Gondim et al. (2005) e nas farinhas de talo de couve (43,14%) e de talo de espinafre (27,14%) por Mauro, Silva e Freitas (2010). O alto teor de fibras e carboidratos se deve aos principais componentes da FFH: as cascas e sementes, que são ricas em amido, celulose, hemicelulose, lignina, pectina e outros biopolímeros (Ferreira et al., 2013).

De forma similar, estes mesmos componentes foram os responsáveis pelo alto teor de Resíduo Mineral Fixo (4,93%). Comparando com a farinha de resíduos de frutas regionais (1,66%) de Cavalcanti et al. (2010) e às farinhas de bagaço de caju (1,78%), bagaço de goiaba (2,14%) e casca de maracujá (2,52%) apresentadas por Uchoa et al. (2008), o teor de Resíduo

Mineral Fixo na FFH encontra-se entre duas a três vezes maior. Nas últimas décadas tornou-se evidente que a segurança alimentar e qualidade nutricional dos alimentos também dependem da forma química na qual um elemento está presente nos mesmos (EBDON et al., 2001). Por isso, torna-se necessário o conhecimento das espécies químicas nos alimentos.

3.4. OS MINERAIS E SUA BIODISPONIBILIDADE

Os minerais representam uma grande classe de micronutrientes encontrados no corpo e nos alimentos (ANDERSON, 2005), que são divididos em dois grupos: macrominerais e elementos traço. O primeiro grupo é constituído por: K, Na, Ca, Mg, Cl, P, S e C, principais formadores de sais. Entre os elementos traço, que geralmente estão presentes em quantidades inferiores a 50 partes por milhão (ppm), podem ser encontrados elementos nutricionalmente essenciais (Fe, Cu, I, Co, Mn, Zn, Cr, Ni, Si, F, Mo e SE), elementos não nutritivos e não tóxicos (Al, B, Sn) e elementos não nutritivos e tóxicos (Hg, Pb, As, Cd and Sb) (DEMAN, 1999).

O valor nutricional de um alimento contendo um dado mineral depende não só do seu teor total, mas também da sua biodisponibilidade para os seres humanos (RUZIK, 2012). A biodisponibilidade é o termo utilizado para indicar a proporção dos elementos que são absorvidos e utilizados pelo organismo (SANTOS et al., 2004). Reis (2003) explica que os processos de absorção dos micronutrientes são complexos e incluem várias funções, como osmose, filtração, difusão, participação ativa e seletiva das células das vilosidades intestinais. Existem diversas interações químicas entre os minerais que incluem absorção e formação de complexos, com influência na biodisponibilidade (COZZOLINO, 1997). Podem-se citar como exemplo, agentes sinergistas que intensificam a mobilidade do elemento e facilitam sua absorção e os agentes antagonistas, que limitam esta mobilidade através da formação de compostos pouco solúveis e da competição por receptores envolvidos nos processos de absorção, transporte e armazenamento (SILVA, 1985).

O cobre é um elemento traço essencial que está envolvido em uma série de reações de oxi-redução, e, em solução, ocorre sob dois estados de oxidação, Cu^{+1} e Cu^{+2}. É um elemento essencial para o metabolismo do ferro e para o transporte de oxigênio e age na formação da elastina e do colágeno ósseo. A recomendação da ingestão diária deste elemento para um homem adulto é de 0,8 a 0,9 mg/dia. A absorção do cobre sob a forma de compostos solúveis ocorre em nível intestinal. Compostos muito solúveis, como nitratos e sulfatos de cobre são prontamente absorvidos; já compostos como óxido de cobre, pouco solúvel, tem sua absorção

diminuída. Certos aminoácidos e proteínas atuam como agentes sinergistas na absorção deste elemento. O mecanismo de transporte ativo é predominante quando a ingestão do cobre é baixa; já com o aumento deste na dieta, sua absorção ocorre por difusão passiva (ANDERSON, 2005; BARAN, 1995; SHILS; OLSON; SHIKE, 1994).

O zinco está presente em diversas metaloenzimas e várias enzimas são ativadas pelo íon deste elemento. Atua na estabilidade dos constituintes da estrutura celular e das membranas. O zinco participa das reações de síntese e degradação dos carboidratos, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. Sua necessidade diária recomendada é de 11 mg/dia para um homem adulto. É absorvido ao longo do intestino delgado por transporte ativo. Sua disponibilidade será influenciada pela presença de substâncias que alterem a solubilidade e disponibilidade nos sítios de absorção. Em solução aquosa, a eficiência de sua absorção é na faixa de 60 – 70%; em dietas sólidas esta mobilidade diminui, interferindo no processo de absorção (ANDERSON, 2005; BARAN, 1995; SHILS; OLSON; SHIKE, 1994).

O antagonismo entre cobre e zinco tem sido considerado um excelente exemplo de interações biológicas competitivas entre metais com propriedades físicas e químicas semelhantes (BREMNER; BEATTIE, 1995). O fornecimento de cobre em excesso pode afetar o metabolismo hepático de zinco em algumas espécies, mas não há nenhuma evidência consistente de que a absorção de zinco é seriamente afetada (BLALOCK; DUNN; COUSINS, 1988; HALL; YOUNG; BREMNER, 1979). Cobre e zinco ocupam uma parte semelhante da tabela periódica. Os íons Zn^{+2} e Cu^{+1} são isoeletrônicos e possuem raio iônico similar. Ambos os metais podem se quelar com 0-, S-, ou N-, mas nem sempre com a mesma disposição estereoquímica. No entanto, ao contrário do zinco, que ocorre em apenas um estado de valência, cobre pode ocorrer em dois, como Cu^{+1} e Cu^{+2}, podendo ainda ocorrer em Cu^{+3} (BREMNER; BEATTIE, 1995).

Assim como o cobre, o ferro é um elemento que participa das reações de oxi-redução. É altamente reativo, podendo interagir com o Oxigênio, formando compostos intermediários com o potencial de danificar membranas celulares e DNA. O ferro da dieta está presente na forma de ferro heme e não-heme. O ferro heme representa de 5 a 10% do ferro da dieta. A principal diferença entre eles está no processo de absorção: a absorção do ferro heme pode ser de até 25%, comparada com 5% do ferro não-heme. O ferro não-heme deve estar presente na forma solúvel para que seja absorvido. Com esse propósito, é ionizado pelo suco gástrico, reduzido ao estado ferroso e quelado com substâncias solubilizantes, tais como o ácido ascórbico. O ferro pode ocorrer em sete estados de oxidação: 0, I, II, III, IV, V e VI, sendo os mais comuns Fe^{+2} e Fe^{+3}. O íon ferroso é significativamente mais solúvel em pH 7,0 e sendo

assim, no duodeno, fica disponível para a absorção (ANDERSON, 2005; COUTINHO, 1981; COZZOLINO, 1997; DUTRA DE OLIVEIRA; MARCHINI, 1998; LEHNINGER; NELSON; COX, 1998). A absorção desse mineral depende de vários fatores como: os estoques corporais, conteúdo fornecido pela dieta, fonte alimentar, além de receber influência dos outros alimentos ingeridos na mesma refeição (ANDERSON, 2005; COZZOLINO, 1997; DUTRA DE OLIVEIRA; MARCHINI, 1998). A recomendação da ingestão diária para ferro é de 8 mg/dia para homens adultos e 18 mg/dia para mulheres adultas (ANDERSON, 2005).

A interação entre ferro e zinco pode ocorrer tanto com o aumento do ferro interferindo na biodisponibilidade de zinco como em sentido contrário (YADRICK; KENNEY; WINTERFELDT, 1989). Em um estudo realizado por Pedrosa e Cozzolino (2003), foi demonstrado que o aumento da concentração de ferro na dieta interferiu negativamente no aproveitamento do zinco. Por outro lado, o excesso de zinco obteve efeito na utilização do ferro (YADRICK; KENNEY; WINTERFELDT, 1989).

O manganês pode ocorrer em seis estados de oxidação: 0, II, III, IV, VI e VII. Nos sistemas biológicos é encontrado principalmente sob as formas II, III e IV, onde as espécies Mn^{+2} e Mn^{+4} são estáveis e o Mn^{+3} é instável. Acumulado nas mitocôndrias, o manganês atua como cofator de enzimas respiratórias. Por sua similaridade com o Mn^{+2}, o Mn^{+3} pode participar de reações que envolvam o Mn^{+2}, mas por sua abundância, o Mn^{+2} é preferencialmente utilizado pelo organismo. A ingestão diária recomendada é de 2 – 3 mg/dia. Sua absorção é feita ao longo do intestino delgado, com uma eficiência de 5% do ingerido e pode ocorrer tanto por mecanismo ativo ou difusão passiva (ANDERSON, 2005; BARAN, 1995; SHILS; OLSON; SHIKE, 1994). Um fator importante é a competição entre manganês e ferro, pois o manganês compete pelos mesmos sítios de absorção do ferro (ANDERSON, 2005; ASCHNER; VRANA; ZHENG, 1999).

O magnésio é um macromineral e o segundo maior cátion intracelular mais abundante no corpo. Cerca de metade do magnésio no plasma é livre, aproximadamente um terço está ligado à albumina e o restante está ligado a citrato, fosfato ou outros ânions. Participa de reações enzimáticas para estabilidade da estrutura do ATP, atua na síntese de ácidos graxos e proteínas e fosforilação da glicose e desempenha um papel na transmissão de atividade neuromuscular juntamente com o cálcio. O magnésio pode ocorrer nos estados de oxidação Mg^{+1} e Mg^{+2}. Sua recomendação de ingestão diária é de 400 mg/dia para um homem adulto. O magnésio pode ser absorvido ao longo de toda a extensão do intestino delgado, mas a maior parte da absorção ocorre no jejuno por difusão simples e difusão facilitada (ANDERSON, 2005; BARAN, 1995). Uma das interações mais importantes para o magnésio ocorre com o

cálcio. Acredita-se que esta interação não tenha uma significância maior para o ser humano. Entretanto, com a recomendação da suplementação de cálcio numa dieta limítrofe ou baixa em magnésio, este efeito poderá ser relevante e deve ser mais pesquisado (COUZY et al., 1993).

Os elementos químicos estão presentes nos alimentos em diversas formas químicas chamadas de espécies, podendo ser encontradas como complexos ou íons livres. Como os alimentos são matrizes complexas e muitas espécies minerais são transientes, o isolamento e a caracterização destas espécies nos alimentos são muito difíceis. Por isso, a compreensão sobre as formas químicas exatas dos minerais se faz necessária (FENNEMA; PARKIN; DAMODARAN, 2010).

3.5. ESPECIAÇÃO QUÍMICA

3.5.1. A especiação química e os procedimentos de extração

A especiação química, segundo Ure (1991) é definida como "o processo de identificação e quantificação das diferentes formas ou fases em que um elemento está presente em um material" ou como "a descrição das quantidades, tipos de espécies, formas ou fases presentes em um material". Estudos mais recentes definem a especiação química como a determinação da concentração das diferentes formas químicas de um mesmo elemento em uma matriz, sendo que estas espécies, juntas, constituem a concentração total do elemento. O objetivo fundamental da especiação química é identificar e quantificar as várias formas de um elemento alvo em uma amostra (BARRA et al., 2000; SANZ-MEDEL, 1998).

Ao longo dos últimos 20 anos, os estudos de especiação química vêm apresentando grande relevância, levando ao desenvolvimento de diversos métodos de análise utilizados nas áreas de saúde, controle de qualidade dos alimentos e meio ambiente. São muitos os estudos relacionados à deposição de metais nos solos e águas, que, sob formas químicas reativas, alteram o ecossistema e provocam efeitos adversos sobre a saúde, o que têm atraído a atenção da comunidade científica (GARCÍA-BARRERA et al., 2012; GLEYZES; TELLIER; ASTRUC, 2002; JAIN, 2004; YAO; GAO, 2007).

Procedimentos de extração simples e sequencial são amplamente utilizados para a investigação de solos, águas, sedimentos e, muito importante, mas pouco citado, os alimentos, fornecendo informações sobre a mobilidade e disponibilidade de metais e outros elementos.

Valores das concentrações totais dos metais mostram-se insuficientes para serem avaliados, sendo assim, extrações simples podem ser usadas para estimar a fração do elemento que é potencialmente móvel (BACON; DAVIDSON, 2008; GLEYZES; TELLIER; ASTRUC, 2002). Um único reagente de extração (normalmente um ligante, ácido ou sal diluído) é utilizado para tratar a amostra e a medição é feita sobre a quantidade de elementos que são liberados da matriz de interesse (RAO; SAHUQUILLO; LOPEZ SANCHEZ, 2008).

Na extração sequencial, uma visão mais detalhada sobre as propriedades e o comportamento dos elementos pode ser alcançada. Reagentes com propriedades químicas diferentes são aplicados, de modo que os elementos possam ser lixiviados por variados mecanismos, por exemplo, de acidificação ou de complexação (ABOLLINO, et al., 2011; RAO; SAHUQUILLO; LOPEZ SANCHEZ, 2008). Isso resulta em um processo que é mais demorado do que a extração simples, mas que proporciona a separação dos conteúdos totais dos elementos em frações com diferentes disponibilidades, pois enquanto a primeira fração é bastante instável e, portanto, facilmente disponível para absorção, a última fração do elemento é caracterizada pela sua mobilidade reduzida (ABOLLINO, et al., 2011; BACON; DAVIDSON, 2008; RAO; SAHUQUILLO; LOPEZ SANCHEZ, 2008).

São vários os fatores que interferem na disponibilidade dos minerais: a especiação, a ligação molecular, a matriz alimentar, fatores relacionados aos indivíduos ou até mesmo atenuadores de absorção e bioconversão. A mobilidade e disponibilidade dos metais dependem da reatividade e do comportamento das ligações dos elementos químicos com os componentes da matriz, tornando importante a determinação da exatidão e precisão de cada matriz do alimento separadamente (BACON; DAVIDSON, 2008; KHOUZAM et al., 2012; RAO; SAHUQUILLO; LOPEZ SANCHEZ, 2008).

3.5.2. Especiação química por extração sequencial

A extração sequencial consiste no uso de uma série de extratores com naturezas químicas distintas que serão aplicados de forma progressiva, como a água, um extrator fraco, até um ácido concentrado, um extrator forte. A maioria dos esquemas de extração sequencial incluem diferentes grupos de extratores: extratores com propriedades de troca iônica; extratores com propriedades de dissolução de carbonatos; extratores com propriedades de redução ácida; extratores que enfraquecem a ligação do metal com compostos orgânicos e sulfetos e extratores que promovem a dissolução dos silicatos e dos minerais (ANDRADE; TAKASE, 2005; RAO; SAHUQUILLO; LOPEZ SANCHEZ, 2008).

O crescimento do interesse pela extração sequencial pode ser justificado pelas obras clássicas de Tessier, Campbell e Bisson (1979). Eles usaram uma extração de cinco estágios, ou seja, cinco extratores para fracionar cádmio, cobalto, cobre, ferro, chumbo, níquel, manganês e zinco em sedimentos de rios contendo baixos níveis de elementos potencialmente tóxicos. Estes estágios eram: metais de troca (fração trocável); extratores ligados a: carbonatos (fração carbonável); a óxidos de ferro e manganês (fração redutível/oxídica); a compostos orgânicos e sulfetos (fração oxidável/orgânica e sulfídrica) e, por último, extratores residuais. Os extratores utilizados foram escolhidos com base na capacidade de remover substâncias específicas, no caso, em sedimentos (BACON; DAVIDSON, 2008; TESSIER; CAMPBELL; BISSON, 1979).

Existem ainda na literatura outros métodos de extração sequencial, cujo critério adotado é especifico para a matriz examinada, perfil envolvido, metais de interesse, etc. Dentre os procedimentos de extração sequencial, os mais utilizados são os de Kersten e Forstner (1986) e de Tessier, Campbell e Bisson (1979). Na tabela 2 são apresentados os tipos de extratores que podem ser utilizados para matrizes sólidas e suas respectivas frações.

Tabela 2 – Extratores utilizados para matrizes sólidas e suas respectivas frações.

Fração	Extrator	Referência
Trocável	$MgCl_2$	Tessier et al. (1979)
	NH_4Ac / $CaCl_2$	Kersten e Forstner (1986) / Hirner et al. (1990)
	KNO_3	Miller e McFee (1983) / Sposito et al. (1982)
	$Mg(NO_3)_2$	Shuman e Hargrove (1985)
Carbonácea	NaOAc e HAc	Tessier et al. (1979)
	NaAc e HAc	Kersten e Forstner (1986)
	EDTA	Miller e McFee (1983)
	HNO_3	Sposito et al. (1982)
Oxídica (óxidos de Fe e Mn)	$NH_2OH.HCl$ e HAc (Fe e Mn)	Tessier et al. (1979) / Shuman e Hargrove (1985)
	$NH_2OH.HCl$ e HNO_3 (Mn)	Kersten e Forstner (1986) / Miller e McFee (1983)
	Tampão de oxalato (Fe)	Kersten e Forstner (1986)
	$NaHCO_3$ e $N_2S_2O_4$ (Fe cristalino)	Miller e McFee (1983)
	$(NH_4)_2O_x$ (Fe)	Shuman e Hargrove (1985)
	Tampão de Oxalato e Ácido Ascóbico (Fe cristalino)	Shuman e Hargrove (1985)
Orgânica	H_2O_2 / HNO_3 / NH_4Ac	Tessier et al.(1979) / Kersten e Forstner (1986)
	$Na_4P_2O_7$	Miller e McFee (1983)
	NaOCl	Shuman e Hargrove (1985)
	EDTA	Sposito et al. (1982)
	C_6H_6/CH_3OH	Hirner et al. (1990)
Sulfídrica	H_2O_2 / HNO_3 / NH_4Ac	Tessier et al. (1979) / Kersten e Forstner (1986)
	HNO_3	Miller e McFee (1983) / Sposito et al. (1982)
Residual	HF e $HClO_4$	Tessier et al. (1979) / Kersten e Forstner (1986)
	HF / $HClO_4$ / HNO_3	Kersten e Forstner (1986)
	HNO_3 / H_2O_2	Miller e McFee (1983)
	HCl / HF / HNO_3	Schuman e Hargrove (1985)
Solúvel em água	H_2O	Miller e Mcfee (1983) / Hirner et al. (1990)
Solúvel em ácidos húmicos e flúvicos	C_6H_6 / CH_3OH / KOH	Hirner et al. (1990)
Matriz mineral facilmente solúvel	HCl	Hirner et al. (1990)
Matriz mineral pouco solúvel	HF	Hirner et al. (1990)
Orgânica insolúvel	HCl / $HClO_4$ / HNO_3	Hirner et al. (1990)
Sorvida	NaOH	Sposito et al. (1982)

Fonte: Adaptado de Das et al. (1995).

Para entender os mecanismos envolvidos entre os elementos químicos e os extratores, como por exemplo, a mobilidade e disponibilidade desses elementos, é necessário conhecer cada fase correspondente ao extrator da extração sequencial.

3.5.2.1. Fração trocável

Esta fração inclui metais fracamente adsorvidos, retidos na superfície sólida por interações eletrostáticas relativamente fracas, metais que podem ser liberados através de processos de troca iônica. Mudanças na composição iônica influenciam reações de adsorção-desorção, ou através da redução do pH, podendo causar a remobilização de metais a partir desta fração (AHNSTROM; PARKER, 2001; ARUNACHALAM et al., 1996; KRISHNAMURTI et al., 1995; NARWAL; SINGH; SALBU, 1999).

Os reagentes utilizados para esta finalidade são sais de ácidos fortes, bases ou sais de ácidos fracos e bases a pH 7,0. Assim, alguns sais como $MgCl_2$, $CaCl_2$, KNO_3 ou mesmo NH_4OAc, são normalmente escolhidos para extrair metais, por deslocamento dos sítios de adsorção (URE; DAVIDSON, 2001; BORDAS; BOURG, 1998). Estes reagentes não atacam matéria orgânica, silicatos ou sulfetos metálicos, porém pode ocorrer uma ligeira dissolução dos carbonatos, exceto quando o tempo de extração é curto (GLEYZES; TELLIER; ASTRUC, 2002; TESSIER; CAMPBELL; BISSON, 1979).

O extrator mais popular é o $MgCl_2$ 1 mol/l, que combina a forte capacidade do Mg^{+2} com a fraca complexação do Cl^-. Entretanto, Ca^{+2} tem sido mais eficaz que o Mg^{+2} na remoção dos íons relacionados a fração trocável (GLEYZES; TELLIER; ASTRUC, 2002; TESSIER; CAMPBELL; BISSON, 1979).

3.5.2.2. Fração ligada a carbonatos/ Solúvel em ácido/ Carbonácea

Esta fração é ligada por forças covalentes, e por isso não há um fácil deslocamento dos metais como na fração anterior. Os metais são precipitados ou coprecipitados com carbonatos, que podem ser um importante adsorvente para muitos metais quando a matéria orgânica e os óxidos de ferro e manganês são menos abundantes (RAO; SAHUQUILLO; LOPEZ SANCHEZ, 2008; STONE; MARSALEK, 1996).

Esta fase é suscetível a mudanças de pH, pelo uso de um ácido moderado. O uso de soluções-tampão, em pH = 5,0 têm sido muito utilizadas nessa fase, como por exemplo, o tampão Ácido Acético / Acetato de Sódio ou Ácido Acético / Acetato de Amônio em pH =

5,0 permitindo que ocorra a liberação dos metais presentes em substratos orgânicos e inorgânicos (AHNSTROM; PARKER, 2001; LI et al., 2001; TESSIER; BISSON; CAMPBELL, 1979).

A redução do pH 7,0 (da fase trocável) para pH 5,0 nesta fase permite liberar os restantes dos íons adsorvidos, mais especificamente, elementos-traço que não foram extraídos na fração anterior. Altas proporções de manganês são encontradas nos extratos de Ácido acético / Acetato de sódio (TESSIER; BISSON; CAMPBELL, 1979).

3.5.2.3. Fração Redutível/ Oxídica

A fração redutível ou também chamada de oxídica consiste em dissolver óxidos e hidróxidos de ferro e manganês. A extração desses óxidos secundários, presentes como camadas superficiais de minerais ou como partículas bem discretas podem ocorrer pelos seguintes mecanismos ou combinação dos mesmos: adsorção; troca iônica; formação de complexo superficial; coprecipitação e penetração no retículo cristalino (HALL et al., 1996).

A fração redutível pode ser dividida em três: fração facilmente redutível (óxidos de manganês); fração moderadamente redutível (óxidos de ferro amorfos); e fração pobremente redutível (óxidos de ferro cristalinos). Até hoje esta classificação é discutida em alguns esquemas de extração sequencial (KRISHNAMURTI et al., 1995).

O controle do potencial de redução e pH dos reagentes nesta fração pode dissolver algumas ou todas as fases dos óxidos e hidróxidos de ferro e manganês (GLEYZES; TELLIER; ASTRUC, 2002).

3.5.2.4. Fração Oxidável/ Orgânica e Sulfídrica

Nesta fração ocorre degradação da matéria orgânica, em condições oxidantes, podendo levar a uma liberação de metais solúveis ligados a esses componentes. Os metais ligados a sulfetos também podem ser extraídos durante esta fase (MARIN et al., 1997).

Os oxidantes mais comuns são peróxido de hidrogênio em ácido moderado, NaOCl em pH = 9,5, $Na_4P_2O_7$ em pH = 9,5, e $K_4P_2O_7$. Em geral, o peróxido de hidrogênio aquecido é o reagente mais usado para dissolver a matéria orgânica, pois provoca um ataque efetivo na mesma e produz uma alteração mínima nos silicatos. Talvez a mais importante desvantagem fornecida por este reagente é a readsorção de metais na fração residual, o que requer uma

extração adicional com acetato de amônio em pH =2 (FERREIRA; SANTANA, 2012; HOWARD; VANDENBRINK, 1999; SUTHERLAND et al., 2000)

A combinação H_2O_2/NH_4OAc, onde a adição de NH_4OAc previne a readsorção dos metais extraídos, tem sido adotada em muitos esquemas para extrair metais associados com matéria orgânica e sulfetos (KRISHNAMURTI et al., 1995).

3.5.2.5. Fração Residual

A extração dos metais nesta fração ocorre através da digestão com ácidos fortes, como HF, $HClO_4$, HCl e HNO_3. A quantidade de metais associados a esta fração é também avaliado por alguns autores como a diferença entre a concentração total e o somatório das frações de metais extraídos durante as etapas anteriores (BOMBACH; PIERRA; KLEMM, 1994; CHLOPECKA et al., 1996; TESSIER; BISSON; CAMPBELL, 1979).

Diversos reagentes utilizados em procedimentos de extração sequencial têm vantagens e desvantagens e não há um reagente ou protocolo ideais para o uso geral no caso dos alimentos. Portanto, a escolha do processo deve estar relacionada com um objetivo definido, tendo em conta a natureza da amostra (RUZIK, 2012). É importante ressaltar que, após a escolha do procedimento de extração sequencial, apenas as espécies solúveis conseguem ser extraídas, o que retoma as condições de biodisponibilidade de cada elemento (BOUYSSIERE et al., 2003).

3.5.3. Extração sequencial em alimentos

A verificação das concentrações dos elementos traço, tóxicos e daqueles considerados nutrientes essenciais nos alimentos é realizada em muitos países de forma rotineira. Nas últimas duas décadas tem sido mostrado que a segurança alimentar e qualidade nutricional dos alimentos também dependem da forma química na qual um elemento está presente nos mesmos, já que a biodisponibilidade, a atividade benéfica e toxicidade dos minerais nos alimentos são em função da concentração do metal, do seu estado de oxidação e da forma química em que o mesmo se encontra na amostra (EBDON et al., 2001).

O número de trabalhos sobre especiação química em alimentos tem aumentado significativamente e atingiu uma taxa de 90 artigos por ano, porém, somente alguns elementos são amplamente estudados (como Arsênio, Selênio e Mercúrio), enquanto outros não atraem a atenção de pesquisadores. Elementos como: Co, I, Mn, Fe, Zn, Cu e Mo têm recebido pouca

atenção até agora (Figura 1) devido às suas baixas concentrações nos alimentos, comportamento químico complexo e instabilidade das espécies, tornando-se um desafio para a química (RUZIK, 2012).

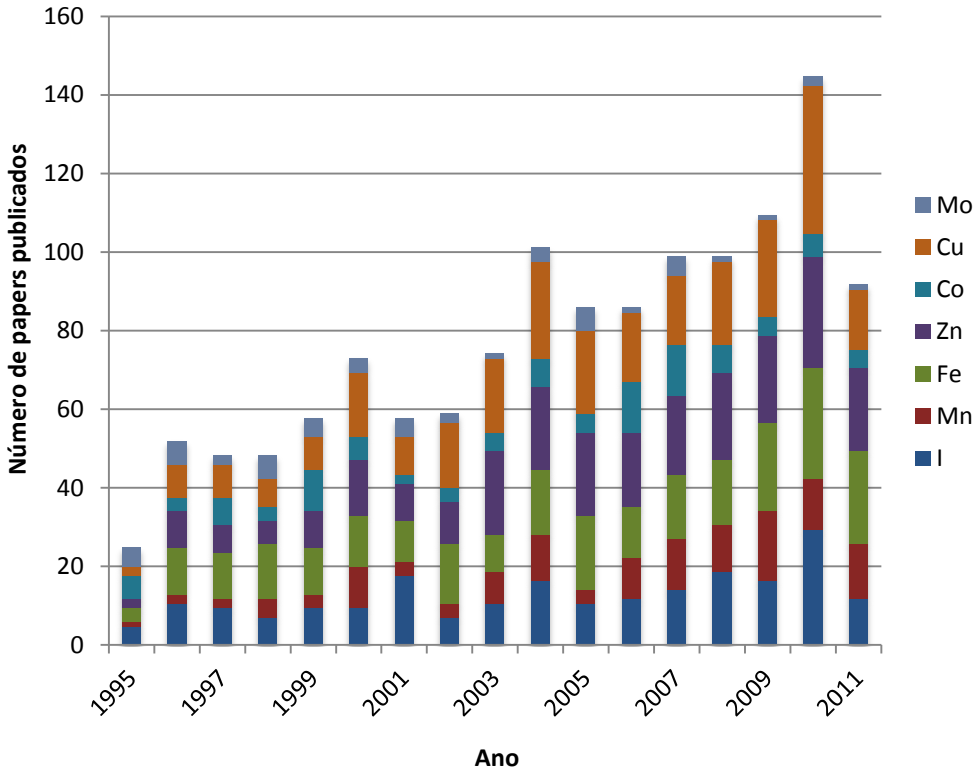

Figura 1 – Evolução do número de artigos publicados sobre especiação química em alimentos de 1995 a 2011.
Fonte: Adaptado de Ruzik (2012).

A análise por extração sequencial em alimentos deve apresentar certos cuidados, pois cada gênero alimentício possui uma matriz química diferente e requer um controle especial de interferências. Os complexos de minerais que são formados com nutrientes presentes na matriz dos alimentos, principalmente aqueles formados com metais lábeis, perdem sua estabilidade com a mudança de estado de oxidação, hidrólise, metilação e com a ação de microorganismos (CERVERA; MONTORO, 1994; RAYMAN, 2004; SCHRAUZER, 2006).

A extração sequencial deve ser realizada para separar os elementos da matriz sem perdas e sem alterar a forma original dos mesmos, porém, extrações a partir de amostras sólidas que não geram perdas ou contaminação e sem alterações para as espécies são extremamente difíceis. É necessário que tenha uma recuperação adequada dessas amostras (ataque com ácido forte) e preservação da espécie (QUEVAUVILLER; MAIER; GRIEPNK, 1996).

A escolha da técnica para extração deve ter algumas considerações: as propriedades químicas das substâncias que serão analisadas, suas formas químicas, a matriz e a técnica de aplicação (RUZIK, 2012). Dependendo da matriz da amostra a ser analisada e os elementos de interesse, a extração, dissolução, lixiviação ou extração sólido-líquido podem ser realizadas para o isolamento das espécies, desde que o procedimento as preserve (BOUYSSIERE et al., 2003).

Os extratores utilizados para a extração sequencial em alimentos podem ser diversos, assim como as técnicas utilizadas para a determinação de metais. Dentre elas, destacam-se: a Espectrometria de Absorção Atômica em Chama (FAAS), a Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica (ETAAS) ou com Forno de Grafite (GFAAS), a Espectrometria de Absorção Atômica com geração de Hidretos (HGAAS) ou com Vapor Frio (CVAAS), a Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma acoplado Indutivamente (ICP-OES) e a Espectrometria de Massas com Plasma Induzido (ICP-MS) (CAMPOS; GRINBERG, 2001; KOT; NAMIES´NIK, 2000).

De todas as técnicas analíticas utilizadas para detecção, o ICP-MS é considerada a técnica com detector mais sensível para a especiação e análise simultânea de diversos elementos. Entretanto, seu alto custo faz com que a FAAS seja considerada a técnica de maior potencial de uso em análises, onde o custo, alta reprodutibilidade e resultados confiáveis tornam-se fatores determinantes para a escolha deste método (CAMPOS; GRINBERG, 2001).

Andrade, Teodoro e Takase (2005) analisaram amostras de hortaliças dos tipos A e B quanto ao teor total de zinco através de Espectrometria de Absorção Atômica em Chama (FAAS), e o método de extração seqüencial foi aplicado com os seguintes extratores: solução de $CaCl_2$ 1M; solução de ácido acético 0,1M; solução de ácido acético 0,5M / acetato de amônio 5% (pH=5,0); solução de NaOH 0,1M e solução de HCl 0,5M. Foram encontradas, no mínimo, 6 espécies químicas distintas para o zinco nestas amostras (ANDRADE; TEODORO; TAKASE, 2005).

Silva et al. (2010) avaliaram o teor e a biodisponibilidade de ferro, manganês e zinco em extratos da casca do fruto e das folhas de *Caesalpinia ferrea* Martius também utilizando a FAAS. Os extratores utilizados na extração sequencial foram: NaOH 0,05 mol/l, tampão Tris-HCl 0,05 mol/l (pH= 8) em dodecil sulfato de sódio (SDS) 1% (p/v), HCl 0,05 mol/l e água quente (60 °C). A casca do fruto e as folhas apresentaram níveis altos de ferro e manganês. O ferro apresentou melhor biodisponibilidade na casca do fruto e nas folhas. Manganês e zinco se mostraram mais biodisponíveis nas folhas.

São poucos os estudos relacionados à especiação química nos alimentos e por isso é de grande interesse expandir estas análises para esta área, uma vez que a especiação de metais já está amplamente reconhecida em análises biológicas e ambientais (DAS et al., 1995). Desta forma, a informação sobre a especiação de elementos em alimentos é de suma importância para estudos de nutrição e saúde humana (KHOUZAM et al., 2012).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. PREPARO DA FARINHA DE RESÍDUO DE FRUTAS E HORTALIÇAS (FFH)

4.1.1. Amostras de frutas e hortaliças

As frutas utilizadas foram: laranja seleta (*Citrus sinensis*), maracujá (*Passiflora edulis*) e melancia (*Citrullus lanatus*). As hortaliças utilizadas foram: abobrinha (*Cucúrbita pepo*), alface (*Lactuca sativa*), cenoura (*Daucus carota*), espinafre (*Spinacea oleracea*), hortelã (*Mentha s.p.*), inhame (*Colocasia esculenta*), pepino (*Cucumis sativus*) e rúcula (*Eruca sativa*). Todas as amostras foram adquiridas em um supermercado no bairro de Botafogo, Rio de Janeiro, e transportadas ao laboratório para uso imediato. As frutas e hortaliças foram lavadas em água corrente e, após, sanitizadas com Hipoclorito de sódio 200 ppm por 30 minutos. Em seguida, foram lavadas novamente em água corrente.

4.1.2. Preparo da FFH

Todas as frutas e hortaliças foram utilizadas de forma integral (incluindo talos, sementes, bagaços, cascas, etc.). Após sanitização, foram fracionadas, pesadas em balança analítica (Edutec, 02001002, Brasil) e processadas em uma centrífuga juicer (Vicini, VCC 7000, Brasil), originando a bebida isotônica segundo Martins et al. (2011).

O resíduo produzido a partir do processamento da bebida isotônica foi imediatamente seco em estufa ventilada (Marconi, MA035, Brasil) a 65 °C por 6 horas. Após, este foi triturado em um processador de alimentos (Philips Wallita, RI 2035, Brasil) e levado novamente para estufa ventilada a 90°C, de acordo com o descrito por Ferreira et al. (2013).

Após todo o processo, a FFH foi pesada e armazenada em embalagens de alumínio assépticas e seladas selador (Imap, FM 3060, Brasil). A granulometria da FFH foi realizada por peneiração de 100g da amostra durante 10 minutos num agitador de peneira com abertura de malha 40 – 170 “mesh Tyler”, apresentando um tamanho máximo de partícula de 75 μm. A FFH utilizada neste trabalho foi produzida em dois lotes diferentes, caracterizados pela data de compra das matérias primas, distantes entre si em 30 dias

Todos os utensílios utilizados neste processo (facas, tabuleiros, recipientes, tábuas) e, inclusive, os utensílios da centrífuga juicer também foram sanitizados com a solução de Hipoclorito de sódio 200 ppm por 30 minutos e lavados posteriormente com água corrente.

A Figura 2 apresenta o fluxograma de produção da FFH.

.

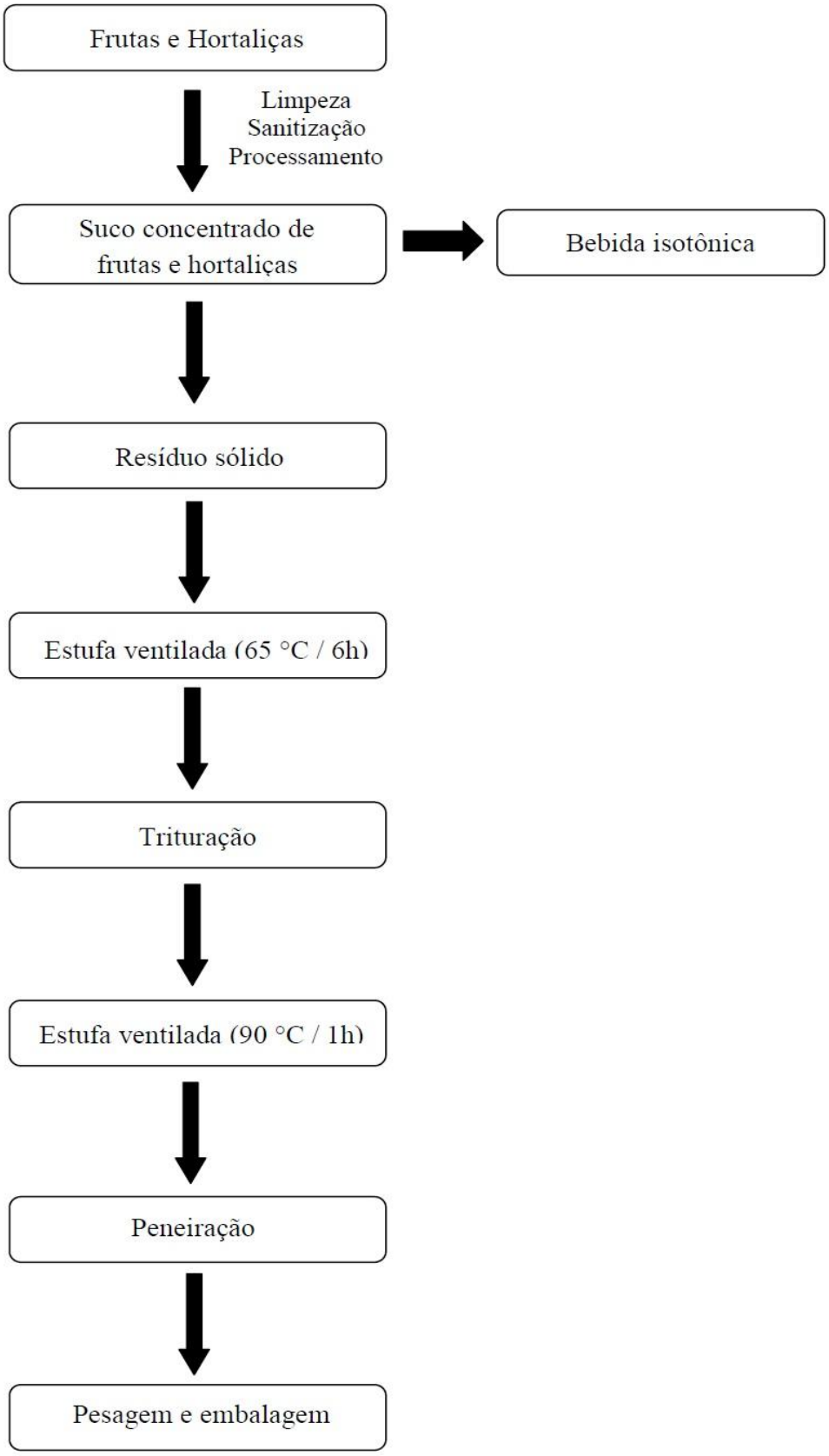

Figura 2. Fluxograma de produção da FFH.
Fonte: Ferreira et al. (2013).

4.2. DETERMINAÇÃO DOS METAIS

4.2.1. Garantia de qualidade analítica

Todos os equipamentos foram devidamente calibrados conforme as especificações do fabricante e todas as vidrarias e acessórios de laboratório foram lavados com água destilada antes de realizar as análises. Os tubos falcon (polipropileno, 50 ml) utilizados na determinação dos teores totais dos metais e dos extratos obtidos pelo processo de extração sequencial foram descontaminados em banho de Ácido nítrico 10% por, no mínimo, 48 horas (FLORENCE, 1982; FUKAI; HUYNH-NGOC, 1975).

As análises de determinação dos teores totais e dos extratos obtidos pelo processo de extração sequencial de Cu, Fe, Mn, Mg e Zn, foram feitas em triplicata e a leitura desses metais realizadas em Espectrômetro de Absorção Atômica em Chama (Perkin-Elmer, 3300, USA).

4.2.2. Determinação do teor total dos metais

Para a determinação do teor total de Cu, Mn e Zn, foram pesados aproximadamente 2g de FFH em cadinhos com balança analítica (Edutec, 02001002, Brasil) para posterior calcinação em mufla (Magnus, 01200-5, Brasil) a 550 °C. As cinzas obtidas foram dissolvidas com ácido clorídrico PA em volume proporcional para preparação de 15 ml de solução a 2M (método 304/IV) (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). A solução obtida foi transferida para tubos falcon (polipropileno, 50 ml) descontaminados, sendo armazenados em geladeira a 4°C até o momento da leitura. A leitura foi realizada em espectrômetro de absorção atômica em chama.

No caso dos metais Fe e Mg, o procedimento realizado foi o mesmo, porém com aproximadamente 0,5g de amostra e a dissolução das cinzas foi realizada com ácido clorídrico PA em volume proporcional para preparação de 15 ml de solução a 0,5M, de modo a evitar interferência na análise.

4.2.3. Determinação dos metais cobre, manganês e zinco por processo de extração sequencial

Para realização da extração sequencial de Cu, Mn e Zn, foram pesados aproximadamente 1g de FFH em balança analítica (Edutec, 02001002, Brasil) nos tubos falcon e a extração sequencial foi aplicada em 4 etapas, seguindo padrão estabelecido por Andrade, Alves e Takase (2005):

1ª etapa – Fração trocável – Adição de 15 ml do 1º extrator ($CaCl_2$ 1M) na amostra de FFH. Após 1 hora de contato do extrator com a amostra, a mesma foi filtrada em papel de filtro e o extrato obtido foi completo com HCl 2M até o volume de 15 ml, sendo armazenado em geladeira a 4°C até o momento da leitura. Foi feito o branco dos extratos: $CaCl_2$ 1M (correspondente ao volume de filtração da amostra) + HCl 2M até completar o volume de 15 ml.

2ª etapa – Fração carbonácea – No resíduo obtido após o 1° extrator foi adicionado, em sequência, 15 ml do 2º extrator (Ácido Acético 0,1M / Acetato de amônio 5% em pH 5,0) na mesma amostra de FFH. Após 1 hora de contato do extrator com a amostra, a mesma foi filtrada em papel de filtro e o extrato obtido foi completo com HCl 2M até o volume de 15 ml, sendo armazenado em geladeira a 4°C até o momento da leitura. Foi feito o branco dos extratos: Ácido Acético 0,1M / Acetato de amônio 5% em pH 5,0 (correspondente ao volume de filtração da amostra) + HCl 2M até completar o volume de 15 ml.

3ª etapa – Fração oxídica – Na sequência, como descrito acima, foi adicionado 15 ml do 3º extrator (Ácido Acético 0,5M). Após 1 hora de contato do extrator com a amostra, a mesma foi filtrada em papel de filtro e o extrato obtido foi completo com HCl 2M até o volume de 15 ml, sendo armazenado em geladeira a 4°C até o momento da leitura. Foi feito o branco dos extratos: Ácido Acético 0,5M (correspondente ao volume de filtração da amostra) + HCl 2M até completar o volume de 15 ml.

4ª etapa – Fração orgânica – Em seguida, foi adicionado 15 ml do 4º extrator (HCl 0,5M) na mesma amostra de FFH. Após 1 hora de contato do extrator com a amostra, a mesma foi filtrada em papel de filtro e o extrato obtido foi completo com HCl 2M até o volume de 15 ml, sendo armazenado em geladeira a 4°C até o momento da leitura. Foi feito o branco dos extratos: HCl 0,5M (correspondente ao volume de filtração da amostra) + HCl 2M até completar o volume de 15 ml.

Fração residual – O resíduo remanescente obtido após as 4 etapas anteriores foi seco em estufa a 105 ºC (Sterilifer, SX 1.2 DTME, Brasil) até peso constante, e após, calcinado em mufla (Magnus, 01200-5, Brasil) a 550 °C. A recuperação foi feita com a dissolução das cinzas em ácido clorídrico PA em volume proporcional para preparo de 15 ml de solução a 2M. A solução obtida foi transferida para tubos falcon, sendo armazenados em geladeira a 4°C até o momento da leitura. A leitura foi realizada em espectrômetro de absorção atômica.

4.2.4. Determinação dos metais ferro e magnésio por processo de extração sequencial

Para os metais Fe e Mg, o processo utilizado foi o mesmo descrito no item 4.4.3, porém o peso da amostra foi de aproximadamente 0,3 g, a solução utilizada para completar os extratos até o volume de 15 ml foi HCl 0,5 M e a dissolução do resíduo remanescente após calcinação foi feita com ácido clorídrico PA em volume proporcional para preparo de 15 ml de solução a 0,5M, visando eliminar interferências na análise.

4.2.5. Influência no processo de extração sequencial de cobre, ferro, manganês, magnésio e zinco com a agitação

Os processos de extração sequencial descritos nos itens 4.4.3 e 4.4.4 também foram avaliados com o uso de um sistema de agitação. Foram realizadas todas as etapas da extração sequencial, porém, durante a 1 hora de contato do extrator com a amostra, foi utilizado um banho metabólico Dubnoff com agitação (Mistura, EM 631 1/1 180mm, Brasil) a 25 °C para melhor homogeneização da amostra com o extrator e para avaliação de uma otimização da análise.

4.2.6. Influência do armazenamento

Após o preparo da FFH, a mesma foi colocada em embalagens de alumínio assépticas e seladas com selador, que ficaram armazenadas em temperatura ambiente. As análises de determinação do teor total e processo de extração sequencial de Cu, Fe, Mn, Mg e Zn foram realizadas nos tempos de armazenamento: 0, 30 e 60 dias.

4.3. EPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA EM CHAMA

A determinação dos metais foi feita empregando o Espectrômetro de Absorção Atômica em Chama (Perkin-Elmer, 3300, USA), presente no Departamento de Química Analítica da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Os padrões de calibração foram preparados a partir das soluções padrão dos metais descritas nos itens 4.1.1 e 4.1.2, considerando os meios de extração, de forma a conter os reagentes em concentrações similares às adicionadas nas amostras (método 394/IV) (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). A construção das curvas analíticas, bem como configurações aplicadas, estão descritas na tabela 3. A fim de eliminar ação de interferentes, na determinação de Mg, foi utilizada uma solução de lantânio a 10%.

Tabela 3 - Condições operacionais para análise de metais com Espectrômetro de Absorção Atômica em Chama.

Elemento	Corrente da lâmpada (mA)	Comprimento de onda (nm)	Abertura da fenda (nm)	Concentração ($mg.L^{-1}$)
Cu	15	324,8	0,7	0,1; 0,5; 1,0; 2,0 e 5,0
Fe	30	248,3	0,2	0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 5,0
Mn	20	279,5	0,2	0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 5,0
Mg	6	285,2	0,7	0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 5,0 e 10,0
Zn	20	213,9	0,7	0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0

4.4. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As análises de MEV foram realizadas em um microscópio eletrônico de varredura, (Jeol, JSM, 6510 LV) com resolução de 30 nm e voltagem na faixa de 30 kV. Este equipamento encontra-se disponível no Laboratório de Microscopia Eletrônica, no Departamento de Engenharia de Materiais da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC – RIO). As amostras de FFH foram depositadas sobre uma fita dupla face e esta foi colocada em “stubs”, os quais foram levados para o equipamento de pulverização catódica, havendo deposição de carbono na amostra. Foi analisado o lote 2, nos tempos 0 e 60 dias.

4.5. TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Foram realizados testes de Dixon com nível de significância de 90%, teste *t* de Student com intervalo de 95% e análise de variância (ANOVA) com aplicação do teste de Tukey ($p < 0,05$) utilizando o software Assistat (7.5 beta, 2010).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. DETERMINAÇÃO DO TEOR TOTAL DOS METAIS

O teor total dos metais analisados, Cu, Fe, Mn, Mg e Zn estão apresentados na tabela 4. O armazenamento por até 60 dias não influenciou no teor total destes. Após tratamento estatístico verifica-se que há uma diferença entre os lotes, já que foram preparados em períodos diferentes, distantes entre si em 30 dias, podendo haver uma influência das matérias primas. Variações na fração de minerais de frutas e hortaliças podem ser atribuídas à época de colheita, solo, mudanças ambientais, etc. (EKHOLM et al., 2007; JÚNIOR; SIDONIO; MORAES, 2010).

Ao avaliar as diferenças entre os lotes, do ponto de vista nutricional, observa-se que as mesmas são irrelevantes, considerando a porção de farinhas de frutas e hortaliças utilizadas no desenvolvimento de produtos tecnológicos. Estas farinhas substituem a farinha de trigo na ordem de 15 a 40% (MAURO; SILVA; FREITAS, 2010; PEREZ; GERMANI, 2007; SANTANA et al.; 2011).

O lote 1 apresentou maior teor de cobre e magnésio, quando comparado ao lote 2, na ordem de 20% e 15%, respectivamente. Para os metais ferro, manganês e zinco, o lote 2 teve maior teor na ordem de 10%.

Tabela 4 - Teor total (mg%) de cobre, ferro, manganês, magnésio e zinco de FFH armazenada por até 60 dias (N = 3).

	FFH lote 1 (mg%)			FFH lote 2 (mg%)		
Elementos	Tempo (Dias)			Tempo (Dias)		
	0	30	60	0	30	60
Cobre	1,06 ± 0,02 a	1,07 ± 0,01 a	1,08 ± 0,01 a	0,80 ± 0,01 b	0,80 ± 0,00 b	0,79 ± 0,01 b
Ferro	5,25 ± 0,02 a	5,24 ± 0,02 a	5,25 ± 0,02 a	5,81 ± 0,00 b	5,81 ± 0,02 b	5,83 ± 0,00 b
Manganês	2,48 ± 0,01 a	2,48 ± 0,01 a	2,48 ± 0,01 a	2,74 ± 0,01 b	2,73 ± 0,01 b	2,73 ± 0,01 b
Magnésio	58,52 ± 0,02 a	58,07 ± 0,32 a	58,44 ± 0,41 a	50,04 ± 0,00 b	50,05 ± 0,02 b	50,05 ± 0,03 b
Zinco	2,29 ± 0,01 a	2,33 ± 0,01 a	2,29 ± 0,01 a	2,53 ± 0,01 b	2,52 ± 0,01 b	2,52 ± 0,01 b

Valores representados por média ± desvio padrão (n=3). Para cada elemento, médias com letras iguais na mesma linha não apresentam diferença significativa ($p \geq 0,05$).

Zanatta, Schlabitz e Ethur (2010), encontraram baixos teores de cobre em farinha de cenoura (0,45mg%), farinha de beterraba (0,56mg%) e farinha de espinafre (1,37mg%) e altos teores de magnésio: 90,4mg%, 164,4mg% e 667,6mg%, respectivamente nestas mesmas

farinhas. De forma semelhante, a FFH apresenta os metais cobre e magnésio como os de mais baixo e alto teores, respectivamente, mesmo se tratando de uma amostra mista.

5.2. AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA AGITAÇÃO NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO SEQUENCIAL

Foi feita a avaliação da eficiência da agitação na extração sequencial dos metais na FFH. Os resultados são apresentados nas tabelas 5 e 6. A mobilidade e disponibilidade dos metais dependem da reatividade e do comportamento das ligações dos elementos químicos com os componentes da matriz (BACON; DAVIDSON, 2008; KHOUZAM et al., 2012; RAO, SAHUQUILLO; LOPEZ SANCHEZ, 2008). A agitação, com velocidade compatível, pode promover uma alteração nas interações químicas, sem interferir na forma química da espécie, favorecendo a extração. O cisalhamento interfere nestas interações, levando à quebra da ligação, alterando a matriz, e portanto, não desejável na especiação química. Considerando que a força de rotação de um liquidificador é na faixa de 400 rpm (doméstico) e 10.000 rpm (industrial) e a provocada pelo equipamento utilizado é de 200 rpm, acredita-se que este não favorece o cisalhamento. Não foi observado diferença significativa na eficiência da extração com ou sem o uso de agitação, como mostram as tabelas 5 e 6, assim, para as análises sequenciais foi feita a opção de aplicar a extração sequencial sem a agitação.

Tabela 5 - Avaliação da influência da agitação no processo de extração sequencial na FFH lote 1 na análise de cobre, ferro, manganês, magnésio e zinco (N=3)

		Extração sequencial				
		Teor extraído (mg%)				
Elementos	Tratamentos	$CaCl_2$ 1M	CH3COOH 0,1M/ CH3COONH4 5% (pH = 5,0)	CH3COOH 0,5M	HCl 0,5M	Resíduo
Cobre	Sem agitação	0,23 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,21 ± 0,01
	Com agitação	0,22 ± 0,02	0,27 ± 0,01	0,16 ± 0,02	0,12 ± 0,01	0,22 ± 0,01
	Valor de p	0,7057	0,3957	0,8755	0,3840	0,1638
Ferro	Sem agitação	0,17 ± 0,01	1,48 ± 0,01	0,59 ± 0,00	0,61 ± 0,01	1,55 ± 0,01
	Com agitação	0,17 ± 0,04	1,51 ± 0,03	0,60 ± 0,01	0,62 ± 0,02	1,54 ± 0,01
	Valor de p	0,8405	0,1859	0,4428	0,4644	0,7208
Manganês	Sem agitação	0,87 ± 0,01	0,49 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,14 ± 0,00	0,72 ± 0,01
	Com agitação	0,88 ± 0,02	0,52 ± 0,03	0,19 ± 0,01	0,15 ± 0,00	0,74 ± 0,01
	Valor de p	0,4298	0,1959	0,3493	0,4429	0,1067
Magnésio	Sem agitação	26,87 ± 0,00	16,39 ± 0,31	5,42 ± 0,05	2,48 ± 0,05	2,84 ± 0,04
	Com agitação	26,96 ± 0,28	16,65 ± 0,58	5,44 ± 0,08	2,51 ± 0,05	2,87 ± 0,03
	Valor de p	0,6144	0,5278	0,7668	0,5378	0,4267
Zinco	Sem agitação	0,77 ± 0,01	0,52 ± 0,00	0,43 ± 0,01	0,31 ± 0,01	0,22 ± 0,01
	Com agitação	0,78 ± 0,01	0,53 ± 0,00	0,44 ± 0,01	0,32 ± 0,01	0,22 ± 0,02
	Valor de p	0,1285	0,5026	0,7017	0,1705	0,6281

Valores representados por média ± desvio padrão (n=3). Para cada elemento, a comparação entre os tratamentos seguidos por valores de $p \geq 0,05$ não apresentam diferença significativa.

Tabela 6 - Avaliação da influência da agitação no processo de extração sequencial de cobre, ferro, manganês, magnésio e zinco na FFH lote 1 (N=3).

Elementos	Total extraído (Extratores + resíduo) (mg%)		
	Sem agitação	Com agitação	Valor de p
Cobre	0,96 ± 0,05	0,99 ± 0,07	0,5784
Ferro	4,39 ± 0,05	4,44 ± 0,10	0,7362
Manganês	2,41 ± 0,04	2,46 ± 0,07	0,3432
Magnésio	54,01 ± 0,45	54,43 ± 1,02	0,5497
Zinco	2,25 ± 0,03	2,28 ± 0,04	0,3573

Valores representados por média ± desvio padrão (n=3). Para cada elemento, a comparação entre os tratamentos seguidos por valores de $p \geq 0,05$ não apresentam diferença significativa.

5.3. INFLUÊNCIA DO ARMAZENAMENTO NA EXTRAÇÃO SEQUENCIAL DOS METAIS Cu, Fe, Mn, Mg e Zn NA FFH

5.3.1. Extração sequencial

O estudo do teor total dos metais não permite o real conhecimento da biodisponibilidade e do comportamento das espécies químicas nos alimentos (RUZIK, 2012). A extração sequencial é um instrumento para a especiação química. Ao aplicar o processo de extração sequencial em um alimento, é possível ter um melhor conhecimento quanto as formas que os metais podem estar presentes na matriz e disponibilizados quanto reatividade química.

Nas tabelas 7 e 8 são apresentados, respectivamente, os resultados obtidos da extração sequencial da FFH nos lotes 1 e 2, armazenadas por até 60 dias.

Tabela 7 – Extração sequencial de cobre, ferro, manganês, magnésio e zinco na FFH lote 1 armazenada por até 60 dias. (N = 3).

Extração sequencial FFH lote 1						
		Extratos (%)				
Elementos	Tempo (Dias)	1*	2*	3*	4*	Resíduo
Cobre	0	0,23 ± 0,01a	0,26 ± 0,01ab	0,16 ± 0,01b	0,11 ± 0,01a	0,21 ± 0,01a
	30	0,15 ± 0,01b	0,27 ± 0,01a	0,18 ± 0,01a	0,12 ± 0,01a	0,21 ± 0,01a
	60	0,23 ± 0,01a	0,26 ± 0,01abc	0,16 ± 0,01ab	0,16 ± 0,01a	0,21 ± 0,01a
Ferro	0	0,17 ± 0,01a	1,48 ± 0,01a	0,59 ± 0,00a	0,61 ± 0,01a	1,55 ± 0,01a
	30	0,18 ± 0,01a	1,46 ± 0,02a	0,60 ± 0,01a	0,61 ± 0,01a	1,55 ± 0,00a
	60	0,18 ± 0,01a	1,49 ± 0,01a	0,60 ± 0,01a	0,60 ± 0,02a	1,55 ± 0,01a
Manganês	0	0,87 ± 0,01a	0,49 ± 0,01c	0,18 ± 0,01c	0,14 ± 0,00a	0,72 ± 0,00c
	30	0,88 ± 0,01a	0,51 ± 0,02bc	0,18 ± 0,01c	0,15 ± 0,01a	0,70 ± 0,01c
	60	0,87 ± 0,01a	0,53 ± 0,01b	0,17 ± 0,01c	0,16 ± 0,01a	0,72 ± 0,01c
Magnésio	0	26,87 ± 0,00a	16,39 ± 0,31a	5,42 ± 0,05a	2,48 ± 0,05ª	2,84 ± 0,04a
	30	27,19 ± 0,78a	16,52 ± 1,10a	5,50 ± 0,02a	2,50 ± 0,02ª	2,86 ± 0,03a
	60	26,54 ± 0,04a	15,99 ± 0,10a	5,46 ± 0,02a	2,53 ± 0,02ª	2,87 ± 0,03a
Zinco	0	0,77 ± 0,01a	0,52 ± 0,00d	0,43 ± 0,01c	0,31 ± 0,01c	0,22 ± 0,01a
	30	0,66 ± 0,00d	0,58 ± 0,02b	0,51 ± 0,01b	0,32 ± 0,01c	0,18 ± 0,01a
	60	0,77 ± 0,01a	0,55 ± 0,00c	0,43 ± 0,01c	0,33 ± 0,01c	0,21 ± 0,00a

Valores representados por média ± desvio padrão (n=3). Para cada elemento, médias com letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença significativa ($p \geq 0,05$).

* (1) $CaCl_2$ 1M; (2) CH3COOH 0,1M/ CH3COONH4 5% [pH = 5,0]; (3) CH3COOH 0,5M; (4) HCl 0,5 M.

No início da extração, a fração trocável, representada pelo extrato 1, identifica compostos com baixa interação aos macronutrientes, sendo disponibilizados na forma iônica (AHNSTROM; PARKER, 2001; ARUNACHALAM et al., 1996; KRISHNAMURTI et al., 1995; NARWAL; SINGH; SALBU, 1999; RAO; SAHUQUILLO; LOPEZ SANCHEZ, 2008). Analisando a biodisponibilidade, com exceção do magnésio e manganês, que tem seus processos de absorção associados à difusão passiva (ANDERSON, 2005; BARAN, 1995), os demais metais estudados, extraídos por esta fração tem sua biodisponibilidade reduzida (BACON; DAVIDSON, 2008). Considerando alguns processos metabólicos e tecnológicos, esta fração pode promover reações de degradação, ativadas por exemplo, na produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS), através da reação de Haber-Weiss favorecida pela presença de metais de transição (BREMNER; BEATTIE, 1995).

Tabela 8 – Extração sequencial de cobre, ferro, manganês, magnésio e zinco na FFH lote 2 armazenada por até 60 dias (N = 3).

Extração sequencial FFH lote 2						
		Extratos (%)				
Elementos	Tempo (Dias)	1*	2*	3*	4*	Resíduo
Cobre	0	0,06 ± 0,00c	0,25 ± 0,00bcd	0,12 ± 0,01c	0,08 ± 0,00b	0,28 ± 0,01c
	30	0,06 ± 0,00c	0,24 ± 0,00cd	0,12 ± 0,01c	0,08 ± 0,00b	0,27 ± 0,01c
	60	0,06 ± 0,01c	0,24 ± 0,01d	0,11 ± 0,01c	0,08 ± 0,00b	0,25 ± 0,01c
Ferro	0	0,68 ± 0,01b	1,26 ± 0,01b	0,28 ± 0,01b	0,42 ± 0,01b	2,72 ± 0,01b
	30	0,68 ± 0,02b	1,25 ± 0,02b	0,28 ± 0,01b	0,40 ± 0,01b	2,73 ± 0,01b
	60	0,66 ± 0,01b	1,24 ± 0,01b	0,27 ± 0,01b	0,41 ± 0,02b	2,71 ± 0,02b
Manganês	0	0,68 ± 0,01b	0,59 ± 0,01a	0,22 ± 0,01b	0,11 ± 0,01b	1,05 ± 0,00a
	30	0,67 ± 0,00b	0,58 ± 0,01a	0,24 ± 0,01a	0,11 ± 0,01b	1,02 ± 0,01b
	60	0,68 ± 0,01b	0,58 ± 0,01a	0,21 ± 0,01b	0,11 ± 0,01b	1,03 ± 0,01ab
Magnésio	0	24,68 ± 0,03b	13,34 ± 0,03b	5,66 ± 0,02b	2,06 ± 0,01b	2,50 ± 0,02b
	30	25,11 ± 0,55b	13,22 ± 0,19b	5,67 ± 0,03b	2,06 ± 0,01b	2,51 ± 0,01b
	60	24,76 ± 0,49b	13,27 ± 0,05b	5,66 ± 0,02b	2,06 ± 0,01b	2,50 ± 0,02b
Zinco	0	0,74 ± 0,01b	0,62 ± 0,01a	0,52 ± 0,01ab	0,42 ± 0,01a	0,16 ± 0,01bc
	30	0,72 ± 0,00c	0,58 ± 0,01b	0,54 ± 0,00a	0,40 ± 0,01ab	0,15 ± 0,01c
	60	0,71 ± 0,01c	0,60 ± 0,01ab	0,54 ± 0,01a	0,39 ± 0,00b	0,17 ± 0,00bc

Valores representados por média ± desvio padrão (n=3). Para cada elemento, médias com letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença significativa (p>0,05).
* (1) $CaCl_2$ 1M; (2) CH3COOH 0,1M/ CH3COONH4 5% [pH = 5,0]; (3) CH3COOH 0,5M; (4) HCl 0,5 M.

A fração carbonácea, extrator 2, envolve ligações por forças covalentes, já identificando maior interação com macronutrientes (RAO; SAHUQUILLO; LOPEZ SANCHEZ, 2008). A complexidade das diferentes formas químicas dos macronutrientes: proteínas, aminoácidos, ácidos graxos, triglicerídeos, mono e polissacarídeos, indica a diversidade da interação de metais com estes compostos. Há um aumento significativo do teor de ferro extraído por esta fração, quando comparada ao 1º extrator; já para o magnésio há redução. Para o ferro que tem a absorção favorecida por meio ativo, esta fração provavelmente apresenta melhor biodisponibilidade em relação ao 1º extrator, e no caso do magnésio, esta fração provavelmente promove redução da biodisponibilidade, na comparação com o 1º extrator.

A fração oxídica, extrator 3, que dissolve compostos na forma de óxidos e hidróxidos já interfere nas espécies com maior interação a certas substâncias orgânicas (RAO; SAHUQUILLO; LOPEZ SANCHEZ, 2008). Estas frações identificam compostos que vão

influenciar nos processos metabólicos por apresentarem similaridade química, agindo como antagonistas, por competirem pelos mesmos sítios de ligação (ANDERSON, 2005; ASCHNER; VRANA; ZHENG 1999). O manganês e o magnésio apresentam teores extraídos nesta fração bem diferenciados em relação aos dois primeiros extratores, havendo uma redução não inferior a 67% em relação ao extrator 1 e 57% no extrator 2. Este perfil, que se repete no extrator 4, reforça o favorecimento quanto à biodisponibilidade destes metais.

A fração orgânica, extrator 4, está relacionada com a degradação dos macronutrientes por ação oxidante (MARIN et al., 1997). Esta fração permite associar alto grau de interação dos metais com macronutrientes, favorecendo a biodisponibilidade dos metais que são absorvidos por transporte ativo e desfavorecendo os de difusão passiva (ANDERSON, 2005; BARAN, 1995; SHILS; OLSON; SHIKE, 1994). Com exceção do ferro, todos os demais metais analisados, tem este extrator com menor eficiência, promovendo menor teor de metal extraído.

A fração residual, relacionada aos compostos insolúveis no processo de extração sequencial aplicado, mostra que cerca de 40% do ferro e manganês, 30% cobre, 5% do magnésio e 10% do zinco não foram extraídos. É possível afirmar que no mínimo 5 espécies químicas distintas de cada metal analisado se encontra na amostra, influenciando na biodisponibilidade dos mesmos e em todos os processos metabólicos inerentes da própria amostra. Estudos em alimentos mencionados anteriormente revelam também que a fração residual é significativa, demonstrando um desafio para a ciência, pois são compostos insolúveis, que não sofrem influência química com os extratores aplicados, revelando uma forte interação intrínseca, e que certamente influenciam na biodisponibilidade dos mesmos, como também nos processos metabólicos intrinsecamente associados à matriz (BOMBACH; PIERRA; KLEMM, 1994; CHLOPECKA et al., 1996; TESSIER; BISSON; CAMPBELL, 1979).

5.3.2. Perfil de extração após armazenamento por até 60 dias

Diferenças irrelevantes associadas ao teor total dos metais, conforme mencionado no item 5.1., não persistem quando se avalia a extração sequencial dos lotes de FFH. Neste caso, nota-se mudança significativa no perfil de extração (Figuras 3, 4, 5, 6 e 7).

Observa-se que, para o cobre (figura 3), o extrator de maior eficiência para ambos os lotes foi o 2, representando a fração carbonácea; mas, ainda assim no lote 2, a maior proporção do metal está associada à fração residual. Há diferença significativa no perfil de

extração e nos teores extraídos entre os lotes. Durante o armazenamento, há influência no lote 1 nas frações 1 (trocável) e 3 (oxídica), interferindo no perfil de extração, caracterizando compostos de cobre instáveis ao envelhecimento. Ressalta-se o já afirmado em alguns estudos que cada gênero alimentício possui uma matriz química diferente, o que gera cuidados na especiação química (CERVERA; MONTORO, 1994; RAYMAN, 2004; SCHRAUZER, 2006). Neste estudo, podemos considerar que os lotes de cada fruta ou hortaliça utilizados e também a farinha processada, podem ser considerados como uma matriz singular.

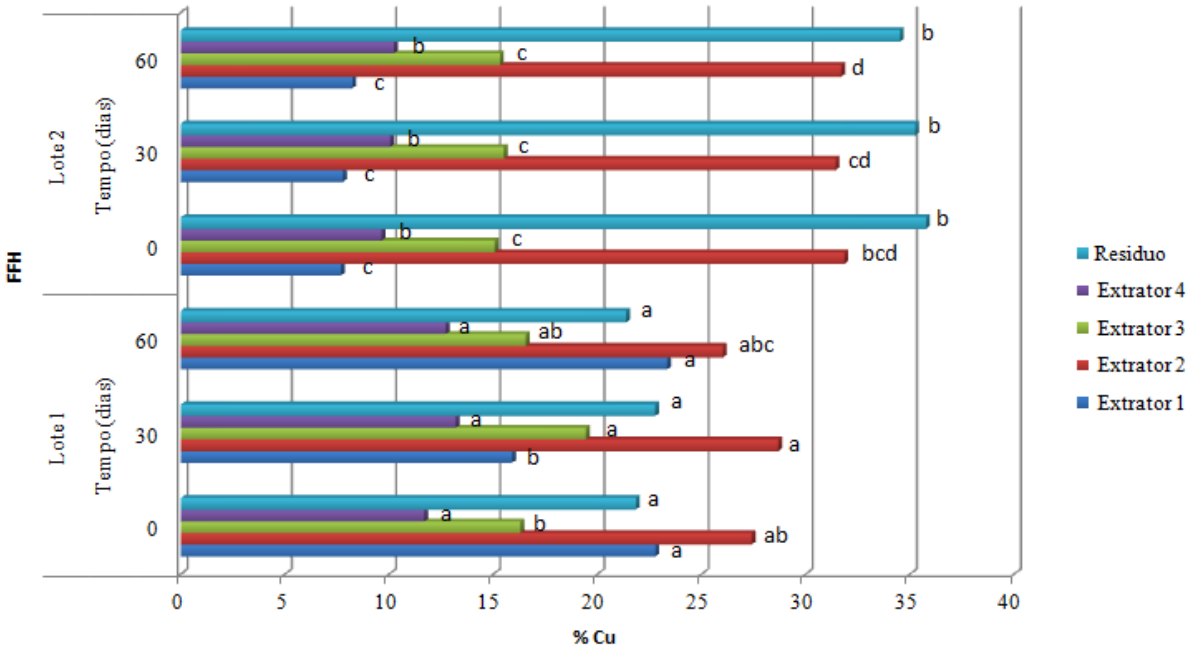

Figura 3 – Perfil de extração do Cobre (%) nos lotes 1 e 2 da FFH durante armazenamento por até 60 dias (N = 3).
Barras horizontais indicam % de cada extrator e do resíduo. Barras horizontais de mesma cor seguidas pela mesma letra não apresentam diferença significativa ($p \geq 0,05$).

Andrade, Alves e Takase (2005) realizaram extração sequencial para o cobre em ervas medicinais, onde o perfil de extração foi similar para a maioria das amostras, porém os extratores de maior eficiência foram o extrator 1 ($CaCl_2$ 1M) e o extrator 3 (HCl 0,5M). Considerando que as frações de maior eficiência na extração do cobre na FFH foram as frações carbonácea e residual, que revelam o início e o fim do processo, caracterizando a extração de compostos fracamente ligados ao substrato, como sais, e compostos fortemente ligados ao substrato, insolúveis aos meios extratores, como os complexos orgânicos, corrobora-se o já mencionado anteriormente: que o estudo de cada elemento e também seus diferentes lotes é fundamental para avaliar a biodisponibilidade e comportamento químico na própria matriz.

Na figura 4 é apresentado o perfil de extração do ferro. Verifica-se diferença nos teores extraídos de cada lote, alterando significativamente o perfil em relação aos lotes, com redução do extrato 3 e aumento no extrato 1 para o 2º lote. Ao se avaliar o tempo de armazenamento, fica caracterizado que os compostos associados a este metal, nesta matriz, se mantém estáveis durante o envelhecimento.

O extrator de maior eficiência é o 2, caracterizando a fração carbonácea e apresentando teor similar à fração residual no lote 1, mas para o lote 2, a fração residual é o dobro do teor extraído pelo extrator 2.

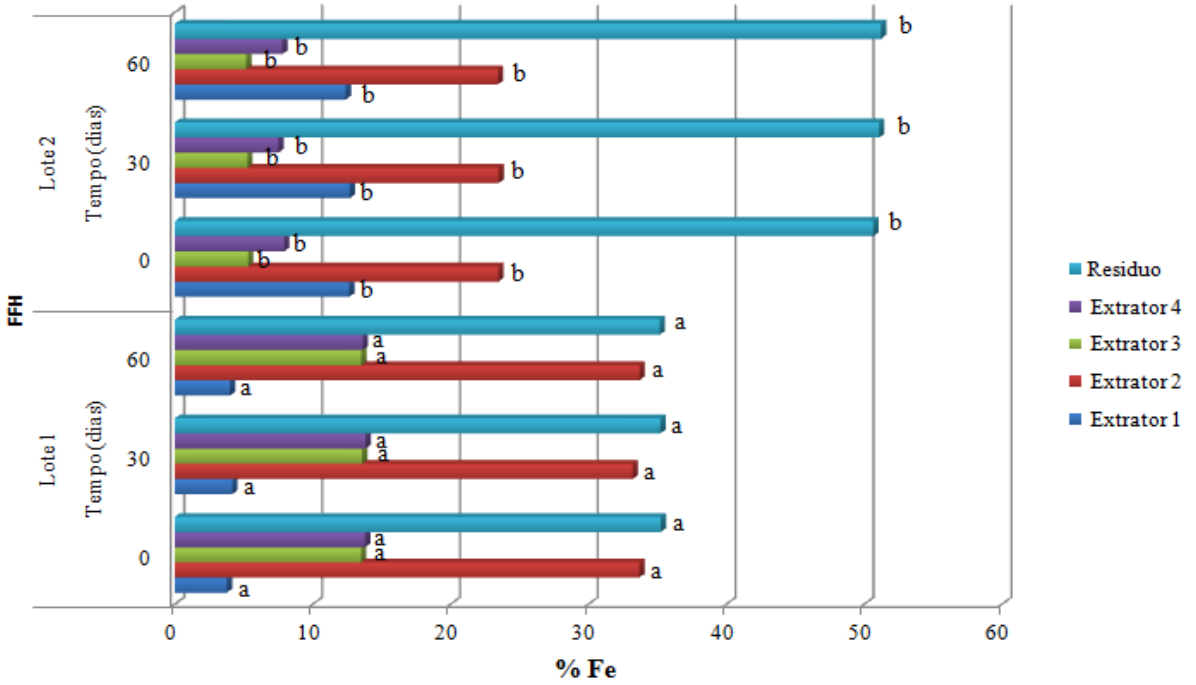

Figura 4 – Perfil de extração do Ferro (%) nos lotes 1 e 2 da FFH durante armazenamento por até 60 dias (N = 3).
Barras horizontais indicam % de cada extrator e do resíduo. Barras horizontais de mesma cor seguidas pela mesma letra não apresentam diferença significativa ($p \geq 0,05$).

Segundo Robb, Williams e McWeeny (1986), várias espécies de ferro podem ser formadas a pH 7,0, porém, a espécie Fe^{+2} é mais encontrada em pH 2,0 do que pH 7,0. Considerando que a extração sequencial aplicada neste estudo começa com um extrator em torno de pH 7,0, e, à medida que se aplicam os demais extratores este pH é reduzido, pode-se concluir que, o último extrator (HCl 0,5M) com pH em torno de 2,0, consegue extrair espécies de Fe^{+2}, que provavelmente também se fazem presente na fração residual.

Silva et al. (2010), avaliando a casca do fruto e das folhas de *Caesalpinia ferrea* Martius como suplemento nutricional de ferro, pelo método de extração sequencial, evidenciou que, tanto na casca do fruto quanto nas folhas, o extrator de maior eficiência foi o

extrator 1 (NaOH 0,05M), representando a fração trocável, diferente do observado neste estudo.

A figura 5 representa o perfil de extração do manganês. Há diferença tanto nos teores extraídos por cada lote, como também no perfil de extração, onde o lote 1 tem o extrator 1 como mais eficiente, 5% acima da fração residual; já o lote 2 apresenta 15% a mais do metal na fração residual em comparação ao extrator 1. Ao analisar o tempo de armazenamento para o lote 2, é visto alteração no perfil influenciado pelo extrator 3 e fração residual. No caso do lote 1, apenas a fração carbonácea (extrator 2) é influenciada.

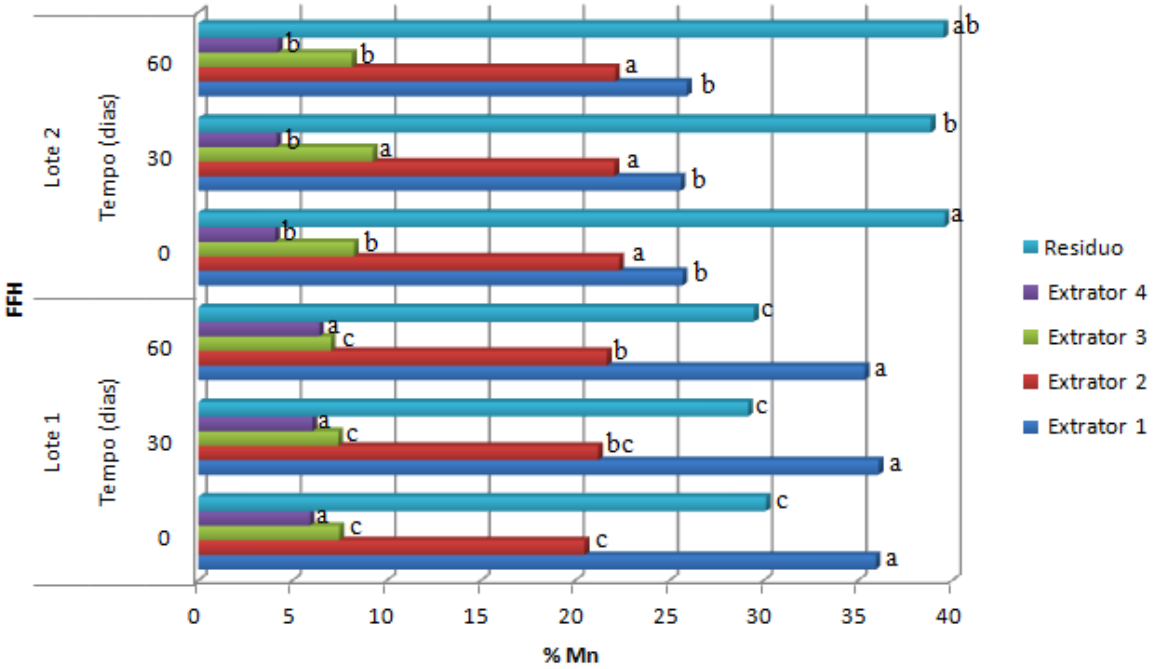

Figura 5 – Perfil de extração do Manganês (%) nos lotes 1 e 2 da FFH durante armazenamento por até 60 dias (N = 3).
Barras horizontais indicam % de cada extrator e do resíduo. Barras horizontais de mesma cor seguidas pela mesma letra não apresentam diferença significativa ($p \geq 0,05$).

Wuilloud, Kannamkumarath e Caruso (2004) realizaram extração de nozes com NaOH 0,05M, fração trocável, obtendo 95% de extração de manganês e concluindo que este extrator consegue extrair elementos de alto e baixo peso molecular. O NaOH, assim como o $CaCl_2$ pode ser utilizado para fração trocável. Neste estudo, a fração trocável ($CaCl_2$) não promove extração nem de 50% do teor total deste metal, corroborando quanto a singularidade da matriz e também a especificidade na escolha dos extratores.

Na figura 6 é apresentado o perfil de extração do zinco. Há diferença entre os teores extraídos pelos diferentes lotes, mas o perfil de extração é similar, sendo o extrator 1 (fração trocável) o de maior eficiência, seguido do extrator 2. Estas frações representam mais de 55%

do teor total deste metal, para ambos os lotes.

Há influência no perfil de extração quanto ao tempo de armazenamento, influenciando todas as frações no lote 2; no lote 1 apenas a fração oxidável/orgânica (4) não altera.

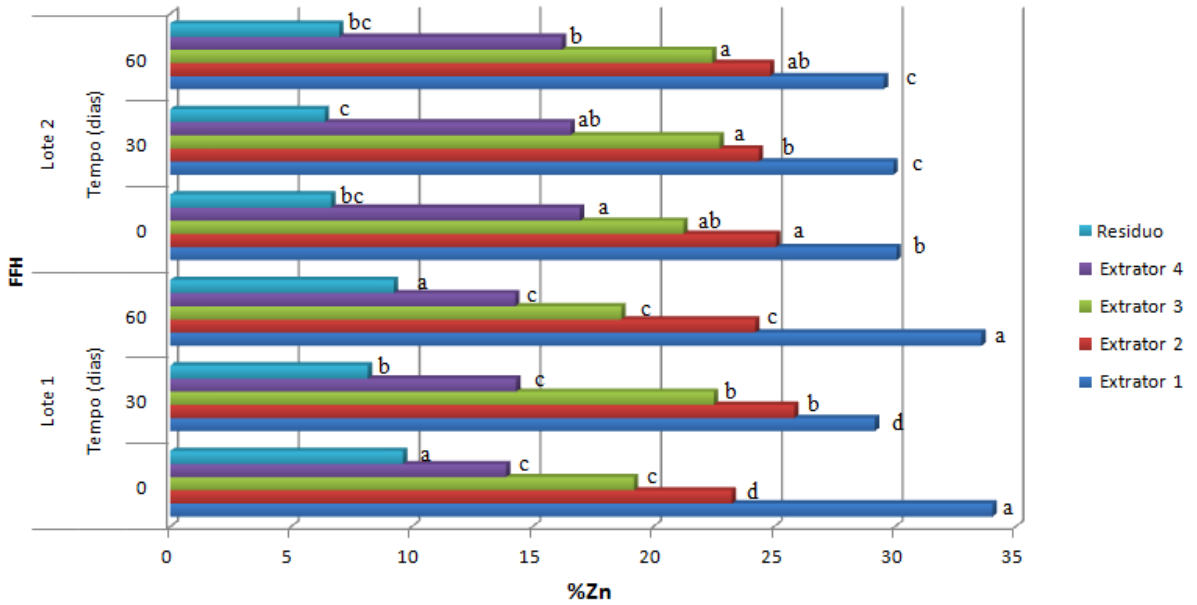

Figura 6 – Perfil de extração do Zinco (%) nos lotes 1 e 2 da FFH durante armazenamento por até 60 dias (N = 3).
Barras horizontais indicam % de cada extrator e do resíduo. Barras horizontais de mesma cor seguidas pela mesma letra não apresentam diferença significativa ($p \geq 0,05$).

Andrade, Teodoro e Takase (2005), avaliaram a extração sequencial deste metal em diversos tipos de hortaliças A e B e o extrator com maior eficiência para a maioria das amostras foi o extrator 1 ($CaCl_2$ 1M), extraindo em média 20% do teor total do metal. Neste estudo, este extrator também é o mais eficiente, extraindo na ordem de 30%.

Interessante observar que a FFH é um resíduo de espécies de frutas e hortaliças processadas, podendo sugerir que tanto o processamento quanto a combinação de diversas amostras influenciam nas formas químicas deste metal.

Na figura 7 é apresentado o perfil de extração do magnésio. De forma similar ao zinco, os teores de magnésio extraídos são diferentes entre os lotes, mantendo o mesmo perfil de extração e tendo como extrator de maior eficiência o extrator 1, em média 50%, representando a fração trocável. O armazenamento não influenciou no perfil deste metal na matriz estudada, similar ao comportamento do ferro.

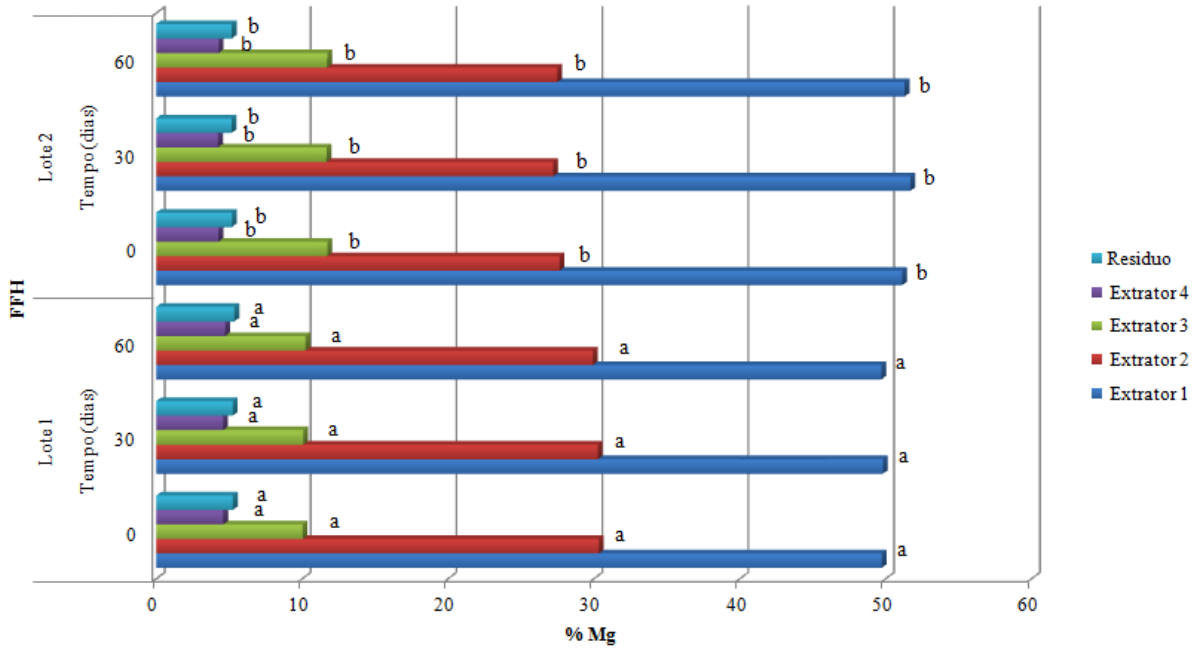

Figura 7 – Perfil de extração do Magnésio (%) nos lotes 1 e 2 da FFH durante armazenamento por até 60 dias (N = 3).
Barras horizontais indicam % de cada extrator e do resíduo. Barras horizontais de mesma cor seguidas pela mesma letra não apresentam diferença significativa ($p \geq 0,05$).

Apesar dos poucos estudos com relação a especiação química e os alimentos, as publicações já existentes relatam muito sobre elementos-traço, sendo poucos os estudos relacionados com macrominerais, como o magnésio. Spunzar et al. (1999), preparou um extrato com amostras de maçã e cenoura, centrifugando estas em solução aquosa preservada com antioxidante e antimicrobiano, extraindo 99% de magnésio. Houve ação de forças de cisalhamento (13000 rpm), o que favorece a extração. Neste presente estudo, a extração foi feita sem nenhuma força e ainda assim foi extraído mais de 95% do metal. Comparando com os demais metais analisados, este foi o de maior eficiência no processo, o que sugere menor grau de interação com a matriz.

5.3.3. Recuperação dos metais em estudo após extração sequencial

Foi feita a análise da recuperação dos metais Cu, Fe, Mn, Mg e Zn após o processo de extração sequencial dos lotes de FFH armazenados por até 60 dias (tabela 9). Para o cobre, lote 1, nos tempos 0 e 30 dias, observou-se recuperação na ordem de 90%; nas demais amostras 100%. O ferro apresentou para todas as amostras, no mínimo, 84% e máximo 92% de recuperação. O manganês, para o lote 1 (30 e 60 dias), apresentou 100% de recuperação; nas demais amostras, no mínimo, 96%. O magnésio, no tempo de 30 dias, ambos os lotes

apresentaram 100% de recuperação; nas demais amostras, no mínimo, 93%. O zinco, com exceção do lote 2 (30 e 60 dias) apresentou, no mínimo, 95% de recuperação; nas demais 100%. As perdas durante o processo de extração sequencial em amostras sólidas é um fato (QUEVAUVILLER; MAIER; GRIEPNK, 1996), mas acredita-se que neste presente estudo, as perdas não interfereriram de forma relevante nas interpretações dos dados obtidos.

Tabela 9 – Recuperação dos metais Cu, Fe, Mn, Mg e Zn após extração sequencial de dois lotes de FFH armazenados por até 60 dias (N = 3).

Elementos	Tratamentos	Tempo de armazenamento (Dias)					
		0		30		60	
		FFH 1	FFH 2	FFH 1	FFH 2	FFH 1	FFH 2
Cobre	Teor total (mg%)	1,06 ± 0,02	0,80 ± 0,00	1,07 ± 0,00	0,80 ± 0,00	1,08 ± 0,00	0,79 ± 0,00
	Total extraído (mg%)	0,96 ± 0,05	0,78 ± 0,03	0,93 ± 0,04	0,77 ± 0,03	0,98 ± 0,04	0,74 ± 0,04
	Valor de p	0,0264	0,3478	0,0254	0,2213	0,0671	0,1775
Ferro	Teor total (mg%)	5,25 ± 0,02	5,81 ± 0,01	5,24 ± 0,03	5,81 ± 0,02	5,25 ± 0,02	5,83 ± 0,01
	Total extraído (mg%)	4,39 ± 0,05	5,36 ± 0,04	4,40 ± 0,05	5,34 ± 0,07	4,42 ± 0,07	5,30 ± 0,02
	Valor de p	0,0000	0,0032	0,0000	0,0003	0,0028	0,0000
Manganês	Teor total (mg%)	2,48 ± 0,01	2,74 ± 0,01	2,48 ± 0,01	2,73 ± 0,01	2,48 ± 0,01	2,73 ± 0,01
	Total extraído (mg%)	2,41 ± 0,03	2,66 ± 0,03	2,41 ± 0,05	2,62 ± 0,03	2,45 ± 0,05	2,61 ± 0,01
	Valor de p	0,0833	0,0127	0,0997	0,0317	0,3670	0,0000
Magnésio	Teor total (mg%)	58,52 ± 0,02	50,04 ± 0,01	58,07 ± 0,32	50,05 ± 0,02	58,44 ± 0,41	50,05 ± 0,03
	Total extraído (mg%)	54,01 ± 0,45	48,25 ± 0,12	54,57 ± 1,94	48,57 ± 0,80	53,38 ± 0,20	48,26 ± 0,59
	Valor de p	0,0033	0,0014	0,0914	0,0832	0,0000	0,0349
Zinco	Teor total (mg%)	2,29 ± 0,01	2,53 ± 0,01	2,33 ± 0,01	2,52 ± 0,01	2,29 ± 0,00	2,52 ± 0,01
	Total extraído (mg%)	2,25 ± 0,03	2,46 ± 0,04	2,26 ± 0,06	2,39 ± 0,03	2,29 ± 0,04	2,42 ± 0,03
	Valor de p	0,1106	0,1000	0,1471	0,0183	0,9771	0,0308

Valores representados por média ± desvio padrão (n=3). Para cada elemento, a comparação entre os tratamentos seguidos por valores de $p \geq 0,05$ não apresentam diferença significativa.

5.3.4. Influência do armazenamento na estrutura química da FFH

A microscopia eletrônica tem como objetivo analisar os tamanhos e formas de estruturas cristalinas e amorfas; inorgânicas e biológicas de uma amostra. Na figura 8 é apresentada a microscopia eletrônica de varredura (MEV) da FFH nos tempos 0 e 60 dias de armazenamento e seus respectivos resíduos pós extração sequencial.

Partículas de tamanhos diferentes em farinhas caracterizam a degradação da matriz molecular; estruturas granulares e estruturas em forma de lentilhas representam a fração de amido e fração proteica, respectivamente (ROMAN-GUTIERREZ, GUILBERT; CUQ, 2002). Sabe-se que a FFH é rica em polissacarídeos e possui alto teor de proteínas, sendo assim, na figura 8A observam-se partículas de diferentes tamanhos e estruturas com formas circulares e de lentilha que sugerem caracterização de polissacarídeos e matriz proteica. Ao comparar com a figura 8B, verifica-se que após o armazenamento, há uma degradação da estrutura química da matriz. Esta mudança não influencia no teor total do minerais, o que era esperado. Ferreira et al. (2013) observaram estabilidade química e microbiológica da FFH armazenadas por até 90 dias nas mesmas condições do presente estudo. A alteração na estrutura da matriz promove modificação no perfil de extração do zinco durante o armazenamento, conforme já discutido anteriormente.

O teor de umidade da amostra em estudo é na ordem de 4% (FERREIRA et al. 2013). Amostras similares apresentam atividade de água em torno de 0,4 (FERREIRA; PENA, 2010; JÚNIOR, 2010), assim há pouca mobilidade molecular, promovendo alteração na estrutura influenciando no perfil de extração.

Durante a extração sequencial, foram adicionados extratores com propriedades químicas distintas, que promovem uma alteração na interação intermolecular dos diversos compostos químicos que constituem a matriz estudada (FFH). As demais imagens apresentadas na figura 8 (C, D, E, F G, H I e J) exibem a FFH após o processo de extração sequencial, no qual a amostra ficou em contato com cada extrator durante 1 hora. Este contato permitiu a hidratação da matriz molecular, interferindo no grau de degradação da mesma (ROMAN-GUTIERREZ, GUILBERT; CUQ, 2002). A falta de especificidade da estrutura molecular que é vista tanto na sequência da extração sequencial como pela influência do tempo de armazenamento, demonstram alteração na interação química da matriz. Observa-se formação de fase contínua das partículas da matriz a partir da aplicação do 2º extrator, provavelmente formado por compostos solúveis nos extratores que ficam aderidos à superfície da amostra.

Influência significativa do armazenamento é observada nos extratos 1 e 4 para o zinco, corroborando com as imagens da degradação da matriz, perceptivelmente visíveis, após 60 dias de armazenamento (figuras 8I e 8J). O comportamento diferenciado dos minerais analisados mostram que fatores diversos influenciam nas interações entre estes e a matriz, pois o zinco apresentou diferença no perfil de extração com o tempo de armazenamento, mas não quando comparados os lotes. Ao contrário, o cobre, ferro e manganês apresentaram diferença nos perfis de extração entre os lotes, mas não houve a influência do armazenamento. Para o magnésio, o perfil de extração não sofre influência do tempo de armazenamento ou entre os lotes.

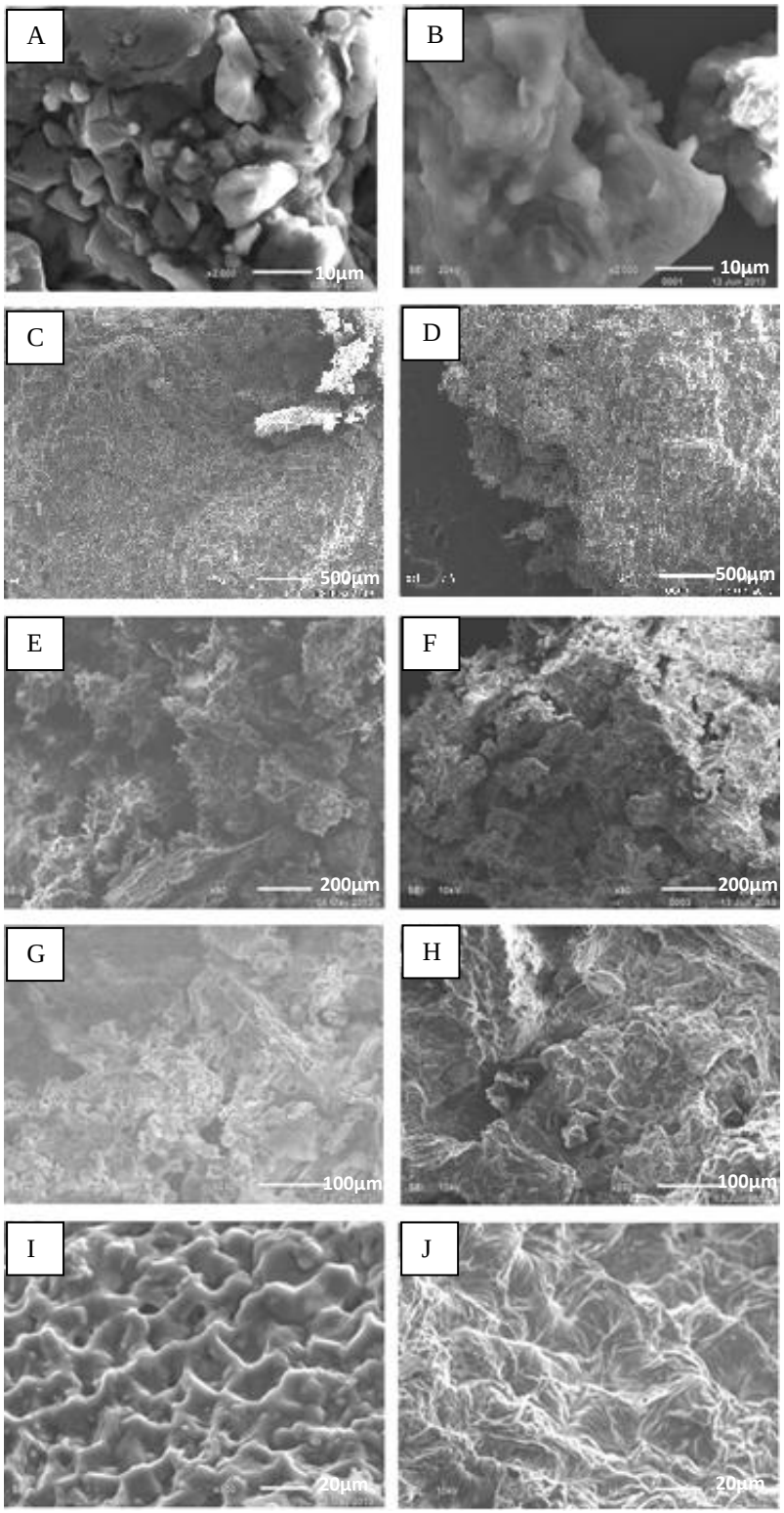

Figura 8 – Microscopia da FFH entre os tempos de armazenamento 0 e 60 dias.
Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da FFH e seus resíduos após extração sequencial. (A) FFH tempo 0, ampliação 2000x; (B) FFH tempo 60, ampliação 2000x. Resíduo de FFH após extração sequencial: (C) tempo 0 após extrator 1 ($CaCl_2$), ampliação 37x; (D) tempo 60 após extrator 1 ($CaCl_2$), ampliação 37x; (E) tempo 0 após extrator 2 (CH3COOH 0,1M/ CH3COONH4 5% [pH = 5,0]), ampliação 90x; (F) tempo 60 após extrator 2 (CH3COOH 0,1M/ CH3COONH4 5% [pH = 5,0]), ampliação 90x; (G) tempo 0 após extrator 3 (CH3COOH 0,5M), ampliação 230x; (H) tempo 60 após extrator 3 (CH3COOH 0,5M), ampliação 230x; (I) FFH tempo 0 após extrator 4 (HCl 0,5 M), ampliação 800x; (J) tempo 60 após extrator 4 (HCl 0,5 M), ampliação 800x.

6. CONCLUSÃO

A análise de especiação química em alguns micronutrientes e elementos-traço nos alimentos é de grande importância para a saúde humana, mas é um desafio para os pesquisadores e também para a química. As baixas concentrações destes elementos nos alimentos, comportamento químico complexo e a instabilidade das espécies são as razões por não existirem muitos estudos nesta área. Como a matriz alimentar e os procedimentos de extração sequencial nos alimentos são bem variados, é possível observar a diversidade das interações químicas entre as espécies.

Neste estudo, foi observado que todos os metais estão no mínimo em 5 espécies químicas distintas na matriz, a extraída em cada um dos meios extratores (1, 2, 3 e 4) e a fração residual. O extrator 1, que representa a fração trocável foi de maior eficiência para o manganês, magnésio e zinco. O extrator 2, fração carbonácea foi o mais eficiente na extração de ferro e cobre. Com exceção dos metais magnésio e zinco, os demais apresentaram teor significativo na fração residual.

A estrutura química da matriz foi degradada com o armazenamento influenciando no perfil de extração do zinco, que também alterou entre os lotes. Foram observadas alterações no perfil de extração para os metais cobre, ferro e manganês quando avaliados os lotes, não sendo influenciado no tempo de armazenamento. O magnésio não alterou o perfil de extração com os parâmetros analisados: lote e armazenamento.

Sabe-se que não há um protocolo geral para a extração sequencial em alimentos e por isso deve-se levar sempre em conta a natureza da amostra. Estudos sobre mecanismos de extração sequencial nos alimentos devem ser incentivados para fornecer uma melhor compreensão da especiação dos metais no interior da matriz, bem como a biodisponibilidade e mobilidade dos mesmos, que podem auxiliar em estudos clínicos e tecnológicos.

Estimular a investigação das frações aqui obtidas com aplicação de tecnologias como cromatografia e espectrometria de massa possibilitará maior conhecimento da especiação química destes metais nesta matriz.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOLLINO, O.; MALANDRINO, M.; GIACOMINO, A.; MENTASTI, E. The role of chemometrics in single and sequential extraction assays: A review: Part I. Extraction procedures, uni-and bivariate techniques and multivariate variable reduction techniques for pattern recognition. **Analytica Chimica Acta**, Netherlands, v. 688, n. 2, p. 104 – 121, jan., 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Portaria n º 27 - Regulamento Técnico referente à Informação Nutricional Complementar**. Brasília, 13 de janeiro de 1998.

AHNSTROM, Z. A. S.; PARKER, D. R. Cadmium reactivity in metal-contaminated soils using a coupled stable isotope dilution-sequential extraction procedure. **Environmental science & technology**, United States, v. 35, n. 1, p. 121 – 126, nov., 2001.

ALVES, F. M. S.; MACHADO, A. V.; QUEIROGA, K. H. Alimentos produzidos a partir de farinha de caju, obtida por secagem. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Mossoró, v. 6, n. 3, p. 131-138, jul./set., 2011.

AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS (AACC*)*. ***Approved Methods of the American* Associatioon of *Cereal Chemists***. 9 ed. St. Paul, Minnesota: The Association, 1995.

ANDERSON, J. J. B. Minerais. In: MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. **Krause: alimentos, nutrição & dietoterapia**. 11 ed. São Paulo: Roca, 2005. cap.5. p.115-153.

ANDRADE, E. C. B.; ALVES, S. P. TAKASE, I. Extração sequencial de cobre, ferro e zinco em ervas medicinais**. Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 844 – 848, out./dez., 2005.

ANDRADE, E. C. B.; BARROS, A. M.; TAKASE, I. Determinação dos teores de cobre e zinco em alimentos. **Revista Higiene Alimentar**, Campinas, v. 17, n. 107, p. 103-106, set./dez., 2003.

ANDRADE, E. C. B., TAKASE, I. Avaliação do uso de ervas medicinais como suplemento nutricional de ferro, cobre e zinco. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 3, p. 591-596, jul./set., 2005.

ANDRADE, E. C. B; TEODORO, A. J.; TAKASE, I. Determinação dos teores de zinco em diferentes extratos de hortaliças dos tipos A e B. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 2, p. 591-596, abr./jun., 2005.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 17 ed., Gaithersburg, USA: Association of Analytical Communities, 2000.

ARUNACHALAM, J.; EMONS, H.; KRASNODEBSKA, B.; MOHL, C. Sequential extraction studies on homogenized forest soil samples. **Science of the total environment**, Netherlands, v. 181, n. 2, p. 147 – 159, mar., 1996.

ASCHNER, M.; VRANA, K. E.; ZHENG, W. Manganese uptake and distribution in the central nervous system (CNS). **Neurotoxicology**, United States, v. 20, n. 2-3, p. 173-180, 1999.

AYALA-ZAVALA, J. F.; ROSAS-DOMÍNGUEZ, C.; VEGA-VEGA, V., GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. Antioxidant enrichment and antimicrobial protection of fresh-cut fruits using their own by-products: Looking for integral exploitation. **Journal of Food Science**, United States, v. 75, n.8, p. 175-181, set., 2010.

BACON, J. R.; DAVIDSON, C. M. Is there a future for sequential chemical extraction?. **Analyst**, United Kingdom, v. 133, p. 25-46, set., 2008.

BARAN, J. E. **Química Bioinorgânica**. Madrid: McGraw-Hill Interamericana de Espanha, S. A., 1995.

BARRA, C. M.; SANTELLI, R. E.; ABRÃO, J. J.; LA GUARDIA, M. Especiação de Arsênio - Uma Revisão. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, p. 58 – 70, abr., 2000.

BLALOCK, T. L.; DUNN, M. A.; COUSINS, R. J. Metallothionein gene expression in rats: tissue-specific regulation by dietary copper and zinc**. The Journal of nutrition**, United States, v. 118, n. 2, p. 222-228, fev., 1988.

BOMBACH, G; PIERRA, A.; KLEMM, W. Arsenic in contaminated soil and river sediment. **Fresenius' journal of analytical chemistry**, Germany, v. 350, n. 1, p. 49-53, jan., 1994.

BORDAS, F.; BOURG, A. C. M. A critical evaluation of sample pretreatment for storage of contamined sediments to be investigated for the potential mobility of their heavy metal load**. Water, Air & Soil Pollution**, Netherlands, v.103, n. 1, p. 137 – 149, 1998.

BOUYSSIERE, B.; SZPUNAR, J.; POTIN-GAUTIER, M.; LOBIN´ SKI, R. In: R. CORNELIS, R. (Ed.). **Handbook of Elemental Speciation: Techniques and Methodology**, West Sussex: Wiley, 2003.

BREMNER, I.; BEATTIE, J. H. Copper and zinc metabolism in health and disease: speciation and interactions. **Proceedings of the Nutrition Society**, Republic of Ireland, v. 54, n. 2, p. 489-500, jul., 1995.

CAMPOS, R. C.; GRINBERG, P. Acoplamento Cromatografia Gasosa – Espectrometria de Absorção Atômica em Estudos de Especiação: Uma Revisão. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, p.220 – 227, ago., 2001.

CARVALHO, M. G. **Barras de cereais com amêndoas de chichá, sapucaia e castanha-do-gurguéia, complementadas com casca de abacaxi**. 2008. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

CAVALCANTI, M. A.; SELVAM, M. M.; VIEIRA, R. R. M.; COLOMBO, C. R.; QUEIROZ, V. T. M. Pesquisa e desenvolvimento de produtos usando resíduos de frutas regionais: Inovação e integração no mercado competitivo. In: **XXX Encontro Nacional de Engenharia de Produção**, São Carlos – SP, 2010.

CERVERA, M. L.; MONTORO, R. Critical review of the atomic spectrometric analysis of arsenic in foods. **Fresenius' journal of analytical chemistry**, Germany, v. 348, n. 5, p. 331-340, set., 1994.

CHLOPECKA, A.; BACON, J. R.; WILSON, M. J.; KAY, J.Forms of cadmium, lead, and zinc in contaminated soils from southwest Poland. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 25, n. 1, p. 69-79, jan. 1996.

COSTA, J. M. C.; FELIPE, E. M. F.; MAIA, G. A.; BRASIL, I. M.; HERNANDEZ, F. F. H. Comparação dos parâmetros físico-químicos e químicos de pós-alimentícios obtidos de resíduos de abacaxi. **Revista Ciência Agronômica**, Ceará, v. 38, n. 2, p. 228 – 232, fev., 2007.

COUTINHO, R. **Noções de Fisiologia da Nutrição**. 2 ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1981.

COUZY, F., KEEN, C., GERSHWIN, M. E., MARESCHI,J.P. Nutritional implications of the interactions between minerals. **Progress in Food and Nutrition Science**, Oxford, v.17, p.65-87, 1993.

COZZOLINO, S. M. F. Biodisponibilidade de minerais. **Revista de Nutrição da PUCCAMP**, Campinas, v. 10, n. 2, p. 87 – 98, jul./dez., 1997.

CRISOSTO, C.H.; JOHNSON, R.S.; DEJONG, T. Orchard factors affecting post harvest stone fruit quality. **HortScience**, Alexandria, v. 32, n. 5, p. 820-823, ago., 1997

DAS, K. B.; CHAKRABORTY, R.; CERVERA, M. L.; DE LA GUARDIA, M. Metal speciation in solid matrices. **Talanta**, Netherlands, v. 42, n. 8, p. 1007-1030, fev., 1995.

DEMAN, J.M. **Principles of Food Chemistry**. Gaithersburg: Aspen Publishers, 1999.

DUTRA DE OLIVEIRA, J. F.; MARCHINI, J. S. **Ciências Nutricionais**. São Paulo: Sarvier, 1998**.**

EBDON, L.; PITTS, R.; CORNELIS, H.; CREWS, O.; DONARD, P. **Trace Element Speciation for Environment, Food and Health**. Quevauvilier: Royal Society of Chemistry, 2001.

EKHOLM, P.; REINIVUO, H; MATTILA, P.; PAKKALA, H.; KOPONEN, J.; HAPPONEN, A.; HELLSTRO, J.; OVASKAINEN, M. Changes in the mineral and trace element contents of cereals, fruits and vegetables in Finland. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p. 487 – 495, 2007.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Global food losses and food waste. Study conducted for the International Congress Save Food at Interpack**. Germany, 2011.

FENNEMA, O., R.; PARKIN, K. L.; DAMODARAN, S. **Química dos alimentos**. 4 ed. Rio de Janeiro: Artmed, 2010.

FERREIRA, M. F. P.; PENA, R. S. estudo da secagem da casca do maracujá amarelo. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.12, n.1, p.15-28, 2010.

FERREIRA, P. R. G.; SANTANA, G. P. Tratamento químico seletivo: Uma especiação operacional. **Scientia Amazonia**, Manaus, v. 1, n. 3, p. 40-48, 2012.

FERREIRA, M. S. L.; SANTOS, M. C. P.; MORO, T. M. A. BASTO, G. J.; ANDRADE, R. M. S.; GONÇALVES, E. C. B. A. Formulation and characterization of functional foods based

on fruit and vegetable residue flour. **Journal of Food Science and Technology**, jun., 2013. DOI 10.1007/s13197-013-1061-4 (in press).

FLORENCE, T. M. The speciation of trace elements in water. **Talanta**, Netherlands, v. 29, p. 345 – 364, maio, 1982.

FUKAI, R.; HUYNH-NGOC, L. Chemical forms of zinc in sea water. **Journal of the Oceanographical Society of Japan,** Japan, v. 31, n. 5, p. 179 – 191, ago., 1975.

GARCÍA-BARRERA, T.; GÓMEZ-ARIZA, J. L.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, M.; MORENO, F.; GARCÍA-SEVILLANO, M. A.; GÓMEZ-JACINTO, V. Biological responses related to agonistic, antagonistic and synergistic interactions of chemical species. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Germany, v. 403, p. 2237-2253, fev., 2012.

GARMUS, T. T.; BEZERRA, J. R. M. V.; RIGO, M.; CÓRDOVA, K. R. V. Elaboração de biscoitos com adição de farinha de casca de batata (Solanum tuverosum L.). **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, Ponta Grossa, v. 3, n. 2, p. 56-65, 2009.

GLEYZES, C.; TELLIER, S.; ASTRUC, M. Fractionation studies of trace elements in contaminated soils and sediments: a review of sequential extraction procedures. **Trends in Analytical Chemistry**, Netherlands, v. 21, n. 6, p. 451-467, 2002.

GONDIM, J.A.M.; MOURA, M. F. V.; DANTAS, A. S.; MEDEIROS, R. L. S.; SANTOS, K. M. Composição centesimal e de minerais em cascas de frutas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 825-827, abr./jun., 2005.

GUSTAVSSON, J.; CEDERBERG, C.; SONESSON, U.; OTTERDIJK, V. R.; MEYBECK, A. Global food losses and food waste: Extent, causes and prevention. **Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)**, Rome, 2011.

HALL, A. C.; YOUNG, B. W.; BREMNER, I. Intestinal metallothionein and the mutual antagonism between copper and zinc in the rat. **Journal of inorganic biochemistry**, United States, v. 11, p. 57-66, 1979.

HALL, G. E. M.; GAUTHIER, G.; PELCHAT, J. C.; PELCHAT, P.; VAIVE, J. E. Application of a sequential extraction scheme to ten geological certified reference materials for the determination of 20 elements. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, United Kingdom, v. 11, n. 9, p. 787 – 796, set., 1996.

HEMERY, Y., ROUAU, X., LULLIEN-PELLERIN, V., BARRON, C.; ABECASSIS, J. Dry processes to develop wheat fractions and products with enhanced nutritional quality. **Journal of Cereal Science**, United States, v. 46, n. 3, p. 327-347, nov., 2007.

HIRNER, A. V; KRITSOTAKIS, K; TOBSCHALL, J. Metal-organic associations in sediments - I. Comparison of unpolluted recent sediments and sediments affected by anthropogenic pollution. **Applied Geochemistry**, Netherlands, v. 5, p. 491 – 505, jul./ago., 1990.

HOWARD, J. L.; VANDENBRINK, W. J. Sequential extraction analysis of heavy metals in sediments of variable composition using nitrilotriacetic acid to counteract resorption. **Environmental Pollution**, Netherlands, v. 106, n. 3, p. 285-292, set., 1999.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Indicadores agropecuários 1996-2003**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2002 – 2003**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2004.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Minerais e contaminantes inorgânicos. In: **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, IV edição, p. 1020, 2008.

JAIME, P. C.; FIGUEIREDO, I. C. R.; DE MOURA, E. C.; MALTA, D. C. Fatores associados ao consumo de frutas e hortaliças no Brasil, 2006. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 43, Supl. 2, p. 57-64, ago., 2009.

JAIN, C. K. Metal fractionation study on bed sediments of River Yamuna, India. **Water Research**, United States, v. 38, n. 3, p. 569-578, out., 2004.

JÚNIOR, N. M. V. **Farinha de banana madura - processo de produção e aplicações**. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, Bahia, 2010.

JÚNIOR, C, J.; SIDONIO, L.; DE MORAES, V. E. Fruticultura: convergências e divergências. Fruticultura, **BNDES Setorial**, v. 32, p. 371 – 396, 2010.

KERSTEN, M.; FORSTNER, U. Chemical fractionation of heavy metals in anoxic estuarine and coastal sediments. **Water Science Technology**, Poland, v. 18, p. 121 – 130, 1986.

KHOUZAM, R. B.; SZPUNAR, J.; HOLEMAN, M.; LOBINSKI, R. Trace element speciation in food: State of the art of analytical techniques and methods. **Pure Applied Chemistry**, United States, v. 84, n. 2, p. 169-179, jan., 2012.

KOT, A.; NAMIES´NIK, J. The role of speciation in analytical chemistry. **Trends in Analytical Chemistry**, Netherlands, v. 19, n. 2, p. 69-79, fev./mar., 2000.

KRISHNAMURTI, G. S. R. HUANG, P. M.; VAN REES, K. C. J.; KOZAK, L. M.; ROSTAD, H. P. W. A new soil test method for the determination of plant-available cadmium in soils. **Communications in Soil Science & Plant Analysis**, United Kigdom, v. 16, n. 17-18, p. 2857 – 2867, nov., 1995.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2 ed. São Paulo: Sarvier, 1998.

LI, X.; SHEN, Z.; WAI, O. W.; LI, YOK-SHEUNG. Chemical forms of Pb, Zn and Cu in the sediment profiles of the Pearl River Estuary. **Marine Pollution Bulletin**, Netherlands, v.42, n. 3, p. 215 – 223, mar., 2001.

MARIN, B.; VALLADON, M.; POLVE, M.; MONACO, A. Reproducibility testing of a sequential extraction scheme for the determination of trace metal speciation in a marine reference sediment by inductively coupled plasma-mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, Netherlands, v. 342, n. 2, p. 91 – 112, abr., 1997.

MARTINS, C. R.; FARIAS, R. M. Produção de alimentos x desperdício: tipos, causas e como reduzir perdas na produção agrícola – revisão. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, Uruguaiana, v. 9, p. 20-32, 2007**.**

MARTINS, R. C.; CHIAPETTA, S. C.; PAULA, F.D.; GONÇALVES, E.C.B.A. Avaliação da vida de prateleira de bebida isotônica elaborada com suco concentrado de frutas e hortaliças congelado por 30 dias. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 22, n. 4, p.623-629, out./dez., 2011.

MAURO, A. K.; SILVA, V. L. M.; FREITAS, M. C. J. Caracterização física, química e sensorial de *cookies* confeccionados com Farinha de Talo de Couve (FTC) e Farinha de Talo de Espinafre (FTE) ricas em fibra alimentar. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 3, p. 719-728, jul./set., 2010.

MILLER**,** W. P.; McFEE, W. W. Distribution of cadmium, zinc, copper and lead in soils of industrial northwestern Indiana. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 12, p. 29 – 33, jan., 1983.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Contribuições das Câmaras Setoriais e Temáticas à Formulação de Políticas Públicas e Privadas para o Agronegócio**. Brasília: MAPA/SE/CGAC. 496 p, 2006.

NARWAL, R. P.; SINGH, B. R.; SALBU, B. Association of cadmium, zinc, copper, and nickel with components in naturally heavy metal-rich soils studied by parallel and sequential extractions. **Communications in Soil Science & Plant Analysis**, United Kingdom, v. 30, n. 7 – 8, p. 1209 – 1230, 1999.

PEDROSA, L.F.C., COZZOLINO, S.M.F. Efeito da suplementação com ferro na biodisponibilidade de zinco em uma dieta regional do nordeste do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 27, n. 4, p. 266-270, 1993.

PEREIRA, G. I. S.; PEREIRA, R. G. F. A.; BARCELOS, M. F. P.; MORAIS, A. R. Avaliação química da folha de cenoura visando o seu aproveitamento na alimentação humana. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 4, p. 852-857, jul./ago., 2003.

PEREZ, P. M. P.; GERMANI, R. Elaboração de biscoitos tipo salgado, com alto teor de fibra alimentar, utilizando farinha de berinjela (*Solanum melongena, L*.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, p. 186-192, jan./mar., 2007.

PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; ANDRADE, A. M. R.; FRAGA, S. L. P.; TEIXEIRA, R. B. **Fermentação em estado sólido: uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais**. Embrapa Agroindústria Tropical, Comunicado Técnico 102, 5p, 2005.

QUEVAUVILLER, P.; MAIER, E. A.; GRIEPNK, B. Quality control of results of speciation analysis In: CAROLI, S. **Element Speciation in Bioinorganic Chemistry**. New York: Wiley, p. 195 – 222, 1996.

RAO, C. R. M.; SAHUQUILLO, A.; LOPEZ SANCHEZ, J. F. A review of the different methods applied in environmental geochemistry for single and sequential extraction of trace elements in soils and related materials. **Water Air & Soil Pollution**, Germany, v. 189, p. 291-333, jan., 2008.

RAYMAN, M. P. The use of high-selenium yeast to raise selenium status: how does it measure up?. **British Journal of Nutrition**, United States, v. 92, n. 4, p. 557 – 574, jun., 2004.

REIS, N. T. **Nutrição Clínica: Sistema Digestório**. Rio de Janeiro: Rubio, 2003.

ROBB; P.; WILLIAMS, D. R.; McWEENY, D. J. Predicted Chemical Speciation of Essential Metals in Digested Food. **Inorganica Chimica Acta**, Netherlands, v. 125, p. 207 – 212, abril, 1986.

ROMAN-GUTIERREZ, A. D.; GUILBERT, S.; CUQ, B. Microstructural changes in wheat flour and flour components during hydration by using environmental scanning electron microscopy. **Lebensmittel Wissenschaft & Technologie**, v. 35, p. 730 – 740, ago., 2002.

RUZIK, L. Speciation of challenging elements in food by atomic spectrometry. **Talanta**, Netherlands, v. 93, p. 18-31, fev., 2012.

SANTANA, F. C.; SILVA, J. V.; SANTOS; A. J. A. O.; ALVES, A. R.; WARTHA, E. R. S. A.; MARCELLINI, P. S.; SILVA, M. A. A. P. Desenvolvimento de biscoito rico em fibras elaborado por substituição parcial da farinha de trigo por farinha da casca do maracujá amarelo (*Passiflora Edulis* Flavicarpa) e fécula de mandioca (*Manihot Esculenta* Crantz). **Alimentação e Nutrição**, Araraquara, v. 22, n. 3, p. 391-399, jul./set., 2011.

SANTOS, C. X. **Caracterização físico-química e análise da composição química da semente de goiaba oriunda de resíduos agroindustriais**. 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Bahia.

SANTOS, H. B.; MADRUGA, M. S.; BION, F. M.; ANTUNES, N. L. M.; MENDES, K.; ÀGUIDA, R. Estudos bioquímicos e hematológicos em ratos sobre biodisponibilidade de minerais numa dieta enriquecida com multimistura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 613-618, out./dez., 2004.

SANTOS, J. A. N.; COÊLHO, J. D.; CARNEIRO, W. M. A.; BRAINER, M. S. C. P.; SOUZA, G. S.; SILVA, C. H. G. **A agroindústria de alimentos de frutas e hortaliças no Nordeste e demais áreas de atuação do BNB: desempenho recente e possibilidades de políticas**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 2008.

SANZ-MEDEL, A. Trace element analytical speciation in biological systems: importance, challenges and trends. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, United Kingdom, v. 53, n. 2, p. 197-211, fev., 1998.

SCHRAUZER, G. N. Selenium yeast: composition, quality, analysis, and safety. **Pure and Applied chemistry**, United States, v. 78, p. 105 – 109, out., 2006.

SCHIEBER, A.; STINTZING, F. C.; CARLE, R. By-products of plant food processing as a source of functional compounds - recent developments. **Trends in Food Science & Technology**, Netherlands, v. 12, n. 11, p. 401-413, nov., 2001.

SHILS, M. E.; OLSON, J. A.; SHIKE, M. **Modern nutrition in health and disease**. 8 ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 1994.

SHUMAN, L. M; HARGROVE, W. L. Effect of tillage on the distribution of manganese, copper, iron, and zinc in soil fractions. **Soil Science Society of America Journal**, United States, v. 49, p. 1117 – 1121, set., 1985.

SILVA, J. J. R. F. **Introdução à Química da Vida**. Universidade Nova de Lisboa: FCT, Lisboa, 1985.

SILVA, C. S.; NUNES, P. O.; MESCOUTO, C. S. T.; MÜLLER, R. C. S.; PALHETA, D. C.; FERNANDES, K. G. Avaliação do uso da casca do fruto e das folhas de *Caesalpinia ferrea* Martius como suplemento nutricional de Fe, Mn e Zn. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 3, p. 751 – 754, jul./set., 2010.

SONESSON, U.; DAVIS, J.; ZIEGLER, F. Food production and emissions of greenhouse gases - An overview of the climate impact of different product groups. **Swedish Institute for Food and Biotechnology**. Sweden, SIK Report 802, 2010.

SOUSA, M. S. B., VIEIRA, L. M.; DA SILVA, M. J. M., DE LIMA, A. Nutritional characterization and antioxidant compounds in pulp residues of tropical fruits. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 3, p. 554-559, maio/jun., 2011.

SPOSITO, G.; LUND, L. J.; CHANG, A. C. Trace-metal chemistry in arid-zone field soils amended with sewage-sludge. I. Fractionation of Ni, Cu, Zn, Cd, and Pb in solid-phases. **Soil Science Society of America Journal**, United States, v.46, p. 260 – 264, mar., 1982.

SPUNZAR, J.; PELLERIN, P.; MAKAROV, A.; DOCO, T.; WILLIAMS, P.; LOBI´NSK, R. Speciation of metal-carbohydrate complexes in fruit and vegetable samples by size-exclusion HPLC-ICP-MS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, United Kingdom, v. 14, p. 639 – 644, jan., 1999.

STONE, M.; MARSALEK, J. Trace metal composition and speciation in street sediment: Sault Ste. Marie, Canada. **Water, Air & Soil Pollution**, Netherlands, v.87, p. 149 – 169, 1996.

SUN-WATERHOUSE, D. The development of fruit-based functional foods targeting the health and wellness market: a review. **International Journal of Food Science & Technology**,Oxford, v. 46, p. 899-920, jan., 2011.

SUTHERLAND, R. A.; TACK, F. M. G.; TOLOSA, C. A.; VERLOO, M. G. Operationally defined metal fractions in road deposited sediment, Honolulu, Hawaii. **Journal of environmental quality**, Madison, v. 29, n. 5, p. 1431-1439, out., 2000.

TESSIER, A.; CAMPBELL, P. G. C.; BISSON, M. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. **Analytical chemistry**, United States, v. 51, n. 7, p. 844-851, jun., 1979.

UCHOA, A. M. A.; DA COSTA, J. M. C.; MAIA, G. A.; SILVA, E. M. C. S.; CARVALHO, A. F. F. U.; MEIRA, T. R. Parâmetros Físico-Químicos, Teor de Fibra Bruta e Alimentar de Pós Alimentícios Obtidos de Resíduos de Frutas Tropicais. **Segurança Alimentar e Nutricional**, Campinas, v. 15, n. 2, p. 58-65, 2008.

URE, A. M. Trace element speciation in soils, soil extracts and solutions. **Microchimica Acta**, Austria, v. 104, p. 49 – 57, 1991.

URE, A. M.; DAVIDSON, C. M**. Chemical Speciation in the Environment.** 2 ed. University of Strathdyde, Glasgow: Blackwell Science, 2001.

VILELA, N. J.; HENZ, G. P. Situação atual da participação das hortaliças no agronegócio brasileiro e perspectivas futuras. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasilia, v. 17, p. 71-89, jan./abr., 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases**. Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation. Geneva, 2002. (WHO Technical Report Series, 916).

WUILLOUD, R. G.; KANNAMKUMARATH, S. S. CARUSO, J. A. Speciation of nickel, copper, zinc, and manganese in different edible nuts: a comparative study of molecular size distribution by SEC–UV–ICP–MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Germany, v. 379, p. 495 – 503, mar., 2004.

YADRICK, M. K.; KENNEY, M. A.; WINTERFELDT, E. A. Iron, copper, and zinc status: response to supplementation with zinc or zinc and iron in adult females. **The American journal of clinical nutrition**, United States, v. 49, p. 145-150, jan., 1989.

YAO, Z.; GAO, P. Heavy metal research in lacustrine sediment: a review. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, China, v. 25, n. 4, p. 444 - 454, out., 2007.

ZANATTA, C. L.; SCHLABITZ, C.; ETHUR, E. M. Avaliação físico-química e microbiológica de farinhas obtidas a partir de vegetais não conformes à comercialização. **Alimentação e Nutrição**, Araraquara, v. 21, n. 3, p. 459-468, jul./set., 2010.