



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA



Programa de Pós-Graduação em Química

**PROCEDIMENTOS E AVALIAÇÃO QUÍMICA DE
PARÂMETROS DE INTERESSE
NUTRICIONAL DE ESPINAFRE
COMERCIALIZADO NA BAHIA**

SILVIA REGINA SANTOS ROCHA

Salvador, BA

2009

SILVIA REGINA SANTOS ROCHA

**PROCEDIMENTOS E AVALIAÇÃO QUÍMICA DE
PARÂMETROS DE INTERESSE
NUTRICIONAL DE ESPINAFRE
COMERCIALIZADO NA BAHIA**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da
Universidade Federal da Bahia para a obtenção do
título de Mestre em Ciências Naturais – Química.

ORIENTADOR: Prof. Dr. MAURO KORN

Salvador, BA

2009

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre comigo, por me iluminar me dando o dom da sabedoria nas decisões que precisei tomar, e por me carregar em seus braços nas horas em que mais precisei.

À minha mãe, Georgina, a mulher que mais admiro e que sempre trabalhou arduamente para dar estudo a seus filhos, e a quem devo tudo que sou, tenho e aprendi. E a meu irmão, Sidnei, para que ele possa chegar mais longe do que eu cheguei, pois sei que tem um grande potencial adormecido dentro dele.

À meu filho, Cauê e meu amor, Sivalnei, pelo carinho, amor, pela paciência, felicidade, pelos momentos difíceis compartilhados e constante incentivo.

Ao professor Dr. Mauro Korn que acreditou em mim e me ensinou, como, e por que é preciso que se faça aquilo que achamos que não podemos fazer. Muito obrigada pela orientação, amizade, confiança e pelo incentivo, você é um fofo.

A todos os amigos do curso de licenciatura em Química na UNEB, pela agradável convivência e pelo incentivo para que fizesse a seleção do mestrado, se não fosse por eles não estaria aqui, especialmente Jadson, Marcio, Lilian, Joelma, Robson, Mariana, Shirlei, George, Chico, amigos do peito.

Aos amigos do laboratório SONOFIA pelo incentivo, amizade, sugestões críticas, paciência e muitas risadas, principalmente aos queridos amigos Eduardo, Tiago, Adriana, Vitoria que muito me ajudou na etapa mais difícil, desse percurso e um agradecimento especial ao amigo Josué que foi quase um co-orientador no início do meu trabalho e com quem aprendi muito. Aos amigos dos outros laboratórios do prédio de química da UNEB pelas palavras amigas e pelo imenso carinho principalmente quando esperava Cauê.

À Universidade Federal da Bahia, em particular ao Instituto de Química pela oportunidade, aos funcionários Cristovão e Paulo pela imensa boa vontade que sempre tiveram comigo. À Universidade do Estado da Bahia, pela formação superior e ao Centro de Educação Tecnológica da Bahia, onde tudo começou (Química) por todo aprendizado de vida que adquiri nessas instituições. A todos os professores (UFBA, UNEB, CEFETBA, Colegio Estadual Rafael Serravalle) que contribuíram para minha formação cognitiva e emocional, meu caráter, minha índole e desenvolvimento de minha inteligência.

Às amigas Marli, Sueli, Denise, Daniela, Alexandra, Mayara, Gilene, companheiras de uma vida inteira, dos bons, dos não muito bons, e dos ótimos momentos. A todos os meus familiares que vêem em mim a certeza de que todos podemos ir mais longe, mesmo não tendo as condições mais favoráveis, que eles nunca desistam.

A todos que involuntariamente omiti e que contribuíram, de alguma forma, para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1:	Introdução	1
1.1 -	Espécies de espinafre	1
1.2 -	Aspectos nutricionais do espinafre	2
1.2.1 -	Ácido oxálico e oxalatos	4
1.3 -	Adsorventes naturais	7
1.3.1 -	Biossorventes	9
1.4 -	Enriquecimento nutricional de alimentos	11
CAPÍTULO 2:	Objetivos	14
2.1 -	Objetivo geral	14
2.2 -	Objetivo específico	14
CAPÍTULO 3:	Experimental	15
3.1 -	Reagentes, soluções e amostras	15
3.2 -	Materiais e equipamentos	18
3.3 -	Procedimentos	19
3.3.1 -	Avaliação do procedimento de mineralização	19
3.3.2 -	Extração de metais em diferentes pH para determinação em ICP OES	21
3.3.3 -	Estudo do teor de espécies oxidáveis presente no espinafre	21
3.3.4 -	Estudo do teor de oxalato solúvel presente no espinafre	22
3.3.5 -	Avaliação do poder adsorptivo do espinafre para íons cobre	22
3.3.6 -	Avaliação do poder adsorptivo do espinafre para íons magnésio	23
3.3.7 -	Avaliação do poder adsorptivo do espinafre para íons cálcio	24
CAPÍTULO 4:	Resultados e discussões	25
4.1 -	Avaliação de procedimentos de digestão ácida em sistema aberto para a determinação dos teores de metais em amostras de espinafre da Nova Zelândia	25
4.2 -	Comparação dos teores de íons metálicos no espinafre	30
4.3 -	Avaliação do nível de interação de metais com o espinafre da Nova Zelândia	33
4.4 -	Teor de oxalato presente no espinafre	42

4.4.1 -	Teor de oxalato presente no espinafre consumido no Brasil	46
4.4.2 -	Teor de oxalato presente no espinafre consumido em Portugal	46
4.4.3 -	Comparação do teor de oxalato no espinafre NZ e espinafre verdadeiro	47
4.5 -	Avaliação do poder adsorativo do espinafre NZ para alguns íons metálicos	48
4.5.1 -	Avaliação do poder adsorativo do espinafre NZ para íons cobre	49
4.5.2 -	Avaliação do poder adsorativo do espinafre NZ para íons magnésio	50
4.5.3 -	Avaliação do poder adsorativo do espinafre NZ para íons cálcio	52
CAPÍTULO 5:	Conclusões	60
CAPÍTULO 6:	Referências Bibliográficas	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Curva de distribuição do ácido oxálico para a faixa de pH entre 0 e 14.	5
Figura 4.1.	Percentagem extraída em soluções de diferentes pH com ou sem EDTA. (a) Alumínio. (b) Ferro	34
Figura 4.2.	Solubilidade do Al_2O_3 em diferentes pH na presença e ausência de EDTA.	36
Figura 4.3.	Solubilidade do $Fe(OH)_3$ em diferentes pH na presença e ausência de EDTA	37

Figura 4.4.	Porcentagem de íons metálicos extraídos em soluções de diferentes pH com ou sem EDTA. (a) Cobre (b) Manganês	38
Figura 4.5.	Porcentagem de íons metálicos extraídos em soluções de diferentes pH com ou sem EDTA. (a) Cálcio. (b) Magnésio	39
Figura 4.6	Solubilidade do oxalato de cálcio em diferentes pH na presença e ausência de EDTA.	41
Figura 4.7	Varição do percentual de íons cálcio adsorvido no espinafre para diferentes concentrações de íons Ca^{2+} em solução	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1.	Características para o preparo de solução mista de íons metálicos	16
Tabela 3.2.	Condições experimentais utilizadas nas medidas com ICP OES	18
Tabela 3.3.	Linhas Espectrais (nm) selecionadas para a medida das concentrações de íons metálicos no ICP OES	19
Tabela 4.1.	Concentração de alguns íons metálicos presentes em amostra de espinafre NZ, expressa em g kg^{-1} de matéria seca, empregando quatro diferentes estratégias de digestão. (N = 4)	26
Tabela 4.2.	Teores de elementos metálicos em amostras de espinafre da NZ expressos em $\text{mg} / 100 \text{ g}$ de matéria seca (nosso estudo) e fresca (Kawashima & Soares, 2003) e a razão (R) entre as concentrações na matéria seca e fresca.	30
Tabela 4.3.	Concentração de metais na base seca e fresca em espinafre da Nova Zelândia e as razões de concentração (adaptado de Jaworska, 1999)	31
Tabela 4.4.	Teor de espécies oxidáveis pelo permanganato nos extratos de espinafre obtidos em diferentes condições de acidez (expresso como oxalato em mg g^{-1} de matéria seca).	43
Tabela 4.5.	Teor de oxalato em extratos de espinafre	45
Tabela 4.6.	Teor de oxalato solúvel, em $\text{g} / 100\text{g}$ de matéria seca, em espinafre NZ e espinafre verdadeiro	47
Tabela 4.7.	Adsorção de cálcio por espinafre NZ usando concentrações variadas do íon metálico em solução e solução em pH 1 como extratora	54
Tabela 4.8.	Comparação da adsorção de cálcio por espinafre NZ e espinafre verdadeiro	55
Tabela 4.9.	Adsorção de cálcio por espinafre NZ usando soluções extratoras de diferentes ácidos minerais e solução de Ca^{2+}	56

	10 $\mu\text{g mL}^{-1}$	
Tabela 4.10.	Adsorção de cálcio por espinafre NZ usando soluções extratoras de diferentes ácidos minerais (1ª extração ácido a 50 % e demais em ácido 0,1 mol L ⁻¹) e solução de Ca ²⁺ 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$	57
Tabela 4.11.	Resultados para ciclos de extração (solução a pH 1) e adsorção de íons metálicos (M ²⁺) em 100 mg de matéria seca de espinafre NZ	58

RESUMO

O espinafre produzido e mais consumido no Brasil, denominado como espinafre da Nova Zelândia (*Tetragonia expansa*), difere significativamente do espinafre verdadeiro (*Spinacia oleracea*) produzido em muitos países do hemisfério norte. As diferenças ocorrem não apenas na classificação botânica, mas em muitas das características químicas dos vegetais. No presente trabalho, foram avaliados os teores de alguns nutrientes e antinutrientes contidos no espinafre comercializado na Bahia, sendo avaliados quatro diferentes procedimentos de digestão das amostras de espinafre com ácido nítrico em sistema aberto. Os resultados obtidos a partir dos diversos procedimentos de pré-tratamento da amostra foram comparados para os vários analitos investigados (Al, Ca, Fe, Cu, Zn, Mn, Mg) e indicaram vantagens da inserção de uma etapa de pré-digestão. Adicionalmente, foram realizados testes de extração dos metais sob investigação em água e em soluções com diferentes níveis de acidez na presença e ausência de agente quelante (ácido etilendiaminotetracético – EDTA) para avaliação do nível de interação dos metais com o vegetal e, por conseguinte, a disponibilidade destes minerais. Os resultados levaram a acreditar que as interações de Mg(II), Cu(II) e Mn(II) com o espinafre seco eram fracas, enquanto que as interações com Al(III), Ca(II) e Fe(III) eram mais intensas, devido a condições mais drásticas (acidez da solução ou presença de quelante) foram necessárias para maximizar a extração destes metais. Ao considerar informações previamente reportadas sobre os elevados teores de oxalato em espinafre e seus efeitos antinutricionais, foram investigados os teores de oxalato em amostras secas oriundas de amostras de espinafre verdadeiro e espinafre da Nova Zelândia cultivado na Bahia, empregando permanganometria. Para tanto foram realizados estudos sobre as melhores condições para extração de oxalato variando a acidez da solução extratora e os resultados obtidos foram comparados com os apresentados na literatura. Finalmente, foram realizados testes para avaliação da possibilidade de enriquecimento de espinafre com íons metálicos a partir de sucessivas etapas de extração (dessorção) e concentração (sorção) do íon no vegetal. Pôde ser constatado que os maiores níveis de sorção ($18 \pm 3 \text{ mg g}^{-1}$) e repetitividade foram obtidas para íons cálcio, possivelmente devido ao oxalato existente nos espinafres.

Palavras chave: espinafre; nutriente; interação de metais; equilíbrio químico; determinação de oxalato; enriquecimento mineral

ABSTRACT

The spinach species more produced and consumed in Brazil, named as New Zealand spinach (*Tetragonia expansa*), differs significantly from the real spinach (*Spinacia oleracea*) produced in some countries of North Hemisphere. The differences appear not only in botanic classification, but in some chemical characteristics of vegetables. In the present work the contents of some mineral species presents in spinach found in Bahia's markets, by evaluating four different digestion procedures for New Zealand spinach samples using nitric acid in open digestion system. The results obtained by the diverse sample preparation procedures were compared for diverse metallic species investigated (Al, Ca, Fe, Cu, Zn, Mn and Mg) and they have indicated some advantages to join a step for prior digestion. In addition, a set of experiments for metallic species extraction in water and in solution with different acidity and with or without a chelant (ethylenediaminetetracetic acid – EDTA) was carried out to evaluate the interaction level of metal species with the vegetable and then, to evaluate de bioavaliabilty of these mineral species. The results led to believe that weak bonds of the Mg(II), Cu(II) and Mn(II) with dry spinach were weak, while they were stronger for Al(III), Ca(II) e Fe(III), due to more drastic conditions (acidity or chelant presence) were necessary to maximize these metal extraction. By considering previously reported information about the high level of oxalate in spinach and about it anti nutritional effect, it was evaluated the oxalate concentration in dry samples obtained from the real spinach and from the spinach of New Zealand produced in Bahia, by employing permanganatometric technique. Therefore investigations about the best condition for oxalate extraction were carried out varying the acidity of extraction solution and the results were compared with those previously reported. Finally, some experiments for spinach enrichment with metal ions were performed by applying successive extraction (desorption) and concentration (adsorption) steps. It was observed that the higher sorption level ($18 \pm 3 \text{ mg g}^{-1}$) and repeatability were obtained for calcium ions due to the oxalate present in spinach samples.

Key words: spinach; nutrient; metal interaction; chemical equilibrium; oxalate determination; mineral enrichment

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Espécies de espinafre

O espinafre (*Spinacia oleracea*) é uma erva rasteira de origem asiática, sendo interessante informar que o espinafre consumido no Brasil é parecido com o espinafre verdadeiro, mas na verdade é o nome popular dado à *Tetragonia expansa*. Este vegetal pertence à outra família botânica (Aizoaceae) e é também conhecido como espinafre da Nova Zelândia (espinafre NZ). O espinafre verdadeiro (*Spinacia oleracea*) pertence à família das Chenopodiaceae (Jaworska, 2005) é muito consumido em países do hemisfério norte (Europa e América do Norte). Já o espinafre NZ é uma planta rasteira de textura semi-herbácea produzida e consumida em países do hemisfério sul.

No que diz respeito às suas características, o espinafre verdadeiro e o espinafre NZ são classificados como legumes folhosos com alto valor nutricional. Estes vegetais contêm grandes quantidades de nutrientes, principalmente vitaminas, β -caroteno, ácido fólico, íons metálicos, além de fibras alimentares (Gupta, 1989). O espinafre é também caracterizado por conter compostos com elevada capacidade antioxidante. Infelizmente, como ocorre em outros vegetais folhosos, os espinafres, verdadeiro e da Nova Zelândia, são constituídos também por espécies indesejáveis para o organismo como nitratos, nitritos e oxalatos (Jaworska, 2005).

O espinafre da Nova Zelândia apresenta ramagem ereta a prostrada, suculenta, ramificada, lenhosa na base e de cor verde brilhante. As folhas são igualmente carnosas, de formato triangular, dispostas alternas, porém com

tonalidade de verde mais escuro e de tamanho menor do que o espinafre verdadeiro. As inflorescências do espinafre NZ são axilares, com uma a três [flores](#), que podem ser unissexuadas ou bissexuadas, com coloração entre o verde e o amarelo. Os frutos são do tipo drupa, indeiscentes e com pequenos chifres. Esta espécie de espinafre é utilizada da mesma forma que o espinafre verdadeiro. Ela pode ser consumida crua ou cozida, em saladas, e enriquece o valor nutricional de alimentos. (Joly, 1970; jardineiro.net, 2009).

O espinafre verdadeiro é uma planta hortícola de textura herbácea, dióica, que atinge cerca de 30 cm de altura. Como mencionado anteriormente, esta espécie de espinafre é muito popular e largamente produzida na Europa e nos Estados Unidos. O espinafre apresenta folhas simples, basais ou alternas, ovais a triangulares, as quais são maiores próximo a base da planta e menores nas extremidades. Suas flores são discretas, amarelo-esverdeadas, sendo que nas plantas masculinas surgem em inflorescências terminais, do tipo espiga, e nas plantas femininas, são sésseis e surgem nas axilas das folhas. Os frutos são do tipo aquênio (Joly, 1970; jardineiro.net, 2009).

1.2 – Aspectos nutricionais do espinafre

Os legumes folhosos têm importância relevante em uma dieta bem equilibrada. O conceito de uma dieta bem equilibrada foi substancialmente alterado nos últimos anos, sendo hoje aconselhada a diminuição do consumo de carne vermelha e o aumento do consumo de legumes e frutas. Por outro lado, com poucas exceções, as frutas e produtos agrícolas folhosos sempre ocuparam um lugar

modesto como uma fonte de oligoelementos (elementos essenciais), devido ao seu alto teor de água. (Kawashima & Soares, 2003).

Ainda há pouca informação sobre a composição de alimentos brasileiros. Vegetais folhosos, por exemplo, estão presentes na mesa de todas as classes econômica e representam indubitavelmente uma importante fonte de nutrientes para pessoas com menor poder aquisitivo (Kawashima, 2003).

No Brasil, vem sendo difundido o uso de alimentos não-convencionais (alternativos) para populações com baixo poder aquisitivo e as multimisturas alimentares devem ser destacadas no contexto destes alimentos alternativos. Embora as multimisturas tenham alto valor nutritivo, fatores antinutricionais relacionados a este alimento alternativo ainda são pouco conhecidos. O conceito de alimentação alternativa começou a ser utilizado para grupos de maior risco de deficiências nutricionais, como a desnutrição energoprotéica, a anemia e hipovitaminoses. Os alimentos difundidos pela alimentação alternativa são farelos de trigo; farelo de arroz; pó de folha de mandioca; pó de casca de ovo; pó de sementes (gergelim, girassol, melancia); e outras folhas verdes, como o espinafre (Santa'ana et al, 2000).

O espinafre é conhecido por ser um vegetal muito rico em ferro. Devido a sua biodisponibilidade, somente 2% da quantidade total de ferro presente no espinafre pode ser absorvido pelo organismo. Adicionalmente, o espinafre também fornece vitaminas do complexo B, vitamina A e C, potássio e fibras. O espinafre contém poucas calorias (22 por cada 100 g). Apesar de rico em cálcio, contém oxalato que interfere na absorção do cálcio pelo organismo. É fonte também de ácido fólico, importante para o bom funcionamento das células e principalmente para o

desenvolvimento fetal. O ácido fólico tem papel relevante na gravidez, pois pode diminuir os riscos de malformação congênita, além de ser eficiente no combate à anemia e a doenças cardiovasculares. A presença de ácido fólico na folha de espinafre foi confirmada na década de 1940. O espinafre da Nova Zelândia fornece também magnésio, extremamente benéfico para o sistema imunológico, além de luteína, uma vitamina do grupo dos carotenóides, que age como antioxidante, protegendo as células contra os danos causados pelos radicais livres (Fatibello-Filho & Vieira, 2002).

Como mencionado, os espinafres são, entre os vegetais, aqueles que contêm os teores mais elevados de cálcio e ferro. Entretanto, esses dois elementos são pouco aproveitados pelo organismo, já que o alto teor de ácido oxálico no vegetal inibe a absorção e a boa utilização dessas espécies metálicas pelo organismo humano. Estudos mostraram que o ácido oxálico presente no espinafre pode interferir na absorção do cálcio presente em leite e derivados (Santa'ana et al, 2000).

1.2.1 – Ácido oxálico e oxalatos

Por ser um dos principais antinutrientes presentes no espinafre é interessante aprofundar-se um pouco mais nas propriedades dos oxalatos e, necessariamente, do ácido oxálico. O ácido oxálico é um ácido fraco diprótico com pK_{a1} e pK_{a2} de 1,252 e 4,266, respectivamente. A curva de distribuição do ácido oxálico para a faixa de pH entre 0 e 14 é apresentada na Figura 1.1. Em meio a pH = 0, 90% do oxalato está na forma de ácido oxálico, enquanto que a fração máxima na forma monoidrogenooxalato (98%) ocorrerá em meio a pH 2,8. Oxalato é a forma

predominante em meios a pH maior que 4,4 e é a única forma de oxalato em meios a pH maior que 7,5.

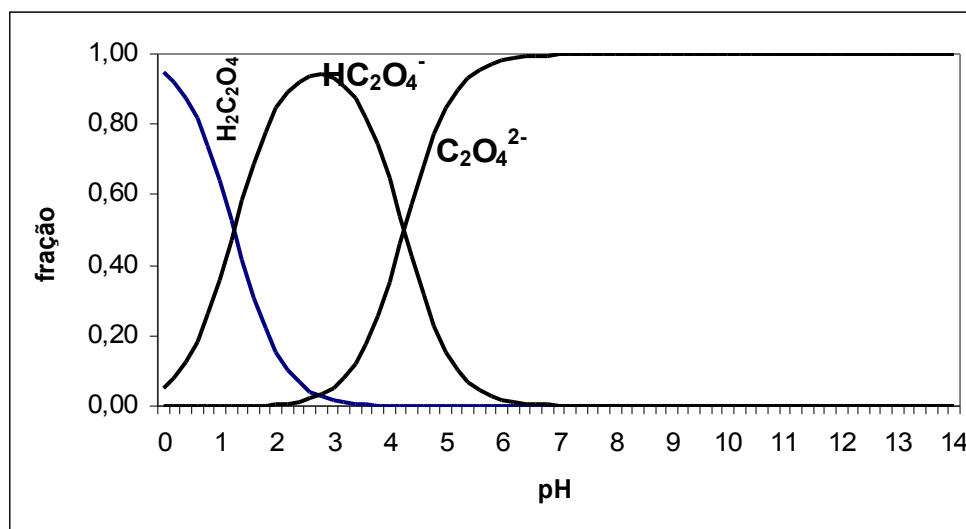


Figura 1.1 – Curva de distribuição do ácido oxálico para valores de pH entre 0 e 14.

O ácido oxálico é formado nas plantas pela oxidação incompleta de carboidratos ocasionada pela ação de fungos (*Aspergillus niger*) ou bactérias (*acetobacter*). Nos animais, o ácido oxálico é produzido pelo metabolismo de carboidratos, via ciclo do ácido tricarboxílico.

O oxalato forma precipitados pouco solúveis em água com íons divalentes da família dos alcalinos terrosos (Ca^{2+} , Sr^{2+} e Ba^{2+}), além de La^{3+} , Th^{4+} e $U(VI)$. As constantes dos produtos de solubilidade (Kps) dos oxalatos de cálcio, estrôncio e bário são $1,3 \times 10^{-8}$, 4×10^{-7} e 1×10^{-6} , respectivamente. Com base nos valores de Kps, é fácil constatar que o CaC_2O_4 é menos solúvel em água ($0,114 \text{ mmol L}^{-1}$) que os oxalatos de estrôncio e de bário (Harris, 2005). Neste contexto, não é de se estranhar que a urina humana, assim como a da maioria dos mamíferos, contém uma pequena quantidade de ácido oxálico na forma de oxalato de cálcio. Nos casos patológicos, um aumento do teor de oxalato de cálcio contido na urina indica

possível formação de pedras no rim (Ribeiro, 1999). O oxalato de cálcio forma cristais monoclinicos aciculares, isto é, em forma de agulha, com importante significado biológico, como já discutido, e ocorrendo em diferentes quantidades na maioria dos seres vivos. O oxalato é uma espécie de grande interesse em análises clínicas, uma vez que sua alta concentração no sangue pode favorecer à formação de cálculos renais. O oxalato está presente na dieta humana, sendo encontrado em diversos vegetais, podendo ser resultado do metabolismo de aminoácido (glicina) ou do ácido ascórbico. Ele afeta a saúde de duas maneiras distintas: (i) após sua absorção pelo organismo, produz sais insolúveis de cálcio (presente na circulação) que podem precipitar nos rins contribuindo para a formação de cálculo renal; e, (ii) antes da absorção, pela reação com o cálcio da dieta, diminuindo sua assimilação pelo organismo (Perez, 2000).

A absorção de magnésio e ferro no organismo humano também é significativamente decrescida pelo consumo de vegetais ricos em oxalato (Bohn et al, 2004). Os íons Mg^{2+} podem ser ocluídos na formação de oxalato de cálcio. Porém, a interação de íons Fe^{3+} com oxalato se dá por complexação ($\log \beta_1 = 7,54$, $\log \beta_2 = 14,59$ e $\log \beta_3 = 20,00$).

Frente ao exposto, é relevante proceder a uma pesquisa sobre os teores de cálcio e outros elementos presentes no espinafre, bem como determinar os teores de oxalato, já que este pode agir como um antinutriente. Pesquisas realizadas em animais já demonstram essa possibilidade (Moraes, 1998). Com base nestes dados torna-se evidente a necessidade de um estudo mais aprofundado a cerca da concentração de oxalato presente no espinafre, bem como quanto à sua capacidade em precipitar e complexar cálcio e outros elementos, presentes no próprio espinafre ou na refeição como um todo. Não descartando, também, a possibilidade de usar

esta capacidade do espinafre em prender íons cálcio para, quem sabe, fazer um enriquecimento deste íon metálico no vegetal. Este tema ainda não foi muito discutido na literatura, mas possibilidade do enriquecimento mineral de vegetais, utilizando-se de sua característica em adsorver íons metálicos devido à presença de compostos orgânicos como oxalato, pode ser uma ferramenta interessante para o desenvolvimento saudável de populações. É claro que para tanto estas propriedades teriam que ser exaustivamente exploradas, a começar pelo conhecimento do que são adsorventes naturais e como eles atuam.

1.3 – Adsorventes naturais

As pesquisas envolvendo extração/concentração de metais são realizadas em sua maioria, utilizando-se adsorventes disponíveis comercialmente. Entretanto, outros materiais denominados de “adsorventes naturais” estão sendo empregados com sucesso em processos adsorptivos de metais (Godlewska-Zylkiewicz, 2003). Adsorvente natural é todo material que não é produzido sinteticamente e que apresenta a propriedade de adsorver espécies químicas orgânicas ou inorgânicas (Veglio,1997). O uso de adsorventes naturais apresenta algumas vantagens em relação aos adsorventes sintéticos. Uma das principais vantagens é a fácil obtenção, além do baixo custo. Ainda, estes adsorventes se enquadram dentro do atual conceito de química limpa, pois não necessitam de agentes complexantes na etapa de concentração, nem de solventes orgânicos na etapa de eluição. A eluição é, geralmente, feita com ácidos minerais diluídos (Madrid, 1998; Cassella, 2001). Os adsorventes naturais estão divididos em diferentes categorias: biossorventes, adsorventes minerais e adsorventes lignocelulósicos e húmicos.

Os principais adsorventes minerais são as zeólitas e argilas. As zeólitas são compostas por mais de 40 espécies de alumínio-silicatos. Esses minerais são formados por cadeias de anéis tetraédricos de SiO_4 e AlO_4 ligadas pelos cátions intersticiais (Na, Ca, K, Ba, Sr). Quando uma solução aquosa entra em contato com as zeólitas, pode ocorrer a troca de íons da solução por íons presentes na estrutura (Balley, 1999). As argilas são materiais de propriedades semelhantes às zeólitas e sua estrutura é composta basicamente por camadas tetraédricas de silício e octaédricas de alumínio (Ali, 1999).

Os adsorventes lignocelulósicos são geralmente subprodutos agroindustriais, tais como cascas de soja, amendoim, sabugo de milho, resíduos de maçã, coco, entre outros. Estes são constituídos por celulose, hemicelulose e lignina. O processo adsorptivo de íons metálicos se dá pela presença de grupos funcionais nas estruturas das macromoléculas. Os processos envolvidos na retenção dos metais são troca iônica e complexação, sendo que ambas ocorrem na superfície do material. Uma característica interessante desses materiais é que eles têm uma alta resistência química, podendo sofrer diferentes tratamentos para melhorar a afinidade e, também, a seletividade química (Bag et al, 1998; Jesus et al, 1998).

Os adsorventes húmicos, principalmente o vermicomposto não tem, segundo a literatura, uma aplicação muito pronunciada na adsorção de metais, apesar dos mesmos apresentarem uma capacidade adsorptiva elevada. O vermicomposto é produzido por minhocas, as quais promovem em seu trato digestivo a degradação biológica e química da matéria orgânica oriunda de resíduos agrícolas, industriais e urbanos (Tarley, 2004).

Os biossorventes são materiais responsáveis pelo processo de bioconcentração, bioacumulação ou biossorção, onde os metais são adsorvidos por

organismos como fungos, leveduras, bactérias, algas e vegetais em geral. Estes organismos podem estar vivos ou mortos, pois a atividade metabólica não é necessariamente exigida. Contudo, os bioSORVENTES estão divididos em duas categorias, justamente dependendo se são empregadas células vivas ou mortas. Como este trabalho foi baseado nas propriedades dos bioSORVENTES suas características serão mais bem exploradas (Reis et al, 1996 e Beceiro-González et al, 2000).

1.3.1 – BioSORVENTES

Os processos adsorptivos ocorrem preferencialmente na membrana celular quando se trata de células mortas, ao passo que, em microorganismos vivos, são observados fenômenos adsorptivos em função da atividade biológica (Cañizares-Villanueva, 2000).

Os bioSORVENTES (fungos, leveduras, bactérias, algas e vegetais em geral) são considerados uma importante classe de adsorventes naturais, pois possuem, diferentemente das resinas sintéticas, vários sítios de ligação para retenção de cátions metálicos na membrana celular, incluindo grupos aminas, carboxilas, hidroxilas alcoólicas e fenólicas, fosfatos e sulfidrilas. Isto confere aos bioSORVENTES uma capacidade adsorptiva maior que a encontrada para resinas sintéticas. Por outro lado os bioSORVENTES são menos susceptíveis a interações (interferências) com íons de metais alcalinos, tornando este material mais seletivo que as resinas de troca iônica (Bag et al, 1998).

Como já mencionado, os mecanismos de interação entre espécies metálicas e os bioSORVENTES são divididos em duas categorias, a depender da atividade metabólica manifestada pelo bioSORVENTE. Na primeira categoria, há apenas uma

rápida interação das espécies metálicas com a superfície do bioissorvente e este processo é conhecido como interação passiva, ocorrendo tanto nos bioissorventes sem atividade metabólica, quanto nos bioissorventes vivos. Na segunda categoria, após a interação passiva, acontece um processo mais lento e complexo, iniciado pela ligação das espécies metálicas com a membrana celular, seguido do transporte através da membrana e reações intracelulares como metilação, redução e oxidação. Com base no exposto, considera-se que os organismos vivos são pouco indicados em processo de adsorção, pois o caráter tóxico provocado na maioria das vezes pelo metal pode alterar o metabolismo do organismo e diminuir a eficiência na retenção (Madrid & Cámara, 1997).

É importante ressaltar que, na interação superficial (adsorção passiva), os principais mecanismos envolvidos compreendem a troca iônica e a complexação. De maneira geral esses mecanismos são rápidos e mais dependentes do pH da amostra que da temperatura. Processos adsorptivos envolvendo a formação de ligações covalentes entre as espécies químicas e os sítios dos bioissorventes não são comuns na adsorção passiva, mas podem ocorrer principalmente em bioissorventes com elevados teores de enxofre (Tarley, 2004).

Os processos de enriquecimento de espécies metálicas para vegetais estariam relacionados com a possibilidade de compostos orgânicos presentes no vegetal realizarem interações fracas com os metais por reações de complexação ou por transformações intracelulares. Desta forma, espécies como o oxalato, que geralmente são classificadas como fatores antinutricionais, pudessem atuar de forma benéfica para a saúde.

1.4 – Enriquecimento nutricional de alimentos

A indústria alimentícia tem particular interesse na melhoria do valor nutricional dos produtos industrializados, devido às perdas dos teores de vitaminas e de elementos essenciais durante o beneficiamento de alimentos (Bauruffaldi & Oliveira, 1998). Também, o interesse e a busca da população por alimentos mais saudáveis propiciaram um rápido crescimento do segmento alimentício, contribuindo para a implementação de dietas de melhor qualidade (Casé et al 2005). A escolha e o consumo inadequados de alimentos e dietas restritas podem afetar o estado nutricional do indivíduo em qualquer período de sua vida. Assim, oportunidades existem para que a indústria de alimentos manufacture produtos que alcancem os requerimentos nutricionais de grupos populacionais específicos, tais como: crianças, adolescentes, mulheres, esportistas, idosos, entre outros.

Atualmente, esse mercado de produtos ditos "naturais" ou "saudáveis" é o segmento da indústria de alimentos que vem crescendo mais rapidamente, devido à imagem negativa do uso de medicamentos, e às incertezas associadas à eficiência dos suplementos. Assim, a procura por alimentos funcionais tem se tornado bastante popular (Riaz, 1999).

Segundo o Institute of Medicine's Food and Nutrition Board, entende-se por alimento funcional o produto alimentício que forneça benefício específico à saúde, além dos tradicionais nutrientes nele contidos. Isto é, são alimentos que contêm níveis significativos de componentes biologicamente ativos, os quais promovem benefício ao indivíduo, além de simplesmente nutrir.

Atualmente, muitos estudos têm sido realizados sobre o enriquecimento de alimentos. Isto tem se dado tanto pelo enriquecimento com elementos essenciais, como com proteínas ou outras espécies químicas. O processo mais comum de

enriquecimento é a adição de componentes ao alimento, como adição de cálcio e magnésio ao leite de soja, adição de sais de cálcio na fabricação do pão francês, ou adição de cálcio ao leite submetido à pasteurização. Existe, também, estudo sobre o melhoramento nutricional da massa de macarrão, adicionando quirera de arroz e farelo de soja para aumentar o teor de proteínas, fibras e elementos essenciais, com baixo impacto no preço do produto final.

Outras pesquisas na área de enriquecimento de alimentos estão relacionadas com o desenvolvimento da biotecnologia, ou seja, a utilização da engenharia e da genética para o melhoramento das propriedades nutricionais de alimentos (biofortificação). As possibilidades são animadoras, já que a biotecnologia não apenas permite enriquecer os alimentos, mas, também, eliminar antinutrientes que eventualmente possam estar contidos nos produtos. A biofortificação de alimentos é mais uma ferramenta que pode contribuir para a melhoria do estado nutricional humano, especialmente de populações mais carentes e que apresentem deficiências nutricionais. Como exemplos de alimentos que foram biofortificados, têm-se o arroz rico em ferro, o morango rico em vitamina C, batatas enriquecidas com proteínas, grãos ricos em elementos essenciais, como cálcio, zinco e ferro, estando este último ainda em fase de pesquisa (CIB, 2009).

Como mencionado, os metais estão entre os principais componentes nas pesquisas para enriquecimento de alimentos e o cálcio é um dos mais citados. O enriquecimento do espinafre com cálcio pode ser uma alternativa para aumentar a quantidade deste elemento na dieta, visto sua essencialidade. O consumo adequado de cálcio durante a vida é um pré-requisito para a saúde, pois ele é necessário para o desenvolvimento ósseo durante o crescimento e para a manutenção da integridade do esqueleto durante a vida adulta. A deficiência de cálcio pode acarretar além da

perda da massa óssea, problemas como câibras e irritabilidade, pois o referido elemento é necessário na transmissão nervosa e na regulação dos batimentos cardíacos (Krause, 1991).

A biodisponibilidade de um elemento é a sua capacidade de estar biologicamente disponível para ser absorvido pelo organismo humano. Diversos fatores afetam a biodisponibilidade do cálcio, tais como constituintes da dieta, fatores intestinais e tratamentos térmicos aplicados aos produtos já fortificados (Casé et al 2005). A quantidade de cálcio no produto final é importante, mas a sua biodisponibilidade no organismo é fundamental para que o produto forneça quantidades adequadas do elemento ao consumidor (Xu et al, 1997). É fundamental que o cálcio seja não somente ingerido, mas, também, absorvido em quantidades adequadas para a realização das funções metabólicas. O entendimento do poder adsorptivo do espinafre em relação a espécies metálicas em estudo e, principalmente em relação ao cálcio expressa um caráter importantíssimo em termos de saúde pública com reflexos diretos sobre a melhoria da qualidade de vida das populações.

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral

Avaliar quimicamente parâmetros de interesse nutricional de espinafre comercializado na Bahia, com foco no teor de oxalato e no teor de espécies minerais.

2.2 – Objetivos Específicos

- Avaliar a capacidade de enriquecimento de espinafre com íons metálicos.
- Comparar os teores de oxalato em espinafre da Nova Zelândia e espinafre verdadeiro.
- Comparar a capacidade de enriquecimento com cálcio em espinafre da Nova Zelândia e espinafre verdadeiro.

3 – EXPERIMENTAL

3.1 – Reagentes, Soluções e Amostra

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico de pureza e as soluções foram sempre preparadas com água desionizada (condutividade $< 0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$). Para a extração de metais em diferentes níveis de acidez, foram preparadas soluções em pH 1, 3, 5 e 7, com e sem a presença do complexante etilenodiaminotetracetato dissódico (EDTA).

Para o preparo da solução a pH 1 foi utilizada solução de ácido clorídrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ preparada a partir da diluição de 2,08 mL de ácido clorídrico P.A. (Merck) em 250 mL de água. A solução tampão em pH 3 foi preparada a partir da dissolução de 5,1 g de biftalato de potássio em solução de ácido clorídrico e avolumado para 250 mL com água. A solução em pH 5 foi obtida pela dissolução de 1,75 g de biftalato de potássio e 0,338 g de NaHCO_3 em água. A solução pH 7 foi preparada a partir da dissolução de 1,133 g de KH_2PO_4 e 2,362 g de Na_2HPO_4 em 250 mL de água. Foi adicionada massa apropriada de sal dissódico de EDTA em 100 mL da solução para obter concentração final igual a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para o preparo das soluções do quelante a pH 3, 5 e 7.

Para a quantificação dos metais em estudo, foi preparada solução de referência mista dos íons metálicos, seguindo o mesmo procedimento indicado por Wolnik e posteriormente por Stephens e Calder (Stephens & Calder, 2004 e Wolnik et al, 1985).

As faixas de concentrações dos íons metálicos esperadas em amostras de espinafre, bem como os compostos utilizados para o preparo da solução estoque e a concentração final em relação aos metais estudados, são listados na Tabela 2.1. Para obter as soluções de trabalho em concentrações adequadas, foram realizadas diluições da solução estoque nas seguintes proporções: 1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50,

1:100, 1:200, 1:500 e 1:1000. A acidez final das diluições foi ajustada em 0,1 mol L⁻¹ com ácido nítrico.

Tabela 3.1 – Características para o preparo de solução mista de íons metálicos

Metal	C esperada do íon metálico no espinafre mg L ⁻¹	Sal empregado	C íon metálico na Solução Estoque mg L ⁻¹
Fe ³⁺	1 – 3	Fe ₂ O ₃	2005,92
Al ³⁺	1 – 2	Al ⁰	52,25
Ca ²⁺	50 – 70	CaCO ₃	1006,40
Mg ²⁺	20 – 30	MgO	536,00
Zn ²⁺	0,3 – 0,7	solução de referência NIST	20,00
Cu ²⁺	0,05 – 0,1	solução de referência NIST	5,00
Mn ²⁺	0,3 – 0,7	MnO	5,70

Para o estudo do teor de espécies oxidáveis presente no espinafre, foi utilizado, como titulante, solução de KMnO₄ 0,02 mol L⁻¹ preparada a partir da dissolução de aproximadamente 3,2 g de KMnO₄ em 1000 mL de água. Em seguida, essa solução foi levada a aquecimento até ebulição, durante 30 min. Após atingir a temperatura ambiente, a solução foi filtrada em funil de vidro sinterizado e armazenada em recipiente de vidro âmbar. A padronização da solução de permanganato de potássio foi feita com oxalato de sódio, conforme descrito na literatura (Basset, 1981). A solução de ácido sulfúrico 2 mol L⁻¹ foi preparada a partir da diluição de 11,10 mL de ácido sulfúrico concentrado e completado para 100 mL com água.

Solução de cloreto de cálcio saturada também foram utilizadas, e soluções em pHs 1, 2 e 3 foram preparadas a partir da diluição da solução de ácido sulfúrico 2 mol L⁻¹ em água.

A solução de íons Cu^{2+} $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ utilizada na etapa de avaliação da capacidade adsortiva do espinafre para íons cobre foi preparada a partir da massa de 0,51 g de cobre metálico dissolvido em ácido nítrico concentrado e posteriormente diluído com água para 500 mL. Para o preparo da solução de EDTA $0,005 \text{ mol L}^{-1}$ foi pesada uma massa de 0,9314 g do sólido e, em seguida, solubilizada em água para 500 mL. Como indicador, foi utilizado murexide em cloreto de sódio na proporção de 1:100, onde foi triturado 0,05 g de murexide com NaCl para completar 5 g.

Para investigação da capacidade adsortiva do espinafre para íons cálcio e magnésio, foram preparadas soluções contendo Ca^{2+} $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ e Mg^{2+} $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ a pH 8. Para o preparo da solução contendo Ca^{2+} , pesou-se 0,625 g do CaCO_3 dissolvidos em solução de HCl 1:1 (v/v), diluiu com água e o pH foi ajustado para 8 com solução de NaOH, obtendo 250 mL de solução de Ca^{2+} . Para o preparo da solução contendo Mg^{2+} , uma massa de 0,125 g de magnésio metálico foi dissolvida em ácido nítrico concentrado, seguindo-se a diluição em 250 mL de água. As demais soluções: EDTA (etilenodiaminotetracetato dissódico) $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, indicador Negro de Eriocromo T (net) 1% em trietanolamina, solução tampão a pH 10 e complexo EDTA-Mg $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas segundo procedimento indicado (Basset, 1981).

Amostras frescas de espinafre da Nova Zelândia (espinafre NZ) foram adquiridas no comércio local. As folhas foram retiradas dos pés e lavadas exaustivamente com água desionizada. Em seguida, foram transferidas para estufa sobre papel de filtro e submetidas a temperatura de $60 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ por 48 horas (até massa constante). As folhas secas foram trituradas em liquidificador por um período de 3 min. E o material resultante foi peneirado (115 e 200 Mesh). Foram também

adquiridas amostras de espinafre verdadeiro na cidade do Porto, Portugal, e as folhas deste espinafre sofreram o mesmo tratamento.

3.2 – Materiais e Equipamentos

A secagem das folhas de espinafre foi feita em estufa da Químis (Brasil), modelo 317 B243. As folhas secas de espinafre foram trituradas em liquidificador Flash In, modelo 14155-05 enquanto que peneiras de 115, 150, 200, 250 Mesh foram utilizadas para a separação das partículas de diferentes granulometrias do espinafre triturado.

A decomposição total do espinafre foi realizada por intermédio de um bloco digestor Tecnal (Piracicaba, Brasil). Para a determinação das concentrações totais dos metais pesquisados foi utilizado espectrômetro de emissão óptica com plasma de argônio indutivamente acoplado (VARIAN, modelo: Vista pro CCD simultaneous, ICP-OES), equipado com nebulizador concêntrico e câmara de nebulização ciclônica. As demais condições experimentais utilizadas no espectrômetro podem ser observadas na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Condições experimentais utilizadas nas medidas com ICP OES

Potência RF (kW)	1,3
Vazão do gás de nebulização (L min ⁻¹)	0,70
Vazão do gás auxiliar (L min ⁻¹)	1,5
Vazão do gás do plasma (L min ⁻¹)	15
Tempo de integração (s)	1,0
Tempo de estabilização (s)	15
Tempo de leitura (min)	1
Replicatas	3

As linhas espectrais selecionadas para a medida das concentrações dos íons de interesse estão apresentadas na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 - Linhas espectrais (nm) selecionadas para a medida das concentrações de íons metálicos no ICP OES.

Metal	Linhas (nm)	
Fe	238,207	259,943
Al	237,315	396,150
Ca	393,359	422,700
Mg	279,807	280,267
Mn	257,605	259,368
Zn	202,548	213,856
Cu	213,599	--

Para os testes de adsorção dos íons metálicos e determinação do teor de oxalato presente no espinafre foram utilizados os seguintes equipamentos: agitador magnético Fanem modelo 258, pHmetro OAKTON íon 510 series, balança analítica Denver Instrument APX-200, centrífuga macro EV:04 Evlab, chapa aquecedora Nova Ética modelo 208-D.

3.3 – Procedimento

3.3.1 – Avaliação do procedimento de mineralização

Foram avaliados quatro procedimentos de mineralização do material vegetal. Em todos os procedimentos, foram preparadas 4 amostras e brancos analíticos. Foram pesados aproximadamente 100 mg de amostra e a massa foi transferida para um tubo do bloco digestor onde foram adicionados 5 mL de HNO₃ concentrado. A partir desse ponto, cada procedimento investigado apresentou suas particularidades dependendo dos parâmetros avaliados, que foram: pré-digestão e adição de peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

Procedimento I (P1) – Pré-digestão

O sistema (quatro tubos com amostra e os brancos) foi mantido em repouso por cerca de 10 a 12 horas (over night). Após o período de pré-digestão, o sistema

foi aquecido a 120 °C até quase securo. Os tubos foram retirados do bloco, e, após atingirem a temperatura ambiente (10 min), foram adicionados 10 mL de água desionizada em cada tubo. Os tubos foram inseridos no bloco digestor e foram novamente aquecidos até quase securo a 120 °C.

Procedimento II (P2) – Digestão direta

Os tubos foram diretamente para o aquecimento a 120°C até quase securo. Os tubos foram retirados do bloco e, em seguida, foi empregado o mesmo procedimento de P1.

Procedimento III(P3) – Pré-digestão + H₂O₂

O sistema foi mantido em repouso por cerca de 10 a 12 horas. Após o período de pré-digestão foram adicionados 0,5 mL de H₂O₂ a 30 % (v/v) em cada tubo. O sistema foi aquecido a 120°C até quase securo. Os tubos foram retirados do bloco e, novamente, foi empregado o mesmo procedimento de P1.

Procedimento IV (P4) – digestão direta + H₂O₂

O sistema foi diretamente para aquecimento a 120°C por aproximadamente 45 minutos e, em seguida, foi retirado do bloco para adição de 0,5 mL de H₂O₂ a 30 % (v/v). O sistema, então, foi novamente inserido no bloco onde foi submetido ao aquecimento a 120°C até quase securo. Os tubos foram retirados do bloco e também foi empregado o mesmo procedimento de P1.

Em todos os procedimentos, observou-se, no digerido, a presença de pequenas partículas brancas provavelmente sílica. Para remover estas partículas, foi realizada uma filtração, onde o conteúdo dos tubos foi transferido para balões de 25

mL com auxílio de funil e papel de filtro, e, em cada tubo, foram realizadas três lavagens com solução de HNO_3 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$. Os balões foram avolumados com a mesma solução.

3.3.2 – Extração de metais em diferentes pH para determinação por ICP OES

A 100 mg de amostra de espinafre NZ, foram adicionados 15 mL de cada solução tampão separadamente, com e sem a presença de EDTA. O sistema foi colocado sob agitação por 30 min. O espinafre em suspensão foi filtrado e o extrato foi avolumado para 25 mL com o tampão correspondente.

3.3.3 – Estudo do teor de espécies oxidáveis presentes no espinafre NZ

Amostras de 1 g foram submetidas à agitação por 30 min com 100 mL de água. Em seguida, o sobrenadante foi filtrado e aferido para 250 mL o que permitiu a obtenção do extrato de espinafre. Foram feitos, também, extratos de espinafre com soluções a pH 1, 2 e 3. Estes extratos foram obtidos usando soluções preparadas a partir da diluição de uma solução de ácido sulfúrico 2 mol L^{-1} .

De cada extrato de espinafre foram tomadas alíquotas de 25 mL para titulação com KMnO_4 $0,02 \text{ mol L}^{-1}$, padronizado contra oxalato de sódio. Para acidular o meio, foram usados 20 mL de ácido sulfúrico 2 mol L^{-1} . A reação foi potencializada pelo aquecimento a $55\text{-}60^\circ\text{C}$ depois de adicionado 90-95% da quantidade necessária de KMnO_4 , e a viragem foi de incolor para róseo persistente por mais de 30 s. As titulações foram feitas em triplicata e usou-se água desionizada como branco (Basset, 1981).

3.3.4 – Estudo do teor de oxalato solúvel presente no espinafre

Precipitação e separação do oxalato solúvel

Alíquotas de 25 mL do extrato de espinafre foram transferidas para um tubo de centrífuga, onde foram adicionados, lentamente, 10 mL de solução saturada de cloreto de cálcio. Este sistema foi resfriado em geladeira por 12 h para facilitar a formação dos cristais. Após atingir a temperatura ambiente, o sistema foi centrifugado por 20 min a 4000 rpm. O precipitado foi filtrado, solubilizado em ácido sulfúrico e titulado com KMnO_4 , como descrito no item anterior. A reação de precipitação apresentou rendimento na faixa de pH entre 6 e 8. Caso o pH da solução fosse menor que 6, realizava-se um ajuste para 8 com a adição de algumas gotas de solução de hidróxido de sódio.

O teor de oxalato foi calculado pela equação $m = 25.C.V(L).M$, onde m é a massa de oxalato (g); C , a concentração de permanganato (mol L^{-1}); V , é o volume consumido de KMnO_4 na titulação (L); e, M , a massa molar do oxalato (g mol^{-1}). Para obter a concentração expressa em mg g^{-1} , o valor de m deve ser multiplicado por 1000.

3.3.5 – Avaliação do poder adsortivo do espinafre para íons cobre

Amostras de espinafre de 100 mg foram submetidos a agitação por 30 min com 15 mL de solução a pH 1 para extração de íons metálicos. Em seguida, o sobrenadante foi separado por filtração. A massa de espinafre foi lavada exaustivamente com água e novamente submetida à agitação com 15 mL de solução de Cu^{2+} $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ por 30 min. Após este período, a mistura foi filtrada e foi determinado o teor de cobre residual na solução do filtrado. A massa de espinafre foi lavada para repetir os procedimentos de extração e adsorção por aproximadamente dez ciclos. Foi retirada uma alíquota de 10 mL do sobrenadante o qual teve o pH

ajustado para 10 com solução de NH_3 e, em seguida, a solução foi titulada com EDTA $0,005 \text{ mol L}^{-1}$, utilizando murexide como indicador. O ponto final da titulação foi observado pela passagem da coloração da solução de castanho para violeta. O teor de cobre adsorvido pelo espinafre foi calculado pela diferença entre o teor original em solução e o teor residual após a adsorção.

3.3.6 – Avaliação do poder adsortivo do espinafre para íons magnésio

Amostras de espinafre de 100 mg foram submetidos a agitação por um período de 30 min com 15 mL de solução a pH 1 ou 15 mL de solução pH 7 + EDTA para extração de íons metálicos. Em seguida, o sobrenadante foi separado por filtração. A massa de espinafre foi lavada exaustivamente com água, novamente submetida a agitação com 15 mL de solução de Mg^{2+} $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ por 30 minutos e essa mistura foi então filtrada. Foi determinado o teor de magnésio residual na solução do filtrado. A massa de espinafre foi lavada para repetir os procedimentos de extração e adsorção por aproximadamente dez ciclos. Para determinação do teor de magnésio residual na solução foi retirada uma alíquota de 10 mL do filtrado a qual teve o pH ajustado em 10 com 2 mL de tampão pH 10 e como indicador, utilizou-se 1 gota de net. Com o auxílio de uma bureta adicionou-se lentamente o EDTA $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ até o ponto final, onde pôde ser observada viragem do indicador de vermelho para azul. O teor de magnésio adsorvido pelo espinafre foi encontrado pela diferença entre o teor original em solução e o teor residual após a adsorção.

3.3.7 – Avaliação do poder adsortivo do espinafre para íons cálcio

Amostras de espinafre de 100 mg foram submetidas a agitação por um período de 30 min. com 15 mL de solução pH 1 ou 15 mL de solução pH 7 + EDTA para extração de íons metálicos. Em seguida, o sobrenadante foi separado por

filtração. A massa de espinafre foi lavada exaustivamente com água, novamente submetida a agitação com 15 mL de solução de Ca^{2+} $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ por 30 minutos e essa mistura então foi filtrada. Foi determinado o teor de cálcio residual na solução do filtrado. A massa de espinafre foi lavado para repetir os procedimentos de extração e adsorção por aproximadamente dez ciclos. Para determinação do teor de cálcio residual na solução foi adicionado 1 mL da solução complexo EDTA-Mg a uma alíquota de 10 mL do filtrado, 2 mL de tampão pH 10 e, em seguida, foi titulado com EDTA $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ utilizando como indicador 1 gota de net, onde pode ser observada a viragem de vermelho para azul. O teor de cálcio adsorvido pelo espinafre foi encontrado pela diferença entre o teor original em solução e o teor residual após a adsorção. Neste estudo, também foi testado qual a melhor solução para servir de extratora dos íons cálcio durante os ciclos de extração-adsorção, para tanto, além das soluções em pH 1 e pH 7 com EDTA, foram usadas soluções de HCl 1 e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, HNO_3 1 e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, HCl e HNO_3 50%. Adicionalmente, foram testadas soluções de diferentes concentrações ($10, 100, 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) para o enriquecimento do espinafre seco com íons cálcio.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Avaliação de Procedimentos de Digestão Ácida em Sistema Aberto para a Determinação dos Teores de Metais em Amostras de Espinafre da Nova Zelândia

Nesta etapa, foram comparados procedimentos de mineralização em sistema aberto (bloco digestor), utilizando digestão direta associada, ou não, a uma etapa de pré-digestão. Para tanto, foram avaliadas as concentrações de espécies metálicas extraídas na digestão ácida com ácido nítrico, com ou sem a adição de peróxido de hidrogênio. Assim, foram avaliados quatro procedimentos para decomposição de amostra de espinafre com determinações posteriores dos teores de Al, Fe, Ca, Mg, Cu, Zn e Mn por espectrometria de emissão óptica com plasma de argônio indutivamente acoplado (ICP OES). Os testes foram realizados com quatro réplicas da amostra de espinafre. Assim, amostras do referido vegetal foram lavadas exaustivamente com água desionizada e submetidas à secagem em estufa a temperatura de 55 °C até massa constante. O material foi triturado em liquidificador com hélices de aço e as partículas com diâmetro inferior a 200 Mesh foram separadas por peneiração. Amostras de 100 mg foram medidas e transferidas para o tubo de digestão no qual era adicionado ácido nítrico concentrado. Experimentos que envolviam pré-digestão foram sempre realizados apenas com a adição de ácido nítrico à amostra, enquanto que experimentos com o envolvimento de peróxido de hidrogênio foram executados com a adição do peróxido após breve período de aquecimento da mistura da amostra com ácido nítrico. Deve ser destacado que estes ensaios foram realizados apenas com espinafre comercializado na Bahia (espinafre da Nova Zelândia).

Os valores encontrados experimentalmente para alguns íons metálicos presentes no espinafre consumido no Brasil podem ser observados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Concentração de alguns íons metálicos presentes em amostra de espinafre NZ, expressa em g kg⁻¹ de matéria seca, empregando quatro diferentes estratégias de digestão. (N = 4)

elemento	Nítrico		Nítrico / Peróxido	
	Pré-digestão	Digestão direta	Pré-digestão	Digestão direta
Al	0,09 ± 0,02	0,106 ± 0,007	0,20 ± 0,01	0,18 ± 0,03
Fe	0,24 ± 0,01	0,20 ± 0,02	0,26 ± 0,02	0,24 ± 0,01
Ca	10,0 ± 0,2	9,4 ± 0,4	9,0 ± 0,4	9,2 ± 0,4
Mg	6,6 ± 0,2	5,9 ± 0,5	6,3 ± 0,4	6,8 ± 0,2
Cu	0,013 ± 0,001	0,0121 ± 0,0005	0,0116 ± 0,0008	0,0119 ± 0,0008
Zn	0,112 ± 0,008	0,096 ± 0,007	0,099 ± 0,006	0,10 ± 0,01
Mn	0,27 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,27 ± 0,01

Para todos os elementos, nas diferentes condições de digestão, foram realizados teste t para seis graus de liberdade e 95 % de confiabilidade. Observou-se que, para alguns dos elementos investigados, houve diferenças significativas entre as concentrações determinadas, quando empregada a etapa de pré-digestão com ácido nítrico por 12 h. Assim, foram observadas para digestão em sistema aberto com ácido nítrico, diferenças significativas para as concentrações de Ca, Mg, Fe e Zn, enquanto que os valores obtidos com ou sem pré-digestão em meio nítrico não foram significativamente diferentes para Al, Cu e Mn. Comparando os valores obtidos para as concentrações de Ca, Mg, Fe e Zn determinadas em amostra de espinafre seco digeridas em meio nítrico e ao aplicar, ou não, a etapa de pré-digestão, foi observado que as concentrações destes elementos foram sempre maiores quando aplicada a etapa de pré-digestão, como pode ser observado na segunda e terceira coluna da Tabela 4.1. Para garantir que a concentração determinada de Ca, Mg, Fe e Zn, aplicando a pré-digestão, era significativamente maior (95% de confiabilidade) que a obtida com a digestão direta em meio nítrico, foi aplicado teste t para seis graus de liberdade e uma cauda, cujo valor crítico de t é

igual a 1,94. Os valores de t calculados para todos os elementos sob investigação indicaram que a concentração determinada para Ca, Mg, Fe e Zn foram significativamente maiores quando aplicada a digestão nítrica acoplada a uma etapa de pré-digestão. Este fato pode ser relacionado a efeitos cinéticos, visto que o tempo de contato da amostra com a solução de HNO_3 sofre um acréscimo de 12 h, quando aplicada a pré-digestão. Por outro ponto de vista, o ácido nítrico atua na digestão da amostra seca de espinafre fazendo uso de suas características ácidas e como agente oxidante. Contudo, a ação como oxidante é drasticamente aumentada com o aquecimento, o qual também favorece a eliminação dos gases gerados na decomposição da matéria seca (CO_2 , NO e NO_2). Porém, o aquecimento ocorre apenas durante a digestão e, não afetando a etapa de pré-digestão, esta justificativa (o aquecimento) não poderia ser considerada para explicar as diferenças observadas. Neste contexto, pode ser afirmado que Ca, Mg, Fe e Zn estão mais fortemente ligados à matéria seca, mesmo porque há a presença de resíduos brancos após as digestões, independentemente da estratégia empregada para a decomposição da amostra. Discussões mais aprofundadas sobre o que leva à formação dos resíduos brancos, após a decomposição, serão feitas adiante.

Para os processos de digestão conduzidos com mistura nítrico peróxido não foram observadas diferenças significativas para 95% de confiabilidade para nenhum dos elementos investigados. Assim, para o caso do uso de peróxido na digestão, a etapa de pré-digestão não leva a nenhum tipo de ganho na extração dos metais. Isto pode ser explicado pelo fato da digestão de material foliar seco com ácido nítrico e peróxido de hidrogênio em sistema aberto, levar a um eficiente rompimento das paredes das células vegetais, as quais são formadas por carboidratos (celulose). Isto, possivelmente, devido à reação de Ruff (Solomons, 2002). Nesta reação,

também denominada de degradação de Ruff, há a diminuição da cadeia carbônica de carboidratos previamente oxidados a ácidos carboxílicos pela ação de peróxido de hidrogênio na presença de Fe(III).

Uma vez que, para o sistema nítrico + peróxido, não foram observadas diferenças significativas para as concentrações de nenhum dos metais investigados, e que para as decomposições realizadas exclusivamente com ácido nítrico, os teores de alguns elementos estudados foram maiores, quando incorporada a etapa de pré-digestão, foi feita a comparação entre os resultados obtidos para as concentrações dos metais sob investigação empregando digestão em meio nítrico e nítrico + peróxido após digestão por 12 h em meio de ácido nítrico (Tabela 4.1). Nesta comparação pôde ser constatada diferença significativa para 95% de confiança apenas para o Al. Porém, não se acredita que os teores de alumínio determinados, empregando uma ou outra estratégia de digestão, tenham algum significado para este trabalho, visto que nenhum dos trabalhos publicados na literatura sobre composição inorgânica de espinafres traz qualquer informação sobre alumínio e nas condições de armazenamento das amostras no laboratório pode ter ocorrido alguma contaminação. De toda a sorte, o alumínio determinado deve estar relacionado ao elemento na forma de óxido, o qual é um colóide amorfo. Assim, o ataque com a mistura de ácido nítrico e peróxido de hidrogênio foi mais efetivo na dissolução da alumina.

Isto também explica o fato dos resultados para a concentração de alumínio terem apresentado as maiores dispersões (maiores desvios padrão relativos) quando aplicados os diferentes procedimentos de preparo de amostra. Em princípio, os procedimentos que poderiam ser comparados para a determinação de alumínio seriam aqueles sem a adição de peróxido de hidrogênio ou os outros dois com

peróxido de hidrogênio, pois estes procedimentos, dois a dois, exibiram resultados que não apresentaram diferenças significativas entre si. Ainda assim, existe uma variação muito grande no teor de alumínio determinado (Tabela 4.1), chegando esta variação a mais de 100%. Contudo, como mencionado anteriormente, após a mineralização, foi feita a filtração, pois pôde ser percebida a existência de pequenos cristais brancos. Em um primeiro momento, atribuiu-se a ocorrência dos precipitados à presença de silicatos, mas, diante dos resultados obtidos, pode-se também inferir a existência de alumínio no material residual.

O cálcio não apresentou grandes variações em seus resultados, somente o valor obtido com a pré-digestão, seguida da digestão na ausência de peróxido de hidrogênio, que diferiu significativamente dos demais, apresentando valor maior. É de conhecimento geral que o espinafre é um vegetal muito rico em cálcio, contudo não há muitas fontes que apresentem a composição inorgânica deste tipo de espinafre consumido no Brasil (espinafre da Nova Zelândia).

A determinação do teor de cobre mostrou resultados comparáveis entre si, não apresentando diferença significativa nos quatro procedimentos. É importante ressaltar também que, de todos os elementos pesquisados, o cobre é o que apresentou menor teor no espinafre. Vale salientar que o cobre é um dos elementos que tem menor índice de necessidade *ca.* 4 - 5 mg dia⁻¹.

Apesar de não ter sido realizada validação com material certificado de referência, os resultados obtidos deram uma idéia da composição inorgânica do espinafre produzido e comercializado no Brasil (*Tetragonia expansa*) mais especificamente o consumido na Bahia, também conhecido como espinafre da Nova Zelândia. Isto dado que na literatura não foram encontrados muitos estudos sobre este vegetal, ao contrário do que ocorre para o espinafre verdadeiro (*Spinacia*

oleracea) que tem alguns estudos sobre seu potencial nutritivo e composição inorgânica.

4.2 – Comparação dos teores de íons metálicos no espinafre

Como já mencionado, não há muitos dados na literatura sobre composição inorgânica do espinafre NZ consumido no Brasil (espinafre NZ). Na Tabela 4.2 são apresentados os teores de alguns elementos em espinafres NZ frescos cultivado no Sul do Brasil (Kawashima & Soares, 2003).

Tabela 4.2 – Teores de elementos metálicos em amostras de espinafre NZ expressos em mg / 100 g de matéria seca (nosso estudo) e fresca (Kawashima & Soares, 2003) e a razão (R) entre as concentrações na matéria seca e fresca.

Mineral	Matéria fresca	Matéria seca	R
K	537 ± 130	-	-
Na	94 ± 49	-	-
Ca	64 ± 21	945 ± 37	14,8
Mg	55 ± 16	680 ± 16	12,4
Fe	1 ± 0,8	24,4 ± 1,2	24,4
Mn	1 ± 0,8	27,0 ± 1,0	27,0
Cu	0,05 ± 0,03	1,21 ± 0,05	24,2
Zn	0,3 ± 0,1	9,9 ± 0,6	33,0

Como pode ser observado na Tabela 4.2, há uma diferença muito grande entre os valores encontrados nos dois estudos. Porém, deve ser observado que o teor de água é preponderante em um vegetal. Assim, como um dos estudos foi realizado em base seca e, o outro, em base fresca, não foi possível a simples comparação dos resultados. Dessa forma, foi feito o cálculo da razão (R), a qual foi calculada pela divisão da concentração de um dado metal na matéria seca (valor

obtido) pelo valor encontrado na literatura para matéria fresca. Para os diversos elementos analisados, o valor de R variou entre 12 e 33, quando seriam esperadas variações menos bruscas para R. Porém, apesar do espinafre analisado neste trabalho e no trabalho desenvolvido por Kawashima & Soares (2003) terem sido desenvolvidos com a mesma espécie botânica, existem outras causas para as variações no espinafre da Nova Zelândia, como a forma de cultivo, localização, práticas agrícolas, incidência de chuva, período da colheita, utilização de irrigação e condições de armazenamento e transporte. Estas observações levaram a ser pouco eficaz a busca por explicações sobre as diferenças nas concentrações. Contudo, muitos dos vegetais consumidos em Salvador, BA, são oriundos de municípios como Simões Filho, Dias d'Ávila e Camaçari, onde existem grandes empresas do setor siderúrgico e metalúrgicas. Este fato poderia ser explorado para explicar as maiores valores de R para metais como Fe, Cu, Zn e Mn.

Em um estudo realizado por Jaworska & Kmiecik (1999), foram comparados os teores para base seca e base fresca do mesmo material, e também a comparação para duas estações do ano. No referido estudo, pôde ser percebido como as variações supracitadas afetam significativamente a composição inorgânica pesquisada. Os teores encontrados são apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Concentração de metais na base seca e fresca em espinafre da Nova Zelândia e as razões de concentração (adaptado de Jaworska & Kmiecik, 1999)

Mineral	Estação do ano					
	Primavera			Outono		
	Fresca	Seca	R	Fresca	Seca	R
	mg / 100 g	mg / 100 g		mg / 100 g	mg / 100 g	
K	484	9200	19,0	272	5120	18,8
P	23	440	19,1	24	450	18,8

Ca	107	2030	19,0	106	2000	18,9
Mg	33	630	19,1	57	1070	18,8
Na	47	890	18,9	127	2390	18,8
Fe	3.5	70	20,0	4.8	90	18,8

Ao observar os dados da Tabela 4.3 foi possível constatar que fatores climáticos, estações do ano, base seca ou base fresca, entre outros, interferem significativamente nos resultados. Porém, deve ser destacado que os valores de R para os diferentes elementos sob investigação não apresentam grandes variações para uma dada época do ano. Neste contexto, avaliando os dados das Tabelas 4.2 e 4.3 poderia ser assumido que, na comparação das concentrações encontradas para os elementos investigados no presente estudo, foram drasticamente diferentes que os encontrados por Jaworska & Kmiecik (1999) e que os processos de digestão foram, portanto, inadequados. Porém, ao ser feita a comparação dos teores dos elementos na matéria seca produzida na primavera e matéria fresca para o espinafre produzido no outono (Tabela 4.3), os valores de R para os diferentes elementos também apresentariam forte variação (entre 10 e 50). Este fato demonstra a inexequibilidade do emprego do fator R ou mesmo das concentrações para comparações entre os resultados quando não se conhece exatamente onde, quando e como foi produzido o espinafre.

4.3 – Avaliação do nível de interação de metais com o espinafre da Nova Zelândia

Para avaliar como os metais estariam ligados ao espinafre produzido e consumido no Brasil e em outros países do hemisfério sul, decidiu-se fazer uma série de testes para avaliar a quantidade destes íons metálicos que seriam extraídos

em soluções com diferentes condições de pH. Para tanto, usou-se solução a pH 1, (solução 0,1 mol L⁻¹ de HCl); a pH 3, preparada pela mistura de HCl com solução de biftalato de potássio; a pH 5, preparada pela mistura de biftalato de potássio e NaHCO₃; a pH 7 (mistura de KH₂PO₄ e Na₂HPO₄). Foram também preparadas soluções de EDTA 0,1 mol L⁻¹ a pH 3, 5 e 7 a partir dos mesmos tampões já escritos. A determinação dos teores de metais nos extratos foi realizada por espectrometria de emissão ótica com plasma de argônio indutivamente acoplado (ICP OES).

Nas figuras abaixo, serão apresentados os percentuais dos diversos íons metálicos extraídos em soluções com diferentes valores de pH e na presença ou ausência de EDTA. Para facilitar a comparação dos resultados, foram excluídos os dados referentes aos extratos em solução a pH 1, devido à dificuldade de preparo de solução aquosa 0,1 mol L⁻¹ de EDTA neste pH.

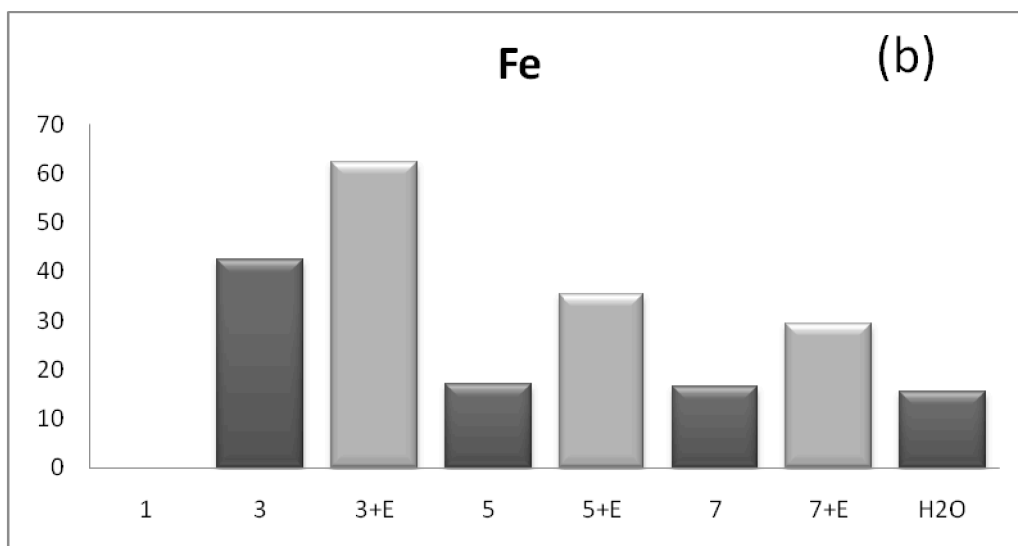
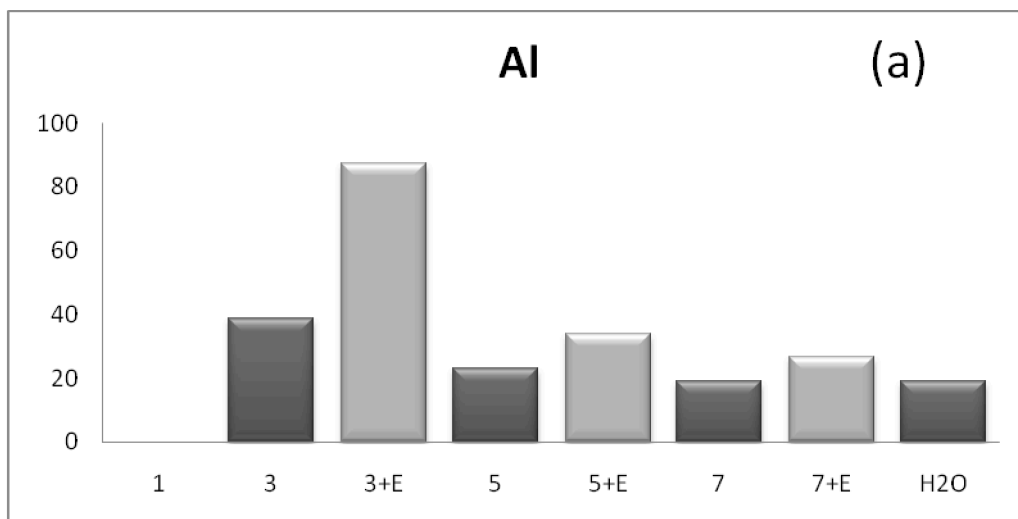


Figura 4.1 – Percentagem extraída em soluções de diferentes pH com ou sem EDTA. (a) Alumínio. (b) Ferro.

Pela Figura 4.1 foi possível perceber que alumínio e ferro apresentaram comportamentos semelhantes frente às diferentes soluções extratoras. Para ambos a maior eficiência de extração se deu em solução de EDTA a pH 3. Nesta condição, aproximadamente 90 % do alumínio foi extraído, enquanto que para o ferro a fração extraída foi de 65 %. A solução a pH 3 sem a presença do quelante (EDTA) permitiu a extração de ca. 40 % de Al e Fe, enquanto que os extratos com soluções a pH 5, 7 e água apresentaram níveis de eficiência muito próximos entre si (20 % para Al e 15 % para Fe). Soluções de EDTA a pH 5 e pH 7 conseguiram ser mais eficazes na extração que aquelas na ausência do quelante, permitindo extrair ca. 30 % de cada metal. Estes resultados podem ser discutidos com diferentes abordagens, porém, é conveniente fazer uma rápida passagem por equilíbrios em solução. Anteriormente, foi feita discussão sobre a ocorrência de resíduo branco após a digestão de amostras de espinafre, independentemente da estratégia de mineralização empregada. Também foi discutido que este resíduo poderia ser constituído de óxido de alumínio. Assim, foi feito um exercício teórico relacionando a solubilidade do óxido de alumínio em solução de EDTA a diferentes pHs. A curva de solubilidade do Al_2O_3 é apresentada na Figura 4.2.

Deve ser destacado que na construção da curva não foram levados em consideração os hidroxocomplexos de alumínio. Obviamente que os valores apresentados para solubilidade não têm significância experimental, pois jamais seriam observados aqueles valores de concentração como solubilidade (Figura 4.2), mas é interessante fazer uma avaliação sobre o comportamento da solubilidade do óxido em solução de EDTA na faixa de pH de 2 a 7. Além disto, é manifesto que a solubilidade do $\text{Al}(\text{OH})_3$ aumenta em soluções mais ácidas (com pH mais próximos de zero). Contudo, em solução de EDTA $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, a máxima solubilidade foi

calculada para pH 3,5. Para soluções com pH inferiores, a solubilidade é regida pela acidez do meio enquanto que para soluções com pH superior a 2,0 a contribuição do quelante é mais evidente. Ao comparar os resultados dos cálculos com o medido experimentalmente (Figura 4.1a), nota-se que na ausência ou presença do complexante (EDTA) a maior taxa de extração de Al ocorreu em solução a pH 3, porém, neste pH, a contribuição do EDTA para a extração dos íons Al(III) é significativa e preponderante. Neste contexto, não há como descartar a possibilidade do Al presente no espinafre estar na forma de óxido.

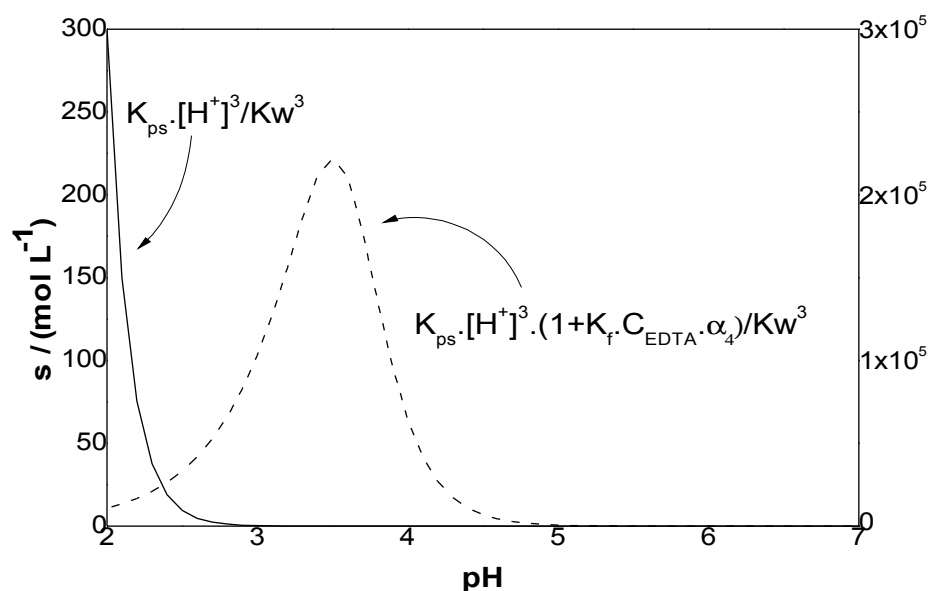


Figura 4.2 – Solubilidade do Al_2O_3 em diferentes pH na presença e ausência de EDTA.

Da mesma forma que para o alumínio, também foi feito para o ferro um exercício teórico para relacionar a solubilidade do $\text{Fe}(\text{OH})_3$ em solução de EDTA a diferentes pHs. Os resultados deste exercício são apresentados, como curva de solubilidade, na Figura 4.3. Assim, foi possível observar que a solubilidade do $\text{Fe}(\text{OH})_3$ em soluções a pH inferior a ca. 2,5 seria regida quase que exclusivamente

pela acidez da solução, caracterizando que quanto menor o pH, maior a solubilidade do $\text{Fe}(\text{OH})_3$. Contudo, em solução de EDTA $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, a solubilidade máxima foi calculada para pH 3,5, evidenciando que, para pH superiores a 2,5, a contribuição do quelante é preponderante sobre a acidez do meio. Quando comparado estes cálculos teóricos com o resultado experimental, foi possível constatar que realmente a melhor extração para o Fe aconteceu em solução de EDTA a pH 3 (Figura 3.1b), confirmando que prevaleceu a contribuição do quelante sobre a acidez do meio. Desta forma, não há como descartar a possibilidade dos íons Fe estarem presente na matéria seca do espinafre na forma de Fe_2O_3 .

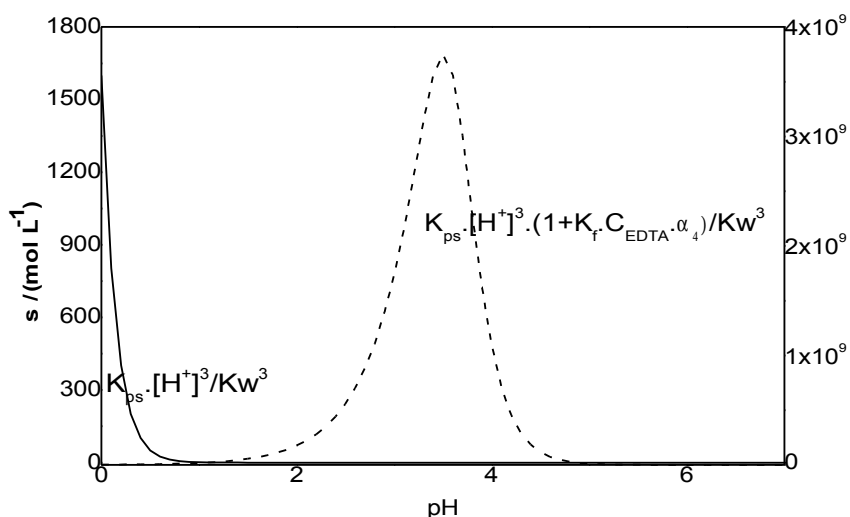


Figura 4.3 – Solubilidade do $\text{Fe}(\text{OH})_3$ em diferentes pH na presença e ausência de EDTA.

Na Figura 4.4 pôde ser observado a percentagem de íons metálicos extraída em diferentes valores de pH para cobre e manganês, tomando como parâmetro a concentração de íon metálico determinada experimentalmente. Pôde-se notar que para os dois metais não houve muita diferença para as extrações em

diferentes pH. Para o cobre, a extração a pH 5 se aproximou de 100 %, enquanto que a extração em água ficou em torno de 60 %. Aproximadamente 80 % de cobre foram extraídos para todas as outras condições de extração (Figura 4.4a). Para o manganês a solução a pH 5 com EDTA chegou próximo a 80 % de extração e, em água, foi de 45 %. Para as outras soluções, a extração foi de ~70 % (Figura 3.4b). Neste contexto, foi possível inferir que o cobre está fracamente ligado a matéria seca do espinafre, pois com as condições de extração mais brandas (extração em água) foi possível extrair ~ 60% de Cu^{2+} presente no espinafre.

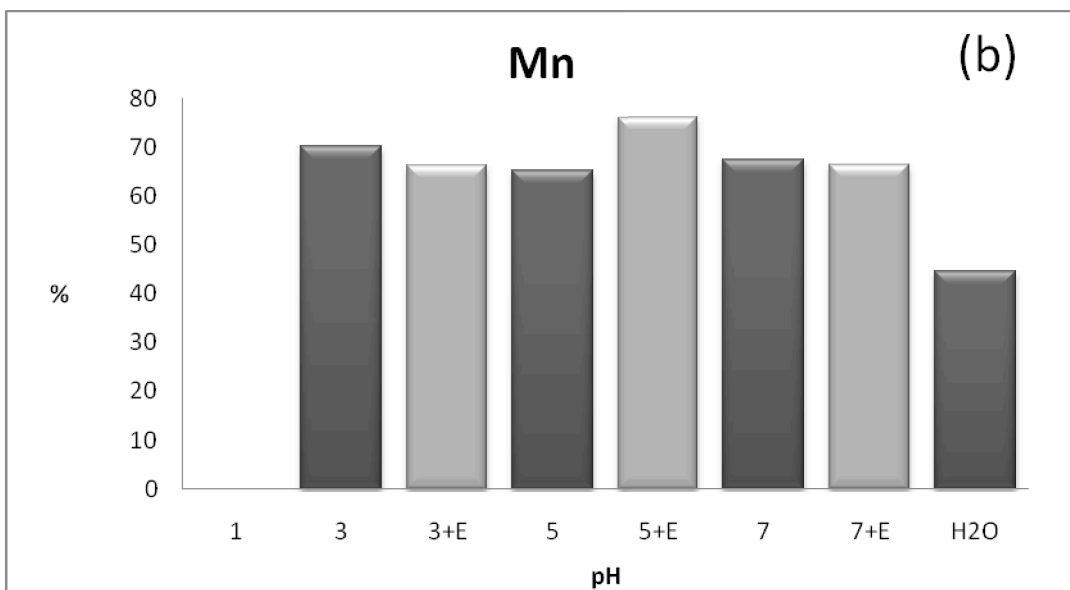
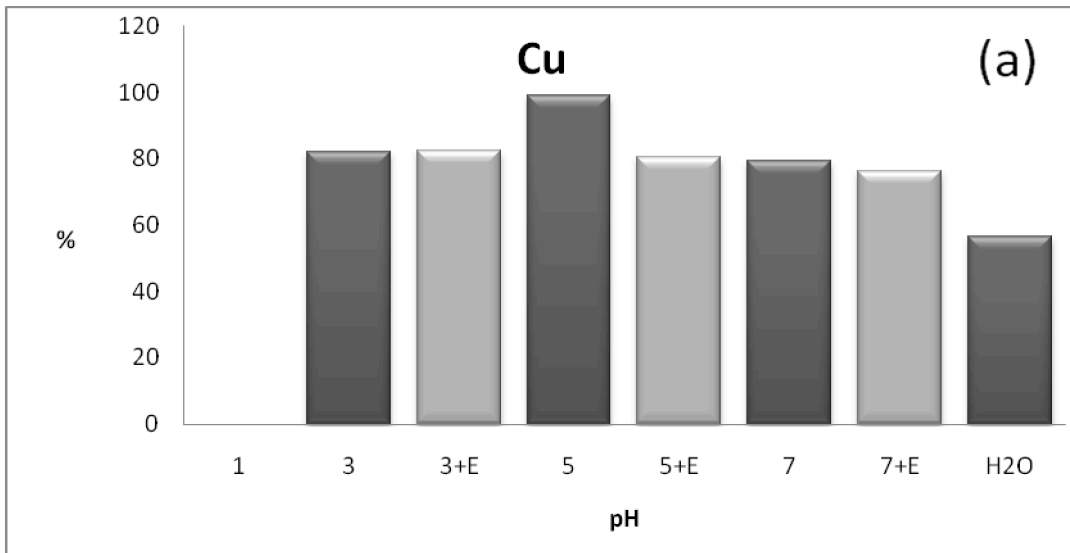


Figura 4.4 – Porcentagem de íons metálicos extraídos em soluções de diferentes pH com ou sem EDTA. (a) Cobre (b) Manganês.

O manganês também apresentou boa disponibilidade, contudo suas interações com a matéria seca se mostraram mais marcantes do que as interações

do cobre, já que, para as mesmas condições de extração, foi possível extrair uma quantidade sempre menor de manganês.

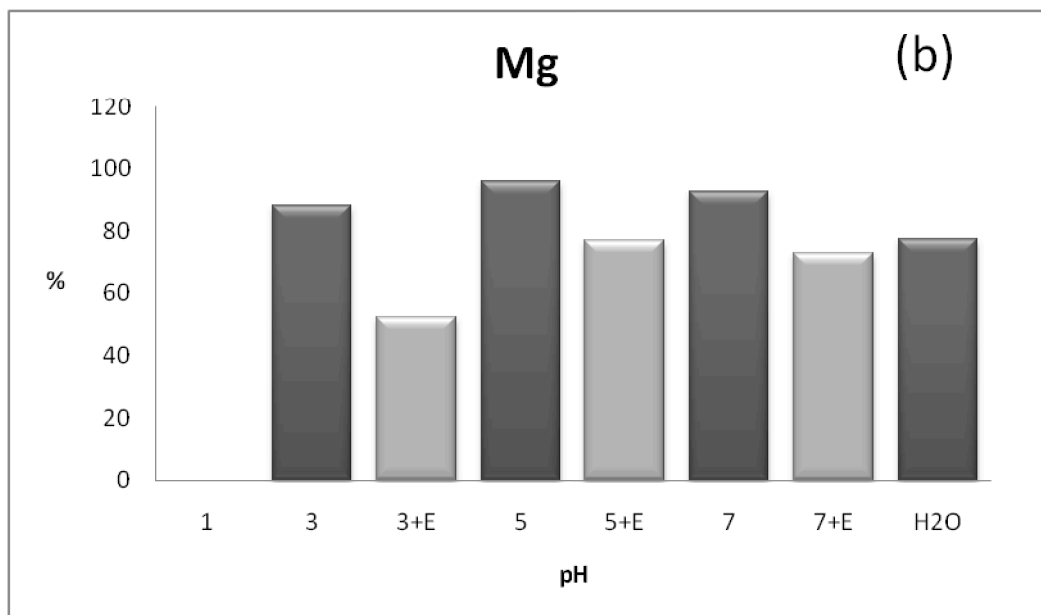
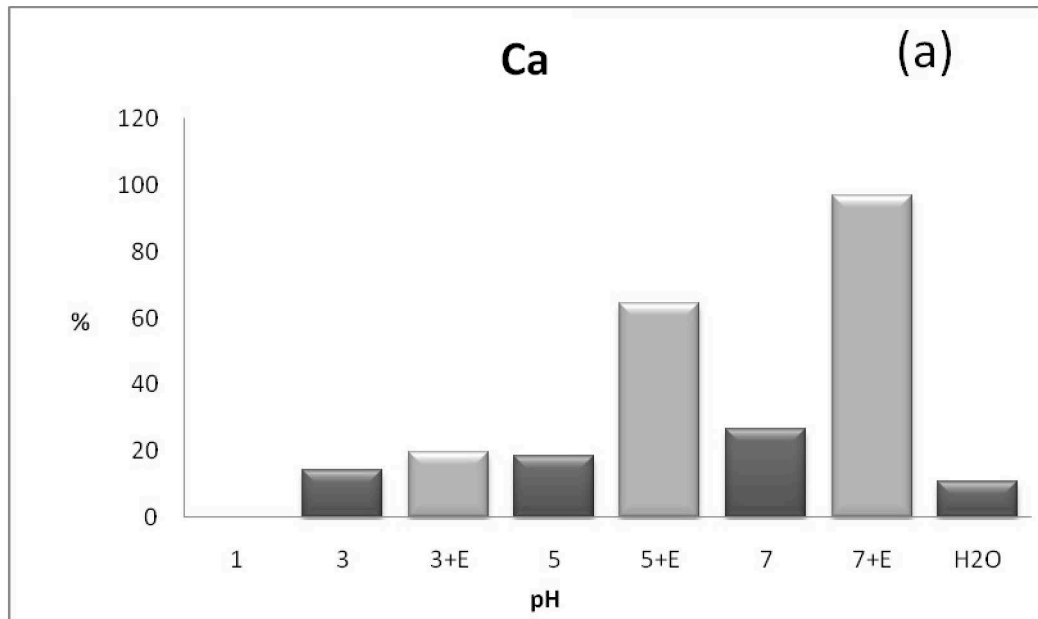


Figura 4.5 – Porcentagem de íons metálicos extraídos em soluções de diferentes pH com ou sem EDTA. (a) Cálcio. (b) Magnésio.

Na Figura 4.5 está apresentada a fração de cálcio e magnésio extraída em diferentes pH. Para os íons magnésio, houve uma boa eficiência na extração para a maioria das soluções, sendo a solução a pH 3 com EDTA aquela que apresentou menor eficiência de extração (~50 %), como pode ser observado na Figura 4.3.b. A máxima extração de Mg^{2+} ocorreu em solução a pH 5 sem EDTA (96 %). As extrações com soluções a pH 3 e sem EDTA permitiram extrair ~ 90 % de íons magnésio e as extrações em pH 5 e 7 com EDTA e em água ficaram em torno de 80 % de extração de magnésio. Com estes resultados foi possível constatar que o magnésio, dentre os metais pesquisados, é o elemento que tem interações mais fracas com a matéria seca do espinafre, já que a eficácia da extração em água chegou a 80% de íons Mg^{2+} . Adicionalmente, pôde-se inferir que o magnésio apresentou a maior disponibilidade entre os elementos investigados.

Ao observar a Figura 4.5a foi possível notar que o cálcio, ao contrário do magnésio, está fortemente ligado à matéria seca do espinafre devido à pouca efetividade da extração com a maioria das soluções. Apenas para as extrações com soluções de EDTA a pH 5 ou 7, foram observadas boas eficácias na extração de cálcio (> 50 %). As extrações com solução a pH 3 e com água foram pouco eficazes para o deslocamento do cálcio para a solução (~10 %). Contudo este comportamento do cálcio diante das diferentes soluções extratoras pode ser explicado pela comparação dos resultados obtidos experimentalmente com os valores teóricos calculados para solubilidade do oxalato de cálcio (Figura 4.6) em solução de EDTA a diferentes pHs.

No estudo teórico, as maiores solubilidades para o oxalato de cálcio ocorreram em solução de EDTA 0,1 mol L⁻¹ para valores de pH superiores a 6. E como pode ser observado na Figura 4.6, é a partir deste pH que a contribuição do complexante (EDTA) se torna preponderante em relação ao pH do meio. Já para soluções aquosas na ausência do quelante, a solubilidade do cálcio é um pouco mais expressiva apenas para pH menor que 1. Adicionalmente, soluções com níveis de acidez no intervalo de pH 1 a 7 apresentaram valores de solubilidade relativamente baixos, independente da presença de EDTA em solução. Esta avaliação teórica foi concordante com os resultados obtidos experimentalmente; já que a solução que apresentou melhor eficácia na extração do cálcio foi a solução de EDTA 0,1 mol L⁻¹ a pH 7,0, seguida da solução de EDTA 0,1 mol L⁻¹ a pH 5,0. Para as demais soluções, não houve boa eficácia nas extrações, confirmando o que foi observado no estudo teórico para os níveis de acidez entre pH 1 a 7. Neste contexto, foi possível inferir que são grandes as probabilidades do cálcio presente no espinafre estar predominantemente na forma de oxalato, isso explicaria sua baixa disponibilidade no vegetal.

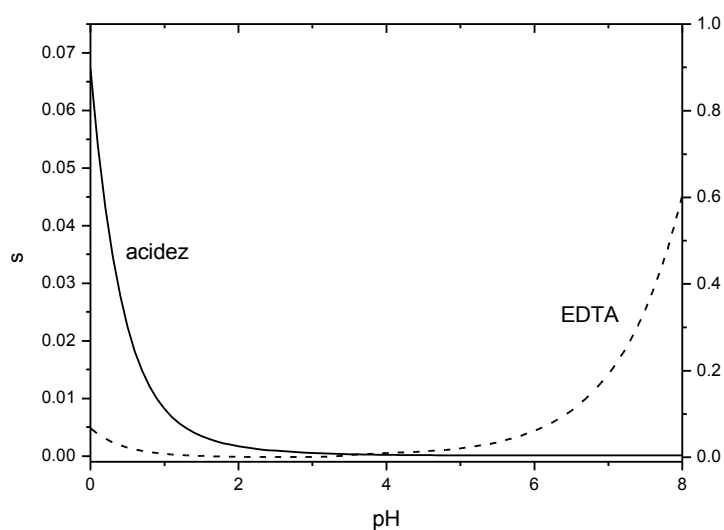


Figura 4.6 – *Solubilidade do oxalato de cálcio em diferentes valores de pH na presença e ausência de EDTA.*

Estes resultados podem expressar também como estes elementos estão em relação à assimilação pelo organismo (disponibilidade), já que no estômago o pH é ~ 2. Assim pode-se ter uma idéia de quanto de cada mineral estaria disponível para o organismo a partir do consumo de espinafre. Foi possível perceber que a maioria das interações dos metais com espinafre se dá por complexação e não por ligações mais fortes como ligações covalentes. Pôde-se também observar que o cálcio foi o metal presente na matéria seca com menor disponibilidade, pois sua extração só foi eficiente em soluções de EDTA, o qual tem uma alta constante de complexação com o cálcio, enquanto que magnésio, cobre e manganês apresentaram-se como os elementos mais disponíveis, pois foi observada boas eficiências de extração com todas as soluções avaliadas (> 60 %).

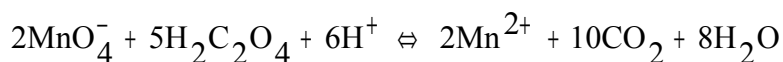
Foram feitos também testes de extração em pH 1 que se mostraram muito eficientes para todos os metais, chegando a extrair aproximadamente 100 % de todos os elementos, principalmente o alumínio que atingiu a incrível faixa de 300% de extração, o que indica a possibilidade de contaminação. Até mesmo o cálcio que não mostrou boas extrações em soluções livres de EDTA, apresentou os maiores valores de extração em solução a pH 1, aproximadamente 100%.

4.4. Teor de oxalato presente no espinafre

Os oxalatos estão presentes em diferentes vegetais, sendo facilmente encontrados na forma aquossolúvel, como potássio, sódio e amônio, além de oxalatos insolúveis como oxalato de cálcio. O oxalato apresenta forte interação com o íon cálcio ($pK_{ps} = 7,9$; $\log \beta_1 = 1,66$; $\log \beta_2 = 2,69$), diminuindo a disponibilidade

deste íon para absorção e assimilação no organismo. É conveniente lembrar que precipitados como o CaC_2O_4 acumulam-se nos glomérulos renais, contribuindo para o desenvolvimento de distúrbios neste órgão (Judprasong et al, 2006).

A permanganatometria foi empregada para a determinação de espécies possíveis de oxidação pelo permanganato de potássio em meio ácido, cujo potencial padrão de redução é 1507 mV (Harris, 2005). O oxalato é uma das espécies químicas possíveis de extração da amostra de espinafre e que reagiria com solução padronizada de KMnO_4 em meio sulfúrico, como apresentado na equação química abaixo:



A solução de $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ de KMnO_4 foi previamente padronizada contra oxalato de sódio, o qual foi antecipadamente seco em estufa até massa constante. Assim, a extração das espécies oxidáveis pelo permanganato a partir de amostra de espinafre foi realizada tomando 1,0000 g da amostra e realizando a extração com 100 mL das diferentes soluções extratoras avaliadas. Após 30 min sob agitação, foi feita a filtração e o extrato avolumado para 250 mL. Nestes estudos, foram avaliados os teores de espécies passíveis de oxidação pelo permanganato e extraída em solução a pH 1, 2, 3 e em água desionizada. Os resultados são apresentados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 – Teor de espécies oxidáveis pelo permanganato nos extratos de espinafre obtidos em diferentes condições de acidez (expresso como oxalato em mg g^{-1} de matéria seca).

pH da Solução Extratora	Espécies oxidáveis extraídas (mg g^{-1})	Número de réplicas
-------------------------	---	--------------------

1	279 ± 8	4
2	299 ± 17	3
3	284 ± 6	2
H ₂ O	251 ± 1	2

Os resultados apresentados na Tabela 4.4 revelaram não haver diferenças significativas (95% de confiança) para os teores de espécies oxidáveis pela solução de permanganato de potássio nos extratos a pH 1, 2 e 3. Por outro lado, a concentração de material oxidável presente no extrato aquoso foi significativamente menor que o obtido para pH 3, por exemplo. Estes resultados não poderiam ser explicados se o oxalato fosse a única espécie química extraída capaz de ser oxidada pelo KMnO₄, uma vez que os maiores teores de espécies oxidáveis foram obtidos para os extratos com soluções de maior acidez. Para os íons oxalato, o aumento da acidez da solução extratora levaria ao aumento da fração na forma de H₂C₂O₄, enquanto que as espécies HC₂O₄⁻ e C₂O₄²⁻ seriam predominantes em meios de menor acidez. É certo que (i) a eficiência de extração de oxalatos solúveis é maior em soluções de menor acidez, pois, nestas condições, prevalece o oxalato em suas formas aniônicas; e, (ii) pelo procedimento realizado (titulação) o oxalato em quaisquer das formas seria oxidado a CO₂, visto que a adição de alíquota de H₂SO₄ para efetuar em bom termo a titulação com permanganato de potássio, era feita após a filtração do resíduo e tomada de alíquota daquele extrato. Porém, caso houvesse a predominância no espinafre de oxalatos insolúveis, como, por exemplo, na forma de CaC₂O₄, a eficiência de extração de oxalato para a solução extratora seria maior em meio de maior acidez. No último caso, os resultados obtidos estariam plenamente justificados. Contudo, pelo fato de não poder ser creditado exclusivamente aos oxalatos os valores de concentração de espécies potencialmente oxidáveis pelo

permanganato e ao assumir que outros compostos orgânicos poderiam ser protonados e extraídos para a solução em condições de maior acidez, optou-se por adicionar solução saturada de CaCl_2 ao extrato para a precipitação, separação e monitoração do oxalato presente no espinafre.

Em princípio, além do oxalato, outros ânions como carbonato ($\text{pKps} = 8,22$) e fosfato ($\text{pKps} = 6,58$) poderiam ser precipitados na forma de sais de cálcio. Porém, carbonato e fosfato não são oxidados pelo permanganato e, caso carbonato fosse extraído do material foliar seco com soluções a pH entre 1 e 3, este seria convertido e emanado na forma de CO_2 durante a extração, visto que a fração na forma de H_2CO_3 seria de 100% para pH 3. O fosfato por sua vez, durante a extração com solução a pH 1 estaria 98% na forma associada, enquanto que em pH 3 a fração associada decairia para *ca.* 12%. O H_3PO_4 estará distribuído entre a superfície do espinafre e a solução, de acordo com uma dada constante de partição. Assim, carbonato, fosfato e mesmo sulfato não são interferentes para o método de determinação de oxalato proposto (permanganatometria). Na Tabela 4.5 são apresentados os valores obtidos para oxalato extraído empregando a estratégia de precipitação do oxalato presente no extrato a diferentes níveis de acidez com CaCl_2 .

Tabela 4.5 – Teor de oxalato em extratos de espinafre

pH da solução extratora	Concentração de Oxalato (mg g^{-1})
1	66 ± 1
2	103 ± 4
3	99 ± 3
H_2O	109 ± 2

Para todas as condições de extração estudadas as concentrações de oxalato determinadas no extrato após precipitação na forma de oxalato de cálcio (Tabela 4.5) foram significativamente menores que as obtidas sem a incorporação da etapa de precipitação (Tabela 4.4). Isto pode ser explicado pelo fato de outros compostos, em especial, compostos orgânicos como algumas vitaminas (vitamina C e E) e ácidos carboxílicos (como o ácido fólico) presentes no espinafre, seriam total ou parcialmente extraídos para soluções ácidas e reagiriam com o permanganato afetando a seletividade do método selecionado. Também, com base nos resultados encontrados na Tabela 4.5, pôde ser constatado que a menor eficiência de extração de oxalato ocorreu a pH 1; o que foi justificado pelo fato de, neste pH, ca. 98% deste ânion está na forma de $H_2C_2O_4$ e, portanto, mantendo interações com espécies contidas na superfície das folhas secas de espinafre.

Ao comparar estes dados (Tabela 4.5) com valores encontrados na literatura (Savage et al., 2000), não foi observada diferença significativa entre os resultados obtidos. Assim, decidiu-se que as futuras extrações para a determinação da concentração de oxalato em espinafre seriam realizadas utilizando água como extrator. Isto, pois, não demandaria uso de reagentes, o que diminuiu riscos de contaminação e os custos operacionais.

4.4.1. Teor de oxalato presente no espinafre consumido no Brasil

O teor de oxalatos solúveis em água determinado experimentalmente no espinafre consumido no Brasil (espinafre da Nova Zelândia) foi $108 \pm 2 \text{ mg g}^{-1}$, o que representa 10,8 g em 100 g de matéria seca. Este valor está em acordo com dados da literatura. Para este tipo de vegetal, o teor de oxalato solúvel varia entre 7,5 e 12,2 g em 100 g de matéria seca (Savage et al., 2000). O teor de oxalato presente

depende da parte da planta utilizada, sendo que a acumulação de oxalato é maior nas folhas (parte do vegetal investigada neste estudo). Segundo Savage e colaboradores (2000), o teor de oxalato na matéria seca oriunda das folhas de espinafre da Nova Zelândia foi de 10,8 g / 100 g, coincidindo com o resultado obtido na presente investigação (10,85 g / 100 g de matéria seca).

4.4.2. Teor de oxalato presente no espinafre consumido em Portugal

Uma vez que o espinafre consumido no Brasil (espinafre da Nova Zelândia) difere do espinafre consumido em muitos países do Hemisfério Norte (espinafre verdadeiro), foram adquiridos maços de espinafre verdadeiro na cidade do Porto, Portugal, para viabilizar a comparação do teor de oxalato em ambos vegetais (*Spinacia oleracea* e *Tetragonia expansa*). O teor de oxalatos solúveis em água determinado experimentalmente no espinafre consumido em Portugal (espinafre verdadeiro) foi $18,9 \pm 0,4$ mg / 100 g de matéria seca. Embora para o espinafre verdadeiro existam mais dados na literatura que para o espinafre NZ, a maioria destes dados está relacionada à matéria fresca, na qual o teor de oxalato varia de 250 a 1760 mg / 100 g (Jaworska, 2005).

4.4.3. Comparação do teor de oxalato no espinafre NZ e espinafre verdadeiro

Amostras de espinafre verdadeiro e da Nova Zelândia (espinafre NZ) foram adquiridas e submetidas, em paralelo, ao procedimento de extração e determinação de oxalato. Os teores de oxalato solúvel no espinafre consumido no Brasil (espinafre NZ) e no consumido em Portugal (espinafre verdadeiro) foram determinados e os resultados são mostrados na Tabela 4.6.

Tabela 4.6 – Teor de oxalato solúvel, em g / 100g de matéria seca, em espinafre NZ e espinafre verdadeiro

Vegetal	Teor de oxalato solúvel g / 100 g
Espinafre da Nova Zelândia	12,0 ± 0,2
Espinafre verdadeiro	15,1 ± 0,1

Os valores encontrados para oxalato nas duas espécies de vegetais apresentam diferenças significativas para 95 % de confiabilidade, sendo que para o espinafre verdadeiro foi encontrado 25 % mais oxalato que no espinafre NZ. No entanto, a maioria dos dados reportados na literatura para o teor de oxalato solúvel nestas duas espécies vegetais indica uma maior concentração de oxalato no espinafre NZ. Porém, é pouco produtivo forçar conclusões a partir destes dados devido a (i) estes dados reportados serem relacionados à matéria fresca (Jaworska, 2005); (ii) impossibilidade de garantir os mesmos teores de água em ambos vegetais; e, (iii) as diferenças sazonais, climáticas e de solo entre países do hemisfério Norte e Sul. Porém, há autores, que mesmo fazendo referência à matéria fresca, defendem que o espinafre verdadeiro apresenta teor mais elevado de oxalato que o espinafre NZ. Para estes, os teores de oxalato solúvel estariam entre 276 e 505 mg / 100 g de matéria fresca para o espinafre NZ e entre 370 e 938 mg / 100 g para o espinafre verdadeiro (Jaworska & Kmiecik, 1999).

Na literatura há um estudo detalhado sobre a influência das variações sazonais sobre o teor de oxalato no espinafre NZ. Neste trabalho, foi afirmado que os teores médios mais elevados de oxalato solúvel foram encontrados em plantas colhidas em junho (verão) e, os menores, em setembro (Jaworska, 2005). Como na

presente pesquisa não foram observadas estas circunstâncias é aceitável a variação quanto à comparação das duas espécies dos vegetais.

3.5 - Avaliação do poder adsorativo do espinafre NZ para alguns íons metálicos

Os metais constituem um grupo de elementos largamente distribuídos na natureza e que exercem papel dos mais importantes no organismo. Eles atuam tanto na forma iônica quanto como associada a outros compostos: enzimas, hormônios, secreções e proteínas do tecido orgânico (Andrade et al, 2004). Por isso, é tão importante conhecer a composição de espécies metálicas dos alimentos. Contudo, determinar o teor total ingerido de um nutriente (metal), não é suficiente para saber o quanto deste metal poderá ser absorvido pelo organismo. Assim, são necessárias informações sobre a disponibilidade destes nutrientes para o organismo. Ao saber que nos alimentos, principalmente em vegetais, podem estar presentes compostos capazes de complexar metais é interessante investigar a capacidade do vegetal em assimilar íons metálicos, por exemplo. Este estudo sobre assimilação é de interesse tanto para os metais presentes no próprio vegetal, quanto na refeição como um todo.

Para tanto, testes de extração e adsorção de íons metálicos em espinafre NZ foram realizados de forma seqüencial, utilizando uma massa conhecida da matéria seca após extração em soluções aquosas, com diferentes níveis de acidez, de espécies metálicas e outras espécies como oxalato, vitaminas, entre outras. Após a extração, o material era exaustivamente lavado com água desionizada e imerso em solução contendo íons do metal de interesse. Em seguida, era feita nova filtração e avaliado quanto do íon metálico foi adsorvido pelo espinafre. O resíduo (espinafre) era mais uma vez lavado à exaustão e submetido as etapas de extração, seguida da

adsorção e determinação do teor de metal adsorvido. Este ciclo se repetiu, em média por dez vezes.

4.5.1 Avaliação do poder adsortivo do espinafre NZ para íons cobre

O cobre é classificado como um elemento essencial e encontrado em nível de traços. Ele exerce funções essenciais ao organismo, como: mobilização do ferro para a síntese de hemoglobina, além de estar na composição de diferentes enzimas, como citocromo C-oxidase, superóxido dismutase, monoamino-oxidase, etc (Andrade et al, 2004).

Mesmo sendo o cobre o elemento que apresentou menor teor no espinafre (Tabela 3.1), resolveu-se estudar se o espinafre teria a capacidade de adsorver uma quantidade maior de cobre do que aquela observada originalmente. Assim, foi realizado um estudo sobre a capacidade de enriquecimento de cobre no espinafre NZ. Os resultados médios para os 6 ciclos de adsorção do cobre utilizando como solução extratora uma solução aquosa de HCl a pH 1 e solução de Cu^{2+} $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o enriquecimento apresentaram valor médio de Cu^{2+} adsorvido de $0,8 \pm 0,3 \text{ mg g}^{-1}$. O cobre apresentou-se como o elemento com menor teor entre os nutrientes estudados no espinafre NZ, tendo sua concentração variado entre 0,011 e 0,013 mg g^{-1} . No entanto, nesta etapa do estudo, onde foram feitos os sucessivos ciclos de adsorção e dessorção de metais do espinafre, foi observado que o espinafre NZ foi capaz de adsorver $0,8 \text{ mg g}^{-1}$ de Cu^{2+} . Esta quantidade foi aproximadamente 60 vezes maior do que o teor original de cobre no espinafre NZ, o que dá indícios de que o espinafre da Nova Zelândia pode ser enriquecido com íons Cu^{2+} , o que seria aplicável como dieta para algum tipo específico de deficiência. É claro, que para

qualquer uma das situações levantadas, deverão ser realizados estudos mais aprofundados.

4.5.2. Avaliação do poder adsorativo do espinafre NZ para íons magnésio

O alto valor biológico dos vegetais folhosos depende do conteúdo de compostos inorgânicos pronunciados, especialmente de magnésio e ferro. O magnésio, especificamente, é um elemento presente no meio intracelular que apresenta também um papel fundamental em várias reações biológicas. O magnésio é ativador de sistemas enzimáticos que controlam o metabolismo de carboidratos, lipídeos, proteínas e eletrólitos; influencia a integridade e transporte pela membrana celular; media as contrações musculares e transmissões de impulsos nervosos, além de ser indispensável para a fixação de cálcio nos ossos, podendo causar ou agravar quadros de osteopenia e osteoporose em adultos e dificultar a calcificação correta dos ossos na infância e adolescência (Coudray et al., 2003). A ingestão dietética recomendada (IDR) para o magnésio é de 400 mg/dia e 310 mg/dia para homens e mulheres, respectivamente (Bürger-Mendonça, 2007).

Os resultados médios para os ciclos de adsorção do magnésio utilizando solução de Mg^{2+} $500 \mu g mL^{-1}$ para o enriquecimento, e como as soluções extratoras de HCl a pH 1 e solução de EDTA $0,1 mol L^{-1}$ a pH 7 foram obtidos valores médios de adsorção de Mg^{2+} de 7 ± 1 e $11 \pm 1 mg g^{-1}$, respectivamente. Foi possível observar que a extração com a solução de EDTA $0,1 mol L^{-1}$ a pH 7 apresentou um resultado mais expressivo durante os ciclos de adsorção. Após a aplicação do teste t para os dois conjuntos de dados com grau de confiabilidade de 95 %, constatou-se que os resultados de adsorção de íons magnésio para esta solução extratora foram significativamente maiores que os encontrados com extração em pH 1. Este

comportamento pode ser explicado se considerado que, em pH 1, parte do oxalato presente no material seco também será extraído, diminuindo, assim, a quantidade de compostos complexantes presentes no espinafre. No entanto, em solução de EDTA 0,1 mol L⁻¹ a pH 7, o oxalato permanece aderido à superfície do material seco e não migra para a solução, favorecendo assim um possível enriquecimento do vegetal com íons magnésio.

Para a adsorção realizada com extração em pH 1 o resultado foi bastante semelhante ao teor inicial de magnésio determinado experimentalmente no espinafre que foi de 6,8 mg g⁻¹, já com a extração em pH 7 + EDTA foi possível verificar uma adsorção mais pronunciada. Estes resultados dão uma idéia de que realmente o espinafre NZ poderia atuar como alimento que diminui a disponibilidade de alguns elementos como o magnésio, por exemplo. Este assunto já foi pesquisado anteriormente, no qual testes realizados em seres humanos demonstraram que a absorção de magnésio foi significativamente menor a partir de uma refeição servida com espinafres do que com uma refeição servida com couve, visto que os teores de ácido oxálico entre os dois produtos agrícolas são bem distintos (Bohn et al., 2004).

4.5.3. Avaliação do poder adsorativo do espinafre NZ para íons cálcio

O cálcio é um elemento fundamental presente no organismo humano e está envolvido em diferentes e importantes processos metabólicos: coagulação sanguínea, excitabilidade muscular e transmissão dos impulsos nervosos, contração muscular, ativação enzimática e secreção hormonal. O cálcio apresenta, como característica principal, participação na formação de ossos e dentes. O suprimento adequado de cálcio está diretamente relacionado à formação do osso, principalmente durante a infância e adolescência, sendo um dos fatores que auxiliam a maximização da massa óssea, contribuindo para a prevenção de riscos de

desenvolvimento de osteoporose e de fraturas na vida adulta e terceira idade. Se as quantidades adequadas de cálcio não estão sendo fornecidas pela dieta, o cálcio será mobilizado dos ossos para a corrente sanguínea, reduzindo, assim, seu conteúdo nos ossos e aumentando a fragilidade destes (Grudtner et al, 1997).

A literatura trás alguns estudos sobre alteração da biodisponibilidade de cálcio devido à presença de oxalato no alimento ou na composição da dieta. O oxalato diminui a absorção do cálcio por redução da solubilidade, pela formação do sal insolúvel, oxalato de cálcio. Sendo assim, é importante fazer uma abordagem química de como atua o espinafre NZ em relação à retenção de cálcio, indisponibilizando-o para assimilação pelo organismo.

Inicialmente, fez-se um teste para avaliar a capacidade de adsorção de Íons cálcio pelo espinafre da Nova Zelândia. Os resultados médios para os ciclos de adsorção do cálcio utilizando solução de Ca^{2+} $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o enriquecimento, e como as soluções extratoras de HCl a pH 1 e solução de EDTA $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 7 foram obtidos valores médios de adsorção de Ca^{2+} de $13,2 \pm 3,2$ e $17,7 \pm 3,1 \text{ mg g}^{-1}$ respectivamente.

Como pôde ser observado, analogamente ao que aconteceu com o magnésio, o material que sofreu extração com a solução de EDTA $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 7 apresentou um valor levemente maior para adsorção de íons cálcio durante os ciclos, provavelmente, pelo mesma justificativa anteriormente mencionada, ou seja, a menor extração de oxalato pela solução de EDTA $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 7. Contudo, aplicando o teste t para os dois conjuntos de dados e considerando o grau de confiabilidade de 95 %, não houve diferença significativa entre os dois procedimentos. Então, para efeito de novas comparações, foi usada a solução em

pH 1, pois esta envolve uma quantidade menor de reagentes e vidrarias, o que diminui os riscos de interferentes.

Para melhor avaliar o potencial do material em adsorver o cálcio, decidiu-se variar a concentração do íon metálico em solução usando-se então, soluções 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e mantendo-se fixa a solução extratora. Com esta estratégia, foi possível ponderar sobre possíveis efeitos cinéticos relacionados com a concentração do íon metálico em solução. Os resultados encontram-se na Tabela 4.7 e na Figura 4.7.

Tabela 4.7 – Adsorção de cálcio por espinafre NZ usando concentrações variadas do íon metálico em solução e solução em pH 1 como extratora

Parâmetro avaliado	Concentração Ca^{2+} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
	10	100	1000
$[\text{Ca}^{2+}]$ ads (mmol g^{-1} de amostra)	$0,0055 \pm 0,0005$	$0,026 \pm 0,002$	$0,33 \pm 0,08$
$[\text{Ca}^{2+}]$ ads (mg g^{-1} de amostra)	$0,22 \pm 0,02$	$1,04 \pm 0,08$	13 ± 3
Fração de Ca^{2+} ads (%)	59 ± 6	28 ± 2	9 ± 2

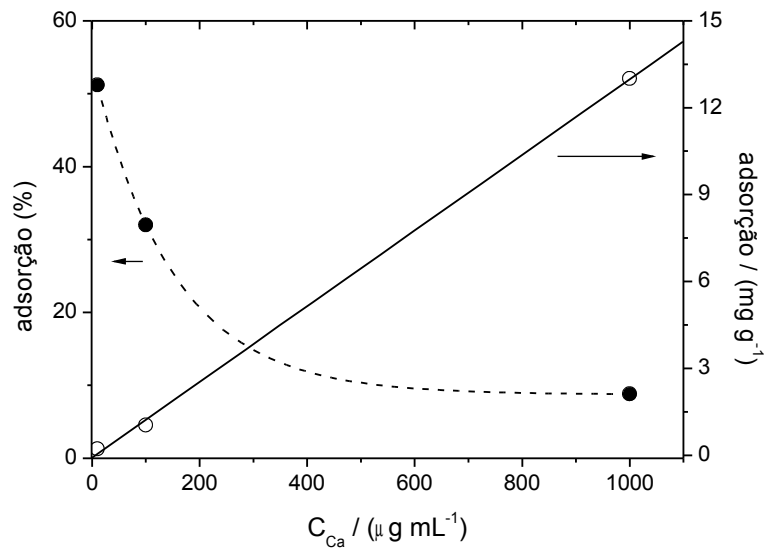


Figura 4.7 – Variação do percentual de íons cálcio adsorvido no espinafre para diferentes concentrações de íons Ca^{2+} em solução

Nestas condições, o espinafre NZ apresenta um comportamento bastante equilibrado frente às diferentes concentrações de Ca^{2+} em solução, pois, pela Figura 4.7 pode-se observar que a massa de cálcio adsorvida aumentou linearmente com o aumento da concentração de cálcio na solução, enquanto que a porcentagem de cálcio adsorvido foi diminuindo exponencialmente. Este comportamento evidencia que fatores cinéticos relacionados com a concentração de íons em solução estão diretamente envolvidos nos mecanismos de adsorção. Nesse contexto, para realizar o enriquecimento inorgânico de vegetais, como espinafre, estes fatores devem ser considerados e explorados intensamente.

Foi também realizada a comparação entre o potencial adsorvido do espinafre da Nova Zelândia, consumido no Brasil, com o espinafre verdadeiro consumido em Portugal, para esta comparação foi usada a solução de Ca^{2+} $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ e, como solução extratora HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Os resultados podem ser encontrados na Tabela 4.8.

Tabela 4.8 – Comparação da adsorção de cálcio por espinafre NZ e espinafre verdadeiro

<i>Amostra</i>	<i>Espinafre NZ</i>	<i>Espinafre verdadeiro</i>
Ca ²⁺ ads (mg g ⁻¹ de amostra)	1,04 ± 0,08	1,2 ± 0,2
Fração de Ca ²⁺ ads (%)	28 ± 2	33 ± 5

Com este resultado, foi possível notar que nestas condições o espinafre verdadeiro e o espinafre NZ apresentaram valores perfeitamente comparáveis para capacidade de adsorver íons cálcio, o que inviabiliza a afirmação de que existe diferença significativa entre o espinafre da Nova Zelândia e espinafre verdadeiro, principalmente quanto aos teores de oxalato que seria o principal complexante de cálcio no vegetal. Este resultado está concordante com o estudo sobre o teor de oxalato investigado nas duas espécies de vegetal, onde o espinafre verdadeiro apresentou um teor de oxalato levemente maior que o espinafre da Nova Zelândia.

Foi avaliada, também, a variação da solução extratora quanto à acidez e o tipo de ácido, com o objetivo de averiguar se o uso de um ácido com características oxidantes alteraria as propriedades adsorptivas da matéria seca do espinafre da Nova Zelândia. Os resultados encontram-se na Tabela 4.9.

Tabela 4.9 – Adsorção de cálcio por espinafre NZ usando soluções extratoras de diferentes ácidos minerais e solução de Ca²⁺ 10 µg mL⁻¹

<i>Parâmetro avaliado</i>	<i>Solução extratora</i>	
	HCl 1 mol L ⁻¹	HNO ₃ 1 mol L ⁻¹
[Ca ²⁺] ads (mg g ⁻¹ de amostra)	0,20 ± 0,02	0,16 ± 0,03
Fração de Ca ²⁺ ads (%)	54 ± 5	43 ± 8

Como se pôde observar a extração de cálcio no espinafre NZ com as soluções em HNO₃ 1 mol L⁻¹ e HCl 1 mol L⁻¹ apresentaram resultados comparáveis. Aplicando o teste t com o grau de confiabilidade de 95 % para os dois conjuntos de dados, foi constatado que não houve diferenças significativas entre os dois procedimentos. Contudo, foi possível perceber que para as extrações em solução de HCl o teor de cálcio adsorvido na matéria seca do espinafre foi levemente maior que quando empregado a solução de HNO₃. Também fazendo a comparação dos desvios padrão foi possível notar que houve variação menor nos valores obtidos com a solução de HCl como extratora. Desta forma, foi possível inferir que, ao empregar solução 1 mol L⁻¹ de HNO₃ como solução extratora durante as extrações seqüenciais, este ácido foi capaz de oxidar parcialmente alguns compostos complexantes, como o oxalato, que tem capacidade de reter o cálcio, e assim os ciclos de adsorção apresentaram valores com variação maior que quando empregado um ácido com características não oxidantes (HCl).

Para garantir um número maior de sítios disponíveis para a adsorção do íon metálico, e não interferir na adsorção oxidando os possíveis complexantes nas extrações seqüenciais do material, foi decidido usar uma solução ácida mais concentrada para fazer a primeira extração e em seguida repetir os ciclos com uma solução ácida mais diluída. Os resultados podem ser conferidos na Tabela 4.10.

Tabela 4.10 – Adsorção de cálcio por espinafre NZ usando soluções extradoras de diferentes ácidos minerais (1^a extração ácido a 50 % (v/v) e demais em ácido 0,1 mol L⁻¹) e solução de Ca²⁺ 10 µg mL⁻¹

Parâmetro avaliado	Solução extratora	
	HCl	HNO ₃
[Ca ²⁺] ads (mg g ⁻¹ de amostra)	0,31 ± 0,03	0,29 ± 0,04

Fração de Ca ²⁺ ads (%)	83 ± 8	77 ± 11
------------------------------------	--------	---------

Neste experimento, somente a primeira extração foi feita com o ácido a 50 % e as demais extrações foram feitas com ácido 0,1 mol L⁻¹. Desta forma, houve uma uniformidade maior nos resultados, e até a quantidade adsorvida para íons cálcio aumentou, saindo da faixa de 30 a 40 % para a faixa de 70 a 80 %, ou seja, dobrando a adsorção. Aplicando-se o teste t com 95 % de confiabilidade notou-se que não houve diferença significativa entre a adsorção usando como extrator soluções de HCl ou HNO₃. Foi possível observar, também, que a variação nos resultados de adsorção para o procedimento empregando a solução de HNO₃ foram mais sutis que no item anterior demonstrando possivelmente que o HNO₃, nestas condições, não foi capaz de oxidar os compostos quelantes presentes no espinafre da Nova Zelândia.

Adicionalmente, é apresentado na Tabela 4.11 os teores adsorvidos para os três metais investigados neste estudo (cobre, magnésio e cálcio). Pelos valores encontrados, foi possível ter uma idéia sobre a biodisponibilidade destes minerais para o organismo a partir do espinafre da Nova Zelândia.

Tabela 4.11 – Resultados para ciclos de extração (solução a pH 1) e adsorção de íons metálicos (M²⁺) em 100 mg de matéria seca de espinafre NZ

Íon metálico adsorvido	Cu ²⁺ (100 µg mL ⁻¹)	Mg ²⁺ (500 µg mL ⁻¹)	Ca ²⁺ (1000 µg mL ⁻¹)
ads (mg g ⁻¹ de amostra)	0,8 ± 0,3	7 ± 1	13 ± 3
Fração ads (%)	6 ± 2	9 ± 1	9 ± 2

Com base nos resultados apresentados, foi constatado que o cálcio apresentou interações mais fortes que cobre e magnésio com a matéria seca do espinafre, apesar da concentração da solução de cálcio empregada (1000 µg mL⁻¹)

ter sido maior que as concentrações empregadas nos testes realizados com cobre ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) e magnésio ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$).

A possibilidade de enriquecimento do espinafre com cálcio, cobre e magnésio, mostrou-se, em princípio, perfeitamente aceitável, já que, durante os ciclos de adsorção destes metais investigados, foi possível adsorver quantidades maiores do que os teores originalmente presentes no espinafre. Os teores de íons metálico adsorvidos no espinafre foram praticamente iguais ao dobro do teor original para os íons cálcio e magnésio. Para o cobre, o aumento foi bem maior (60 vezes maior que o teor original).

Claro que quando se trata de enriquecimento de alimentos muitos fatores devem ser observados como as características do produto após o tratamento, principalmente características físicas e organolépticas. Adicionalmente, tem que se investigar qual melhor composto para ser utilizado em um tratamento de enriquecimento inorgânico e principalmente, se os nutrientes incorporados ao alimento vão estar disponíveis para o organismo. Com base nos estudos realizados (Figuras 4.4 e 4.5), parte significativa do magnésio e do cobre contido neste suposto espinafre enriquecido seria facilmente liberada para o organismo. Porém, a liberação do cálcio para assimilação pelo organismo seria pouco provável, visto que o espinafre (através do oxalato) age efetivamente como um sequestrador de íons cálcio.

5 – CONCLUSÕES

Este trabalho visou avaliar quimicamente fatores nutricionais e antinutricionais associados ao espinafre da Nova Zelândia, o qual é produzido e consumido no Brasil. Assim, foi realizada uma série de testes para averiguar quanto e como alguns nutrientes estão associados às folhas deste vegetal. Primeiramente, foram avaliadas diferentes estratégias de digestão para obter informações preliminares (termodinâmicas e cinéticas) sobre o tipo de interação de alguns íons metálicos com a matéria seca do espinafre. Todas as estratégias pesquisadas para digestão da matéria seca de espinafre mostraram-se igualmente eficientes para a determinação das concentrações dos metais investigados, exceto para o alumínio. Neste caso, devido ao fato da concentração de alumínio medida após digestão com ácido nítrico e peróxido de hidrogênio, ser maior que àquelas obtidas na ausência de peróxido, evidencie (i) contaminação ou (ii) que o alumínio está ligado à matéria seca por interações mais fortes (covalentes), as quais necessitam de condições mais drásticas para a liberação do metal. Como destacado foi considerada a possibilidade de contaminação com alumínio durante o processo de digestão, o que concordaria com a elevada dispersão dos resultados (altos valores de desvio padrão), e também com o valor extremamente elevado extraído com soluções a pH 1, onde foram aplicadas condições muito mais brandas do que as empregadas nas digestão e, ainda assim, foram obtidas eficiências de extração de incabíveis 300%. Porém, para os demais elementos não houve diferenças acentuadas nas concentrações determinadas após a aplicação dos diferentes procedimentos de digestão, indicando que a digestão nítrica foi suficiente para disponibilizar os metais (Ca, Fe, Mn, Mg, Zn e Cu) para a solução a partir de amostra seca de espinafre da nova Zelândia. Adicionalmente pôde ser constatado que, nos testes de extração de metais em

soluções a pH 3, 5 e 7, com ou sem a adição de EDTA, Mg, Cu, Mn e Zn têm ligações fracas com a matéria seca do espinafre, pois foram facilmente extraídos independentemente do pH e da presença de quelante. Foi constatado que os íons cálcio e ferro estavam mais fortemente associados à matéria seca do espinafre NZ, pois o cálcio somente pôde ser extraído em soluções de EDTA na menor condição de acidez avaliada (pH 7), enquanto que a maior taxa de extração de Fe da amostra de espinafre também se deu em solução de EDTA a pH 3.

Na sequência das investigações foi avaliada a participação dos íons oxalato na interação com os metais em estudo. Para tanto, foi feita a determinação do teor de oxalato em amostras da matéria seca de espinafre da Nova Zelândia e, para fins de comparação, em espinafre verdadeiro. Assim, foi desenvolvida metodologia analítica para a determinação de oxalato em espinafre livre da interferência de outras espécies redutoras presentes nos extratos (como clorofila, ácidos orgânicos, vitaminas, entre outras). O método foi baseado na adição de alíquota de solução de CaCl_2 para precipitação do analito na forma de oxalato de cálcio, para posterior separação, dissolução em meio ácido e titulação com solução padronizada de KMnO_4 . Os valores determinados para teor de oxalato no espinafre consumido na Bahia (espinafre NZ) foram comparados com o teor no espinafre verdadeiro, sendo este último o mais rico em oxalato. Contudo, a concentração de oxalato determinada nas amostras secas de espinafre NZ foi elevada e concordante com as reportadas em outros trabalhos. O oxalato mostrou capacidade de interação com o cálcio e o ferro, através de reações de complexação (Ca^{2+} e Fe^{3+}) e precipitação (Ca^{2+}). Como uma fração dos oxalatos foi dissolvida (lixiviados) em água; e, sendo o oxalato um ânion derivado de ácido fraco, a extração do oxalato seria dificultada em meio com maior acidez, devido a formação de ácido oxálico e a partição deste entre o sólido e

a solução. Finalmente, ensaios de adsorção foram realizados com íons Ca, Cu e Mg, sendo confirmada a forte interação entre o oxalato presente no espinafre e os íons cálcio, apesar das sucessivas, exaustivas e seqüenciais lavagens da amostra com água e soluções ácidas. Ainda, pôde ser constatada, nesta etapa da investigação, a possibilidade de enriquecer em 100% os teores de cálcio e magnésio em amostras do espinafre consumido no Brasil. Porém, diferentemente do que foi observado para o magnésio, não pode ser garantida a disponibilidade do cálcio adsorvido para assimilação pelo organismo. O maior fator de enriquecimento foi observado para os íons cúprico (até 60 vezes maior que o original).

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, A.; YIN, X.; SHEN, H.; YE, Y.; GU, X. 1,10-Phenanthroline as a complexing agent for on-line sorbent extraction/preconcentration for flow injection-flame atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v.392, p.283-289, 1999.

ANDRADE, E. C.B.; TEODORO,A.J; TAKASE, I. Determination of copper in different extracts in samples of A and B vegetables. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.24 n.2, 2004.

BAG, H.; LALE, M.; TURKE, A. R.Determination of iron and nickel by flame atomic absorption spectrophotometry after preconcentration on *Saccharomyces cerevisiae* immobilized sepiolite. *Talanta*, v.47, p. 689–696, 1998.

BARUFFALDI, R.; OLIVEIRA, M. N. Fundamentos de tecnologia de alimentos. São Paulo, Atheneu, v. 3, p. 567, 1998.

BALLEY, S. E.; OLIN, T. J.; BRIKA, R. M.; ADRIAN, D. D. A review of potentially low-coast sorbents for heavy metals. *Water Research*, v.33, p. 2469-2479, 1999.

BASSET, J.; DENNEY, R. C.; JFFERY, G. H. ; MENDHAN, J. Vogel – Análise Inorgânica Quantitativa, 4ª edição, Rio de Janeiro, 1981.

BECEIRO-GONZAÈLEZ, E.; TABOADA-DE LA CALZADA, A.; ALONSO-RODRÍGUEZ, E.; LÓPEZ-MAHÍA, P.; MUNIATEGUI-LORENZO, S.; PRADA-RODRÍGUEZ D. Interaction between metallic species and biological substrates: approximation to possible interaction mechanisms between the alga *Chlorella*

vulgaris and arsenic(III). Trends of Analytical Chemistry. v.19, n.8, p.475-480, 2000.

BOHN, T.; DAVIDSSON, L.; WALCZYK, T.; HURRELL, R.F. Fractional magnesium absorption is significantly lower in human subjects from a meal served with an oxalate-rich vegetable, spinach, as compared with a meal served with kale, a vegetable with a low oxalate content. British Journal of Nutrition, v.91(4) p.601-606, 2004.

BÜRGER-MENDONÇA, M. Magnesium, immune system and exercise of ultra-endurance. Brazilian Journal of Biomotricity, v. 1, p 6-12, 2007.

CAÑIZARES-VILLANUEVA, R. O. Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. Revista Latinoamericana de Microbiología. v.42, p.131-143, 2000.

CASÉ, F.; DELIZA, R.; ROSENTHAL A.; MANTOVANI, D.; FELBERG, I. Produção de 'leite' de soja enriquecido com cálcio. Ciência e Tecnologia de Alimentos. 25(1), p. 86-91, 2005.

CASSELLA, R. J.; SALIM, V. A.; JESUÍNO L. S.; SANTELLI, R. E.; FERREIRA S. L.C.; de CARVALHO, M. S. Flow injection determination of cobalt after its sorption onto polyurethane foam loaded with 2-(2-thiazolylazo)-*p*-cresol (TAC). Talanta v.54, n.1, p.61–67, 2001.

CIB - CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA - Em dia com a ciência, <http://www.cib.org.br>, acesso em 25/02/2009.

COUDRAY C.; Demigne, C.; Rayssiguier, Y. Effects of Dietary Fibers on Magnesium Absorption in Animals and Humans. Recent Advances in Nutritional Sciences, 2003.

FATIBELLO-FILHO, O.; VIEIRA, I. C. Uso Analítico de Tecidos e de Extratos Brutos Vegetais como Fonte Enzimática, Química Nova, São Paulo, 2002.

GODLEWSKA-ZYLKIEWICZ, B. Biosorption of platinum and palladium for their separation preconcentration prior to graphite furnace atomic absorption spectrometric determination. Spectrochimica Acta Part B 58, p. 1531–1540, 2003.

GUPTA, K.; BARAT, G. K.; WAGLE, D. S.; CHAWLA, H. K. L. Nutrient Contents and Antinutritional Factors in Conventional and Non-conventional Leafy Vegetables. Food Chemistry. v.31 p.105-116, 1989.

GRUDTNER V.S.; WEINGRILL P.; FERNANDES A.L.. Aspectos na absorção no metabolismo do cálcio e vitamina D. Revista Brasileira de Reumatologia. 37(3): 143-151, 1997.

HARRIS, D. C. Análise Química Quantitativa, 6ª edição, Rio de Janeiro, 2005.

INFORMAÇÕES BOTÂNICAS, JARDINAGEM E PAISAGISMO
www.jardineiro.net/br/index.php, acesso em 21/02/2009.

JAWORSKA, G. Content of nitrates, nitrites, and oxalates in New Zealand spinach. Food Chemistry. v.89, p.235–242, 2005.

JAWORSKA, G. Nitrates, nitrites, and oxalates in products of spinach and New Zealand spinach. Effect of technological measures and storage time on the level

of nitrates, nitrites, and oxalates in frozen and canned products of spinach and New Zealand spinach. Food Chemistry. v.93, p.395–401, 2005.

JAWORSKA G.; KMIĘCIK W. Content of selected mineral compounds, nitrates III and V, and oxalates in spinach (*spinacia oleracea* L.) and new zealand spinach (*tetragonia expansa* murr.) From spring and autumn growing seasons. Food Science and Technology. v. 2, 1999.

JESUS, D. S.; CASSELLA, R. J.; FERREIRA, S. L. C. ; COSTA, A. C. S.; DE CARVALHO, M. S.; SANTELLI, R. E. Polyurethane foam as a sorbent for continuous flow analysis: Preconcentration and spectrophotometric determination of zinc in biological materials. Analytica Chimica Acta, v.366, 263-269, 1998.

JOLY, A. B. Botânica: chaves de identificação das famílias de plantas vasculares que ocorrem no Brasil, Companhia Editora Nacional, 1970.

JUDPRASONG, K; CHAROENKIATKUL, S; SUNGPUAG, P; VASANACHITT, K; NAKJAMANONG, Y. Total and soluble oxalate contents in Thai vegetables, cereal grains and legume seeds and their changes after cooking. Journal of Food Composition and Analysis 19, p. 340–347, 2006

KAWASHIMA, L. M.; SOARES, L. M. V. Mineral profile of raw and cooked leafy vegetables consumed in southern Brazil. Journal of Food Composition and Analysis. v.16, p.605-611, 2003.

KRAUSE, M.V.; MAHAN, L.K. Alimentos, Nutrição e Dietoterapia. 7ª ed., Ed Roca, São Paulo , 1991.

- LEMOS, V. A.; DOS SANTOS, W. N. L.; SANTOS, J. S.; DE CARVALHO, M. B. On-line preconcentration system using a minicolumn of polyurethane foam loaded with Me-BTABr for zinc determination by Flame Atomic Absorption Spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. v.481,n.2, p.283–290, 2003.
- LEMOS, V. A.; SANTELLI, R. E.; CARVALHO, M. S.; FERREIRA S. L.C.; Application of polyurethane foam loaded with BTAC in an on-line preconcentration system: cadmium determination by FAAS. *Spectrochimica Acta Part B* v.55, p.1497-1502, 2000.
- MADRID, Y.; BARRIO-CORDOBA, M.E.; CÁMARA, C. Biosorption of antimony and chromium species by *Spirulina platensis* and *Phaseolus*. Applications to bioextract antimony and chromium from natural and industrial waters. *Analyst*, v. 123, p.1593–1598, 1998.
- MADRID, Y.; CÁMARA, C. Biological substrates for metal preconcentration and speciation. *Trends in Analytical Chemistry*, v.16, p.36-44, 1997.
- MILLER, J.N., MILLER, J.C. *Estadística y quimiometria para química analítica*, 4ª edición, Prentice Hall, Madrid, 2002.
- MORAES, A. C. B. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). “Avaliação Química, Protéica e Biodisponibilidade de Cálcio Nas Folhas de Couve Manteiga, Couve-Flor e Espinafre”, - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1998.
- PEREZ, E. F.; Dissertação de mestrado. “Desenvolvimento de um biossensor amperométrico para oxalato”, UNICAMP, 2000.

- REIS, B. F.; MIRANDA, C. E. S.; BACCAN N. Pré-concentração por extração sólido-líquido em sistema de análise em fluxo com detecção espectrométrica. *Química Nova*, v.19(6), p.623-635, 1996.
- RIBEIRO, E. S. Dissertação de mestrado. “Estudos das atividades eletrocatalíticas das ftalocianinas de Co (II) e Fe (II) tetrassulfonadas suportadas sobre sílica gel quimicamente modificada com íon piridínio. UNICAMP, 1999.
- RIAZ, M. N. Soybeans as functional foods. *Cereal Foods World*, v. 44, n. 2, p. 88-92, 1999.
- SANTA’ANA, L. F. R.; COSTA, N. M. B.; OLIVEIRA, M. G. A.; GOMES, M. R. A. Valor Nutritivo e Fatores Antinutricionais de Multimisturas Utilizadas como Alternativa Alimentar. *Brazilian Journal of Food Technology*. v.3, p.129-135, 2000.
- SAVAGE, G.P.; VANHANEN, L.; MASON, S.M.; ROSS, A.B. Effect of cooking on the soluble and insoluble oxalate content of some New Zealand foods. *Journal of Food Composition and Analysis* 13, p. 201–206, 2000.
- SOLOMONS, G.; FRYHLE, C. *Química Orgânica*, 7ª ed. v. 2, Rio de Janeiro, 2002.
- STEPHENS, W.E., CALDER A. Analysis of non-organic elements in plant foliage using polarised X-ray fluorescence spectrometry..*Analytica Chimica Acta* 527, p. 89-96, 2004.
- WOLNIK, K.A.; FRIGKE, F.L.; CAPAR,S.G.; MEYER, M. W. R.;SATZGER, D.; BONNIN, E.; GASTON, C. M. Elements in major raw agricultural crops in the United States. 3. Cadmium, lead, and eleven other elements in carrots, field corn,

onions, rice, spinach, and tomatoes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 33, p. 807-811, 1985.

TARLEY, C. R. T. Tese de doutorado. "Concentração de Cd (II) e Pb (II) em materiais alternativos empregando sistemas em fluxo e espectrometria de absorção atômica", UNICAMP, 2004.

VEGLIO, F; BEOLCHINI, F. Removal of metals by biosorption: a review. *Hydrometallurgy*. v. 44, p.301-316, 1997.

XU, X.; WANG, H.; MURPHY, P.A.; COOK, L.; HENDRICH, S. Daidzein is a more bioavailable soymilk isoflavone than is genistein in adult women. *Journal of Nutrition*, 124, p. 825-832, 1994.