



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE ANANINDEUA
FACULDADE DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA
BACHARELADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA

CECILIA CORREIA PEREIRA

**DETERMINAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE COBRE, FERRO E ZINCO EM
PHYSALIS ANGULATA POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA
COM PLASMA ACOPLADO INDUTIVAMENTE (ICP OES)**

ANANINDEUA

2023

CECILIA CORREIA PEREIRA

**DETERMINAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE COBRE, FERRO E ZINCO EM
PHYSALIS ANGULATA POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA
COM PLASMA ACOPLADO INDUTIVAMENTE (ICP OES)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Ciência e Tecnologia da Universidade Federal do Pará, em cumprimento às exigências para a obtenção do Grau de Bacharel em Ciência e Tecnologia Ênfase em Tecnologia Mineral.

Orientador: Prof^o Dr. Daniel José Lima de Sousa

ANANINDEUA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a)
autor(a)

P436d PEREIRA, CECILIA CORREIA.
Determinação e distribuição de cobre, ferro e zinco em
Physalis angulata por ICP OES / CECILIA CORREIA
PEREIRA. — 2023.
18 f.

Orientador(a): Prof. Dr. Daniel José Lima de Sousa
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal do Pará, Campus Universitário de
Ananindeua, Curso de Ciência e Tecnologia, Ananindeua,
2023.

1. Metais. 2. Extração sequencial de proteínas. 3.
Metaloproteínas. 4. ICP OES. I. Título.

CDD 543

CECILIA CORREIA PEREIRA


**DETERMINAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE COBRE, FERRO E ZINCO EM
PHYSALIS ANGULATA POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA
COM PLASMA ACOPLADO INDUTIVAMENTE (ICP OES)**

Data da aprovação: 20 de setembro de 2023.

Banca Examinadora



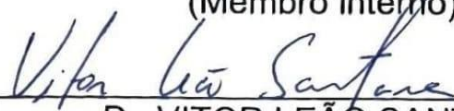
Prof. Dr. DANIEL JOSE LIMA DE SOUSA
(Membro - Presidente)



Doutorando ANDERSON DE SANTANA BOTELHO
(Membro externo MPEG/MCTI)



Dra. CAMILA NASCIMENTO ALVES
(Membro interno)



Dr. VITOR LEÃO SANTANA
(Membro interno)

AGRADECIMENTOS

À Deus por ser minha âncora nos momentos difíceis e me conceder esta grande conquista.

À minha família, em especial a minha mãe, pelo apoio e incentivo para continuar seguindo em frente.

À Prof.^a Dra. Kelly das Graças Fernandes Dantas pela paciência e, principalmente, pelos ensinamentos que foram essenciais para o meu aprendizado.

Ao Professor Daniel José Lima de Sousa pelos ensinamentos apresentados ao longo do curso, conselhos e incentivos que foram essenciais para dar continuidade a minha formação.

Ao Grupo de Espectrometria Analítica Aplicada pela convivência e companheirismo durante minha formação.

Aos amigos pela parceria, apoio e ajuda durante a realização deste trabalho.

Aos professores membros da banca pelos ensinamentos e sugestões.

À Universidade Federal do Pará.

À CAPES pelo apoio financeiro na concessão da bolsa de estudos.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho, meu muito obrigada.

JUSTIFICATIVA

O consumo de frutas é parte fundamental de uma dieta saudável e equilibrada, sendo recomendada em virtude de seus nutrientes e benefícios terapêuticos, destacando-se como um de seus constituintes as proteínas. Além disso, os benefícios da ingestão de frutas estão associados à redução de patologias, o camapu, fruto investigado nesta pesquisa, possui importantes benefícios para a saúde humana, como por exemplo, no tratamento de doenças reumáticas, hepatites, inflamações vesicais, entre outras.

Em virtude de sua importância, o estudo dos constituintes inorgânicos cobre, ferro e zinco é fundamental, pois exercem funções específicas no organismo. Essa investigação é necessária já que se deve levar em conta a recomendação de ingestão diária de minerais essenciais.

RESUMO

A Amazônia apresenta uma variedade de frutos que são fonte nutricional de grande importância para o organismo humano, capazes de diminuir a incidência de diversas doenças. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo a determinação de teores totais de cobre, ferro e zinco na polpa da *Physalis angulata* (camapu). Primeiramente, a extração de lipídeos foi realizada no camapu usando 30 ml da mistura de clorofórmio e metanol (2:1). As frações proteicas foram obtidas após extração sequencial usando 20 ml de quatro diferentes soluções extratoras (água, cloreto de sódio 0,5 mol L⁻¹, ácido acético 50% v v⁻¹ e hidróxido de sódio 0,05 mol L⁻¹). A amostra de camapu e as frações proteicas foram digeridas em forno de micro-ondas com cavidade usando ácido nítrico 50%, peróxido de hidrogênio e água. A exatidão do procedimento proposto foi avaliada usando o método de adição e recuperação nos digeridos e nos extratos proteicos. Os teores totais de Cu, Fe e Zn no digerido de camapu foram de 10,8 mg kg⁻¹; 32,7 mg kg⁻¹ e 22,0 mg kg⁻¹, respectivamente. Nas frações proteicas foram encontrados teores de todos os analitos estudados. Na fração lipídica foram obtidos níveis de Cu (0,2 mg kg⁻¹); Fe (0,5 mg kg⁻¹) e Zn (0,07 mg kg⁻¹). Elevados teores de Cu (3,4 mg kg⁻¹) e Zn (14,9 mg kg⁻¹) foram encontrados associados à albumina (extração com água) quando comparado aos outros extratores. Por outro lado, níveis elevados de ferro (8,8 mg kg⁻¹) foram obtidos na fração referente às globulinas (extração com NaCl). O resíduo apresentou teor mais elevado de ferro (10,7 mg kg⁻¹). Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de comparação de médias pelo teste de Tukey (p < 0,05). A concentração total de proteínas foi determinada utilizando o método de Bradford. Verificou-se que a quantidade de albuminas (5,74 mg kg⁻¹) extraídas foi superior quando comparada a globulina (0,28 mg kg⁻¹), glutelina 1 (4,46 mg kg⁻¹) e glutelina 2 (0,46 mg kg⁻¹). O procedimento proposto de extração sequencial foi adequado para a determinação de Cu, Fe e Zn associados às metaloproteínas estudadas. Estudos complementares sobre a biodisponibilidade são necessários para verificar a quantidade desses nutrientes que pode ser absorvida pelo organismo.

Palavras- Chave: Extração Sequencial; Metais; Metaloproteínas; ICP OES.

ABSTRACT

The Amazon has a variety of fruits that are a nutritional source of great importance for the human body capable of reducing the incidence of various diseases. Therefore, the present study aimed to determine the total levels of copper, iron and zinc in the pulp of *Physalis angulata* (camapu). First, lipid extraction was carried out in camapu using 30 ml of a mixture of chloroform and methanol (2:1). The protein fractions were obtained after sequential removal using 20 ml of four different extracting solutions (water, sodium chloride 0,5 mol/L, acetic acid 50% v/v and sodium hydroxide 0,05 mol/L). A sample of camapu and the protein fractions were digested in a microwave heat oven using 50% nitric acid, hydrogen peroxide and water. The solution of the proposed procedure was evaluated using the addition and recovery method in digests and protein extracts. The total contents of Cu, Fe and Zn in the camapu digestion were 10,8; 32,7 and 22,0, mg kg⁻¹, respectively. In the protein fractions, levels of all trained analytes were found. In the lipid fraction. Cu levels were obtained (0,2 mg kg⁻¹); Fe (0,5 mg kg⁻¹) and Zn (0,07 mg kg⁻¹). High levels of Cu (3,4 mg kg⁻¹) and Zn (14,9 mg kg⁻¹) were found associated with albumin (water extraction) when compared to other extractants. On the other hand, high iron levels (8,8 mg kg⁻¹) were obtained in the fraction referring to globulins (extraction with NaCl). The one presented had a higher iron content (10,7 mg kg⁻¹). The data were subjected to analysis of variance and mean comparison test using the Tukey test ($p < 0,05$). Total protein concentration was determined by the Bradford method. It was found that the amount of albumins (5,74 mg kg⁻¹) extracted was greater when compared to globulin (0,28 mg kg⁻¹), glutelin 1 (4,46 mg kg⁻¹) and glutelin 2 (0,46 mg kg⁻¹). The proposed sequential extraction procedure was suitable for determining Cu, Fe and Zn associated with scientific metalloproteins. Additional studies on bioavailability are necessary to verify the amount of these nutrients that can be absorbed by the body.

Keywords: Sequential extraction; Metals: metalloproteins: ICP OES.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Condições operacionais para o espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente para a determinação de Cu, Fe e Zn.....	05
Tabela 2-	Programa de aquecimento do forno de micro-ondas.....	07
Tabela 3-	Teores médios \pm desvio padrão de Cu, Fe e Zn em camapu.....	10
Tabela 4-	Limite de detecção e quantificação.....	11
Tabela 5-	Concentrações de Cu, Fe e Zn e a somatória das frações de camapu e seus respectivos desvios padrão ($n = 3$).....	12
Tabela 6-	Concentração total de proteínas (mg kg^{-1}) nas frações proteicas de camapu e seus respectivos desvios-padrão ($n = 3$).....	14

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	03
2 PARTE EXPERIMENTAL	04
2.1 Instrumentação	04
2.2 Reagentes, soluções e amostra	06
3 Procedimento analítico	07
3.1 reparo de amostras.....	07
3.2 Digestão das amostras	07
4 Procedimento experimental	08
4.1 Extração de lipídeos	08
4.2 Extração sequencial das proteínas.....	08
4.3 Digestão ácida das frações proteicas e dos resíduos obtidos no procedimento de extração sequencial	09
4.4 Determinação da concentração de Cu, Fe e Zn nos digeridos de camapu, fração lipídica, proteicas e no resíduo.....	09
4.5 Determinação de proteína total.....	09
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	10
5.1 Concentração total dos elementos no camapu.....	10
5.2 Análise estatística.....	11
5.3 Determinação de Cu, Fe e Zn nas frações lipídica, proteicas e no resíduo.....	12
5.4 Exatidão do procedimento analítico.....	14
5.5 Eficiência do procedimento de preparo de amostras.....	14
5.6 Teor de proteína total.....	14

6 CONCLUSÃO	15
REFERÊNCIAS	16

química nova

Determinação e distribuição de Cu, Fe e Zn em camapu por ICP-OES

Journal:	<i>Química Nova</i>
Manuscript ID	QN-2023-0108
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	02-Apr-2023
Complete List of Authors:	Pereira, Cecilia; UFPA, Química Lemos, Michelle; UFPA, Química Dantas, Kelly; UFPA, Chemistry
Keyword:	Sequential Extraction, metals, Metalloproteins, ICP-OES, fruit
Please, specify if the submission is for a Regular Issue or Special Issue:	Regular Issue

SCHOLARONE™
Manuscripts

Determinação e distribuição de Cu, Fe e Zn em camapu por ICP-OES

Cecilia Correia Pereira¹, Michelle de Souza Lemos¹, Kelly das Graças Fernandes Dantas^{1*}

¹Grupo de Espectrometria Analítica Aplicada, Faculdade de Química, Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Federal do Pará, 66075-970, Belém, PA, Brasil.

*Email: kdgfernandes@ufpa.br

For Review Only

1
2
3 DETERMINATION AND DISTRIBUTION OF CU, FE, AND ZN IN CAMAPU BY
4 ICP-OES
5
6

7 This study aimed to determine the total contents of copper, iron, and zinc in camapu and
8 protein fractions by inductively coupled plasma emission spectrometry. Firstly, lipid
9 removal was performed using chloroform and methanol (2:1). Protein fractions were
10 obtained after sequential extraction using four extractors (water, 0.5 mol L⁻¹ sodium
11 chloride, 50% acetic acid v v⁻¹ and 0.05 mol L⁻¹ sodium hydroxide. The camapu sample
12 and protein fractions were digested in a cavity microwave oven with diluted nitric acid
13 and hydrogen peroxide. The accuracy of the procedure was evaluated using the addition
14 and recovery method in the digests and protein extracts. All analyzed analytes were found
15 in the protein fractions. Levels of Cu, Fe, and Zn ranged from 0.07 to 0.5 mg kg⁻¹ were
16 found in the lipid fraction. The residue presented higher iron content. Higher Cu and Zn
17 contents were found associated with albumin. The total protein concentration determined
18 in each protein fraction was 5.74 mg kg⁻¹ (albumins), 0.28 mg kg⁻¹ (globulins), 4.46 mg
19 kg⁻¹ (glutelins 1), and 0.46 mg kg⁻¹ (glutelins 2). This study showed that the elements
20 studied in camapu were found associated to proteins albumin, globulins, glutelins1, and
21 glutelins 2.
22
23
24
25

26 **Keywords:** Sequential Extraction; metals; fruit; Metalloproteins; ICP-OES.
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

INTRODUÇÃO

A região Amazônica é uma das regiões mais importantes quando se trata de espécies frutíferas no Brasil. Os frutos da floresta proporcionam nutrientes, minerais e antioxidantes que mantêm o corpo saudável e resistente às doenças (SHANLEY; SERRA, 2011).

As frutas são alimentos indispensáveis para a composição de um padrão saudável de alimentação, visto que esses alimentos contêm baixa densidade energética e diversos elementos essenciais para a saúde, como vitaminas, minerais, fibras e outros compostos bioativos, favorecendo a manutenção da saúde e do peso corporal (SILVA; CLARO, 2019).

Segundo Bittencourt et al. (2019), o consumo regular de frutas é apontado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um importante fator de proteção e de prevenção das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT). Estudos recentes na literatura têm evidenciado a importante associação entre o consumo adequado desses alimentos e menor risco de mortalidade por doença cardiovascular e neoplasias.

Dentre a diversidade de frutas presentes na Amazônia tem-se a *Physalis angulata*, conhecida como camapu. Nessa região, a fruta é consumida in natura e seu suco é utilizado como sedativo, diurético, depurativo e antirreumático. Além disso, as folhas são utilizadas no tratamento de inflamações vesicais, malária, hepatites e dermatites (DIAS et al., 2020).

Os minerais são essenciais na dieta humana, visto que exercem funções nutricionais e fisiológicas para o bom funcionamento do organismo (HAMBIDGE, 2003). Cobre, ferro e zinco são elementos-traço considerados essenciais para o organismo (DOLAN; CAPAR, 2002).

A importância dos microminerais para o organismo humano pode ser estudada a partir das chamadas proteínas conjugadas, onde encontram-se ligados a elas os lipídeos (lipoproteínas), açúcares (glicoproteínas) e metais (metaloproteínas) (TOGNON, 2012). Sendo assim, algumas proteínas tendem ser solúveis em água pura, enquanto que outras precisam de sais, ácidos ou bases para se dissolverem. Além disso, as proteínas são sensíveis às mudanças de pH e temperatura, tendo como consequência a sua desnaturação. Também possuem grupos iônicos livres ou carregados que migram em um campo elétrico, devido a esse campo, as proteínas se combinam com reagentes iônicos,

1
2
3 resultando algumas vezes em compostos insolúveis (CANTAROW; SCHEPARTZ,
4
5 1969).

6
7 De acordo com Gao et. al. (2007), os íons metálicos desempenham um papel
8 importante na atividade biológica do corpo humano. Esses íons estão ligados a proteínas
9 ou enzimas específicas as quais exercem seus efeitos como parte inerente do centro ativo
10 ou estrutural das proteínas.
11

12
13 Alguns estudos tem sido encontrados na literatura envolvendo procedimentos de
14 extração sequencial de proteínas em diferentes matrizes. Kwon et. al. (1996), realizaram
15 o fracionamento e a caracterização de proteínas de coco e observaram que albuminas e
16 globulinas eram predominantes nas frações de proteínas. Naozuka et. al. (2007),
17 determinaram Cu, Fe, Mn e Zn em extratos de castanha do Brasil, semente de cupuaçu e
18 polpa de coco usando extração sólido-líquido e espectrometria de absorção atômica com
19 atomização eletrotérmica. Bittencourt et al. (2012), determinaram Fe, Mn, Zn nas frações
20 proteicas e conteúdo total de proteínas nas amostras de sementes de trigo e soja após
21 procedimento de extração sequencial e concluíram que a extração sequencial utilizada foi
22 um método eficaz na obtenção de frações contendo diferentes classes de proteínas e
23 diferentes metais (Cu, Fe, Mn e Zn) associados as proteínas. Xavier et. al. (2019),
24 encontraram Fe e Zn associados às proteínas da castanha de caju e concluíram que o
25 procedimento de extração seguido por uma etapa de precipitação de proteínas à base de
26 acetona permitiu a obtenção de informações sobre a bioacessibilidade do Fe e Zn ligado
27 a alguns grupos de proteínas (albumina, globulina e glutelina). Trindade (2010), estudou
28 a distribuição de constituintes inorgânicos em açaí, bacuri e cupuaçu, onde foi encontrado
29 Cu, Fe e Zn associados às proteínas. Sendo assim, este estudo teve como objetivo a
30 caracterização elementar e proteica em camapu (*Physalis angulata*) a partir da
31 determinação de Cu, Fe e Zn nos digeridos, fração lipídica, fração proteica, resíduo da
32 extração sequencial e do teor de proteínas presentes no camapu.
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50

51 **PARTE EXPERIMENTAL**

52 53 **Instrumentação**

54
55
56 Um liofilizador (L100 Liotop, São Carlos, SP, Brasil) foi utilizado no processo de
57 secagem das amostras até massa constante.
58
59
60

As amostras foram pesadas em uma balança analítica com precisão de até quatro casas decimais (0,0001 g).

Um moinho criogênico (Spex, 6770 Freezer/Mill, EUA) foi usado para pulverizar as amostras a fim de obter melhor representatividade.

Para a separação das frações proteicas foi usada uma centrífuga (Quimis, São Paulo, Brasil).

Um agitador do tipo Vortex (Quimis, São Paulo, Brasil) e um banho termostático com agitação foram usados para a extração das proteínas presentes na amostra.

Para a digestão das amostras foi utilizado um forno de micro-ondas com cavidade (START E, Milestone, Sorisole, Itália).

Para a determinação do teor de proteínas totais foi utilizado um espectrofotômetro UV-Vis (Thermo Scientific, USA) de feixe simples com caminho ótico de 1 cm.

A determinação de Cu, Fe e Zn nos digeridos de camapu foi realizada usando um espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (iCAP 6500, Thermo Scientific, USA). O gás utilizado para a manutenção do plasma foi argônio de pureza 99,999% (Velox gás, Ananindeua, Pará). As condições operacionais do ICP-OES estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Condições operacionais para a determinação de Cu, Fe e Zn por ICP-OES.

Parâmetros	Condições Operacionais
Potência de rádio	1,15 KW
frequência	
Vazão do Plasma	12 L min ⁻¹
Vazão do gás auxiliar	0,5 L min ⁻¹
Vazão do nebulizador	0,5 L min ⁻¹
Fluxo de amostra	1,0 mL min ⁻¹
Nebulizador	Concêntrico
Câmara de nebulização	Ciclônica
Visão	Axial (a);Radial (b)
Elementos (λ /nm)	Cu (324,7 I) ^b , Fe (238,2 II) ^b , Zn (202,5 II) ^a

I: Linha atômica; II: Linha iônica; a: axial; b: radial.

Reagentes, soluções e amostras

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Todas as diluições foram realizadas utilizando água ultrapura (resistividade 18,2 MΩ.cm) obtida a partir de um sistema de purificação Synergy-UV (Millipore, Bedford, EUA). As soluções analíticas de referência de Cu, Fe e Zn para o ICP-OES foram preparadas a partir da diluição adequada da solução padrão monoelementar contendo 1000 mg L⁻¹ (Sigma, EUA) de cada elemento.

A extração da fase lipídica das amostras de camapu foi realizada utilizando-se uma mistura de clorofórmio (Quimex, SP, Brasil) e metanol (Êxodo Científica, SP, Brasil).

Para o procedimento de extração sequencial das proteínas foram usadas as seguintes soluções extratoras: água ultrapura, NaCl (Neon Comercial, SP, Brasil), ácido acético (Êxodo Científica, SP, Brasil) e NaOH (Êxodo Científica, SP, Brasil).

A digestão ácida foi realizada utilizando ácido nítrico (Neon Comercial, SP, Brasil) previamente purificado utilizando um sistema de subdestilação (Berghof, modelo BSP 929-IV, Alemanha) e peróxido de hidrogênio 30% m/m (Neon Comercial, SP, Brasil).

Acetona 80% (v v⁻¹) foi utilizada para a precipitação das proteínas totais.

Para a determinação das proteínas totais foi utilizada uma mistura do corante de Comassie Brilliant Blue com álcool etílico concentrado e ácido fosfórico 85% (v v⁻¹).

Neste estudo foram utilizadas amostras de camapu que foram adquiridas no município de Ananindeua-PA.

Procedimento Analítico

Preparo da amostra

Os frutos de camapu foram submetidos ao procedimento de lavagem com água desionizada para a retirada de impurezas, e em seguida a polpa foi transferida para frascos previamente descontaminados. A amostra foi congelada, liofilizada e pulverizada em moinho criogênico usando um programa com duas etapas de 2 min e uma etapa entre os ciclos de 5 min e em seguida as amostras foram transferidas para frascos de polietileno e armazenadas em um dessecador.

Digestão das amostras

O processo de digestão ácida das amostras foi realizado pesando-se uma massa de aproximadamente 0,25 g de amostra em triplicata ($n = 3$) e em seguida 4 mL de ácido nítrico (7 mol L^{-1}), 2 mL de H_2O_2 (30%, m m^{-1}) e 2 mL de água ultrapura foram adicionados. Após a digestão, a solução obtida foi diluída com água ultrapura até completar um volume de 15 mL. O programa de aquecimento do micro-ondas usado na digestão das amostras de camapu está apresentado na Tabela 2.

Tabela 2. Programa de aquecimento do forno de micro-ondas.

Etapa	Tempo (min)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Potência (W)
1	15	180	800
2	15	180	800
3*	50	Ambiente*	0

*Etapa de ventilação.

A acidez final dos digeridos foi determinada por titulação e ajustada para 5% para a posterior determinação de Cu, Fe e Zn por ICP-OES. Os parâmetros instrumentais apresentados na Tabela 1.

Procedimento de extração sequencial

Remoção de lipídeos

No processo inicial de extração sequencial foi realizada a remoção dos lipídeos presentes no camapu. Cerca de 3,0 g da polpa seca de camapu previamente moída foi pesada em frascos volumétricos em triplicata ($n = 3$). Inicialmente, um volume de 30 mL de solução extratora de clorofórmio e metanol (2:1 v v⁻¹) foi adicionada. O frasco volumétrico contendo a mistura foi submetido a agitação por vórtex durante 15 min e centrifugado por 10 min à 3800 rpm. A separação do sobrenadante (fração lipídica) foi feita por filtração simples. O sólido (fração sem lipídeos) foi seco em estufa à uma temperatura de 30 °C por 20 min. Em seguida, a polpa de camapu sem lipídeos foi submetida ao procedimento de extração sequencial de proteínas. A fração lipídica foi armazenada em freezer para posterior digestão e análise de acordo com o procedimento de digestão realizado para a polpa de camapu.

Extração sequencial das proteínas

O procedimento de extração sequencial foi adaptado de Kwon et. al. (1996) e Naozuka et. al. (2007). Aproximadamente 1,0 g da fração da amostra sem lipídeos foi pesada em triplicata ($n = 3$) em frascos volumétricos. Em seguida, a amostra foi submetida ao processo de extração sequencial empregando as seguintes soluções: água ultrapura (albuminas), solução aquosa de NaCl 0,5 mol L⁻¹ (globulinas), solução de ácido acético 50% (glutelinas-1) e NaOH 0,05 mol L⁻¹ (glutelinas-2). A cada etapa foram adicionados 20 mL de cada solução extratora e a mistura foi mantida sob agitação por vórtex durante 30 min. Após esse período, as misturas foram centrifugadas por 10 min à 3800 rpm e separado o sobrenadante por filtração simples. As frações proteicas obtidas foram armazenadas em freezer para posterior análise. Entre cada etapa de extração, o resíduo resultante foi lavado com água ultrapura e a solução de lavagem foi descartada. Após a extração sequencial, as frações proteicas obtidas foram precipitadas com 20 mL de solução de acetona 80% (v v⁻¹) a -14 °C durante 30 min. Após a precipitação, os frascos foram deixados à temperatura ambiente para evaporação do solvente. As proteínas precipitadas foram submetidas à digestão ácida conforme procedimento realizado para amostra e posterior análise.

Digestão ácida das frações proteicas e dos resíduos obtidos no procedimento de extração sequencial

As frações proteicas e o resíduo obtidos proveniente do procedimento de extração sequencial foram digeridos pelo procedimento de digestão ácida apresentado na Tabela

2. Ao final da digestão, as soluções obtidas foram filtradas por filtração simples e aferidas para 15 mL com água ultrapura. O programa de aquecimento do forno de micro-ondas está descrito na Tabela 2.

A eficiência do procedimento de preparo de amostras foi avaliada pelo método de adição e recuperação de analito, onde diferentes concentrações dos analitos foram adicionados previamente à digestão.

Determinação da concentração de Cu, Fe e Zn nos digeridos de camapu, fração lipídica, frações proteicas e no resíduo final

Os digeridos de camapu, da fração lipídica, das frações proteicas e do resíduo foram submetidos à determinação de Cu, Fe e Zn por ICP OES usando curvas analíticas contendo as concentrações de 2 a 10 mg L⁻¹.

O método de adição e recuperação foi realizado nos digeridos de camapu e nas frações digeridas obtidas na extração sequencial para avaliar a exatidão do procedimento de análise por ICP-OES. Nos digeridos e nas frações foram adicionados concentrações de 3,0 mg L⁻¹ Cu, 5,0 mg L⁻¹ Fe e 7,0 mg L⁻¹ Zn.

Determinação de proteína total

Para determinação de proteína total nas frações proteicas foi usado o método de Bradford (1976). A calibração do espectrofotômetro foi realizada utilizando uma solução estoque de albumina de soro bovino. As curvas analíticas foram construídas na faixa de 2,0 – 20 µg mL⁻¹ após diluição adequada da solução estoque padrão de albumina contendo 200 µg mL⁻¹. Antes da análise, a amostra foi inicialmente submetida à leitura de pH e posteriormente foi adicionado 0,5 mL da solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ em 0,5 mL de cada fração proteica para obter um pH na faixa de 10,0 a 11,0. Após adição da

solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ foi retirada uma alíquota de 100 µL de cada fração e acrescentado 1 mL do reagente de Bradford. As amostras foram deixadas para reagir por um período de 5 min. Após este tempo a proteína foi quantificada por espectrofotometria UV-VIS .

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Concentração total dos elementos no camapu

A concentração total (mg kg⁻¹) de Cu, Fe e Zn obtida no camapu por ICP-OES está apresentada na Tabela 3 com seus respectivos desvios-padrão.

Tabela 3. Teores médios ± desvio padrão de Cu, Fe e Zn em camapu e seus respectivos desvio-padrão ($n=3$).

Elementos	Camapu (mg kg ⁻¹)
Cu	10,8 ± 0,9
Fe	32,7 ± 1,4
Zn	22,0 ± 0,9

Pode ser observado na Tabela 3 que o Fe apresentou a maior concentração entre os elementos estudados, seguido de zinco e depois o cobre.

Trindade (2010) encontrou maiores teores de Fe, altos níveis de cobre e baixas concentrações de zinco em açaí (Fe: 39,4 µg g⁻¹; Cu: 10,5 µg g⁻¹; Zn: 20,3 µg g⁻¹), bacuri (Fe: 46,2 µg g⁻¹; Cu: 14,6 µg g⁻¹; Zn: 6,3 µg g⁻¹) e cupuaçu (Fe: 37,4 µg g⁻¹; Cu: 2,9 µg g⁻¹; Zn: 17,2 µg g⁻¹) quando comparado aos valores obtidos neste estudo.

Bittencourt e colaboradores (2012) encontraram teores de ferro (33 µg g⁻¹) em sementes de trigo próximos ao valor encontrado neste estudo. Por outro lado, maiores teores de cobre e de zinco foram encontrados por esses autores quando comparado aos teores desses elementos no camapu.

Naozuka et al. (2007) determinaram Cu, Fe e Zn em castanha do Brasil (4,4, 8,7 e 6,9 µg g⁻¹), semente de cupuaçu (0,84, 3,0 e 14 µg g⁻¹) e polpa de coco (1,1, 6,4 e

3,4 $\mu\text{g g}^{-1}$) e encontraram menores níveis de Cu, Fe e Zn quando comparado com os valores obtidos para o camapu.

Xavier et al. (2019) obtiveram elevados teores de Fe (55,0 mg kg^{-1}) e Zn (41,0 mg kg^{-1}) em castanha de caju quando comparado aos valores encontrados neste estudo.

Os limites de detecção (LD), quantificação (LQ) e o coeficiente de correlação para a determinação de Cu, Fe e Zn por ICP-OES são apresentados na Tabela 4. Para o cálculo do LD e LQ foi utilizado a relação sinal/ ruído (SBR) e a concentração equivalente ao sinal de fundo (BEC) para se obter a concentração do elemento com a intensidade correspondente ao fundo na linha espectral que se deseja usar, como mostram as equações 2 e 3.

$$\text{LD} = (3 \times \text{RSD}_B \times \text{BEC}) / 100 \text{ (equação 2)}$$

$$\text{LQ} = (10 \times \text{RSD}_B \times \text{BEC}) / 100 \text{ (equação 3)}$$

Em que $\text{RSD}_B = S_B / I_B$, onde S_B e I_B são o desvio padrão e a intensidade média do branco ($n = 10$); e BEC é a concentração equivalente de fundo, que é calculado pela razão entre a concentração e o SBR. (HOU; JONES, 2000).

Tabela 4. Limite de detecção e quantificação.

Elementos	LD (mg kg^{-1})	LQ (mg kg^{-1})	R^2
Cu	0,1	0,3	0,9999
Fe	0,2	0,6	0,9999
Zn	0,001	0,004	0,9997

Análise estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata. A Análise de Variância (ANOVA), teste *t* Student e o teste de Tukey a 5% de probabilidade foram usados para comparar as médias dos resultados.

Determinação de Cu, Fe e Zn nas frações lipídica, proteicas e no resíduo

Os teores de Cu, Fe e Zn nas frações lipídicas, frações proteicas e no resíduo estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Concentrações de Cu, Fe e Zn nas frações e no resíduo, somatória das frações e seus respectivos desvios padrão ($n = 3$)

Frações	Cu (mg kg ⁻¹)	Fe (mg kg ⁻¹)	Zn (mg kg ⁻¹)
Lípido	0,2 ^c ± 0,1	0,5 ^c ± 0,1	0,07 ^b ± 0,004
Água	3,4 ^a ± 0,1	8,7 ^{ab} ± 1,4	14,9 ^a ± 1,8
NaCl	1,6 ^{bc} ± 0,01	8,8 ^a ± 0,1	3,6 ^{ab} ± 0,03
Ácido acético	2,3 ^{ab} ± 0,2	1,8 ^{bc} ± 0,01	1,1 ^b ± 0,3
NaOH	0,3 ^c ± 0,1	1,0 ^c ± 0,1	0,8 ^b ± 0,2
Resíduo	2,94 ^{ab} ± 0,6	10,7 ^a ± 1,0	1,0 ^b ± 0,01
∑ Frações	10,74	31,50	21,47
Digerido	10,80	32,70	22,00

∑= Somatório. Os resultados representam médias em triplicatas. Médias indicadas por letras iguais na mesma coluna, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O somatório dos teores de Cu, Fe e Zn em todas as frações (lípidos, proteínas e resíduo) foi comparado ao valor da concentração total dos elementos estudados presentes no camapu. O teste *t* Student mostrou que os resultados não apresentam diferenças significativas entre si.

Pode ser observado que na maioria das frações, o Fe está em maior quantidade quando comparado ao Cu e Zn.

Na fração lipídica, todos os elementos estudados foram encontrados em baixas concentrações. Essa associação de íons metálicos com os lípidos pode ser explicada pela presença de compostos de sulfolípidos e fosfolípidos. O primeiro composto é

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

constituído de dois ácidos graxos, galactose e um grupo sulfonato. Por outro lado, os fosfolípidos contêm uma molécula de glicerol, duas cadeias de ácido graxo, além de um grupo fosfato (SZPUNAR, 2000; MORENO et al., 2004). Os grupos sulfonato e fosfato são polares, logo possuem cargas negativas que são capazes de interagir com cátions (TRINDADE, 2010), como Cu, Fe e Zn, elementos de interesse nesse estudo.

Cobre, ferro e zinco foram encontrados nas frações proteicas extraídas com NaCl e ácido acético. Nessas frações, o Cu apresentou teores de 1,6 mg kg⁻¹ e 2,3 mg kg⁻¹, respectivamente. Níveis altos de Fe (8,8 mg kg⁻¹) foram encontrados associados a proteína globulina, enquanto baixos níveis desse elemento (1,8 mg kg⁻¹) foram associados a proteína glutelina-1. Por outro lado, o maior teor de zinco (3,6 mg kg⁻¹) foi encontrado na fração das globulinas.

Segundo Anderson e Porath (1986), íons metálicos como Fe³⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Al³⁺ e Ca²⁺ geralmente têm capacidade de interagir com proteínas, por apresentarem caráter ácido intermediário.

Os resultados mostraram que a maior quantidade de Cu e Zn foi proveniente da extração com a água, indicando que esses elementos podem estar associados à proteína albumina, visto que esse extrator é responsável por extrair preferencialmente a albumina. Na extração utilizando solução de NaOH foi observado um elevado teor de Fe (1,0 mg kg⁻¹) associado as glutelinas-2 quando comparado ao cobre (0,3 mg kg⁻¹) e zinco 0,8 mg kg⁻¹.

O resíduo final resultante da extração sequencial apresentou um elevado teor de Fe (10,7 mg kg⁻¹) quando comparado as frações proteicas estudadas e aos lípidos. Isso pode ser devido ao ferro estar ligado a uma proteína diferente das proteínas estudadas e, ainda, em outra substância que não seja proteína. Diante disso, a utilização de outros extratores que possam extrair uma proteína diferente das estudadas se faz necessária para identificar a presença desse elemento.

Comparando-se a distribuição do zinco com os demais elementos estudados, pode ser observado que esse elemento foi obtido em maior concentração na fração extraída com a água, ou seja, associado às albuminas. Bittencourt et al. (2012) encontrou Cu associado as albuminas, enquanto Fe e Zn estavam associados as glutelinas-2 em sementes de trigo. Xavier et al. (2019) determinaram a bioacessibilidade de Fe e Zn associadas as proteínas de castanha de caju e encontraram Fe e Zn ligado a alguns grupos de proteína como albumina, globulina e glutelina.

Exatidão do procedimento analítico

A exatidão do procedimento foi avaliada pelo método de adição e recuperação e as recuperações obtidas variaram de 99,8 a 104,6% (Cu), 100,8 a 102,9% (Fe) e de 98,3 a 101,4% (Zn). Esses valores obtidos mostram que os teores recuperados são aceitáveis e permitem concluir que a análise realizada por ICP-OES está adequada.

Eficiência do procedimento de preparo de amostras

As recuperações encontradas na avaliação da eficiência do procedimento de preparo das amostras variaram de 91,9 a 107,9% (Cu), 88,3 a 109,6% (Fe) e 94,2 a 101,2% (Zn). Diante desses resultados pode-se inferir que não houve perdas dos analitos durante o procedimento de preparo de amostras.

Teor de proteína total

As concentrações das proteínas foram calculadas a partir da equação da reta e o coeficiente de correlação (R) foram iguais a $y = 0,0011x + 0,0919$. A curva de calibração obtida apresentou o coeficiente de correlação (R) igual a 0,9973. Os teores de proteínas obtidos estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6. Concentração total de proteínas (mg kg^{-1}) nas frações proteicas de camapu e seus respectivos desvios-padrão ($n = 3$)

Frações	Concentração (mg kg^{-1})
Água (Albumina)	$5,74 \pm 0,10$
NaCl (Globulina)	$0,28 \pm 0,01$
Ácido acético (Glutelina 1)	$4,46 \pm 0,20$
NaOH (Glutelina 2)	$0,46 \pm 0,02$

Fonte: o autor.

A utilização da água à 60 °C e dos reagentes extratores NaCl, ácido acético e NaOH promove a extração de proteínas dos grupos da albumina, globulina, glutelina-1 e glutelina-2, respectivamente.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Pode ser observado que a maior concentração das proteínas foi encontrada no extrator de água a 60 °C (5,74 mg kg⁻¹), seguida do ácido acético (4,46 mg kg⁻¹). Os menores teores foram encontrados nos extratores NaOH (0,46 mg kg⁻¹) e NaCl (0,28 mg kg⁻¹).

Bittencourt et. al. (2012) afirmaram que a quantificação de proteínas totais depende da metodologia adotada e da composição química da amostra. Desse modo, a escolha do método a ser utilizado é de suma importância, levando em consideração a sensibilidade, natureza dos constituintes da amostra e o grau de confiabilidade nos resultados obtidos devido aos interferentes da amostra e do método escolhido.

CONCLUSÃO

Este estudo mostrou que o camapu é rico em elementos essenciais, apresentando grande importância para o consumo humano já que o nosso organismo necessita de nutrientes essenciais para um bom funcionamento. Além disso, desperta o interesse em estudar as metaloproteínas. Cobre, ferro e zinco foram encontrados associados as albuminas, globulinas, glutelinas-1 e glutelinas-2. Os elementos estudados também foram encontrados na fração lipídica. A identificação e a quantificação de Cu, Fe e Zn nas diferentes frações de proteínas é apenas uma etapa inicial para a caracterização das metaloproteínas em camapu. Estudos sobre a biodisponibilidade são necessários para verificar a quantidade desses nutrientes que pode ser absorvida pelo organismo. Futuros estudos devem ser realizados usando outras técnicas de separação a fim de identificar as possíveis espécies desconhecidas e comparar qual o método é mais eficiente para o fracionamento e quantificação das proteínas. Esse estudo contribuiu para um melhor entendimento sobre as metaloproteínas e química elementar presente em camapu.

REFERÊNCIAS

ANDERSSON, L.; PORATH, J. *Anal. Biochem*, **154**: 250. 1986.

ANVISA. Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Aprova Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 2003.

1
2
3 BITTENCOURT, M. L.; DIOGO A. P. D.; AUGUSTI, L. R.; COSTA, L. M.
4 Determinação de Cu, Fe, Mn, Zn e do Teor de Proteína Total em Amostras de Trigo e
5 Soja após Procedimento de Extração Sequencial. **Quim. Nova**, v. 35, n. 10, 1922-1926,
6 2012.
7

8
9 BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of
10 microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
11 **Anal. Biochem**, v. 72, p. 248, 1976.
12

13
14
15 CANTAROW, A.; SCHEPARTZ, B. 1969. **Biochemistry**. 4^a Ed., Atheneus S. A. Rio
16 de Janeiro. 920pp (in Portuguese).
17

18 DIAS, F. G. B.; FERREIRA, M. J. G.; SILVA, L. M. R.; MENEZES, R. C.S;
19 FIGUEIREDO, E. A. T. Bioaccessibility of the bioactive compounds and antimicrobial
20 activity of aqueous extracts of *Physalis angulata* L.1. **Revista Ciência Agronômica**, v.
21 51, n. 3, e 20196619, 2020.
22

23
24 DOLAN, S.P.; CAPAR, S. G. Mult-element analysis of food by microwave digestion
25 and inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. **Journal of Food**
26 **Composition and Analysis**, 15: 593-615. 2002.
27

28
29 HAMBIDGE, K. M.; Biomarkers of mineral trace intake and status. **J Nutr**, 133: 948S-
30 55S. 2003.
31

32
33 HOU, Xiandeng; JONES, Bradley T. Inductively coupled plasma/optical emission
34 spectrometry. **Encyclopedia of analytical chemistry**, v. 11, p. 9468-9485, 2000.
35

36 KWON, K., Park, K. H., Rhee, K. C. Fractionation and Characterization of proteins
37 from coconut (*Cocos nucifera* L.). **American Chem. Society**, v. 44 (7), 1741-1745,
38 1996.
39

40
41 NAOZUKA, J., OLIVEIRA, P. V. Cu, Fe, Mn and Zn Distribution in Protein Fractions
42 of Brazil-Nut, Cupuassu Seed and Coconut Pulp by Solid-Liquid Extraction and
43 Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry, **J. Braz. Chem. Society**, 1547-1553,
44 2007.
45

46
47 SHANLEY P, SERRA M MEDINA G (2011). **Árvores frutíferas e plantas úteis na**
48 **vida Amazônica**. FAO CIFOR e PPI. Disponível em:

49 <http://www.fao.org/docrep/015/i2360e/i2360e.pdf>. Acessado em 2 de dezembro de
50 2019
51

52
53 SILVA. L. E. S.; CLARO. R. M. **Tendências temporais do consumo de frutas e**
54 **hortaliças entre adultos nas capitais brasileiras e Distrito Federal, 2008-2016**. Cad.
55 Saúde Pública 2019.
56

57
58 SPUNAR, J. Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis:
59 metallomics, metalloproteomics, and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics.
60 **Analyst**, v. 130, p. 442-465, 2005.

1
2
3 TOGNON, A.L. **Quantificação e avaliação da bioacessibilidade in vitro de micro e**
4 **macro elementos em frutas, hortaliças e cereais.** Dissertação (Ciências- Química).
5 Universidade de São Paulo, 2012.
6
7

8 TRINDADE, S. L. **Determinação e distribuição de elementos-traço em frutas**
9 **regionais.** Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal do Pará, 2010.
10 XAVIER, A. D. S; FURTADO, D. Z. S; ASSUNÇÃO, N. A; NASCIMENTO, A. N.
11 Bioaccessibility of Fe and Zn (associated to proteins) in cashew nut. **Journal of Food**
12 **Composition and Analysis.** 2019.
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Review Only

Resposta aos revisores

Revisor 1:

-Na forma como está, o manuscrito tem um apelo mais forte e informações relevantes na área de alimentos. Com respeito ao aspecto da Química Analítica, não há nenhuma novidade em relação aos trabalhos já publicados na literatura, uma vez que o fracionamento de metais ligados a proteínas é bem conhecido, assim como os métodos de preparo de amostras e determinação dos elementos em questão. O aspecto novo está relacionado à aplicação em camapu, o que seria do interesse da área de alimentos, como mencionado acima. Mesmo assim, o forte aspecto regional deste fruto pode não despertar tanto interesse da comunidade científica, a não ser que ela seja encontrada também em outros locais no Brasil ou no mundo. Neste caso, esta informação deveria estar contemplada na Introdução.

R: Os autores alteram o texto (página 3, linhas 21 – 24).

- Pagina 4 (último parágrafo da introdução): Este parágrafo tem muitas informações e poderia ser resumido na forma de uma tabela, o que facilitaria a leitura e comparação entre os trabalhos.

R: Os autores alteram o texto (Página 4, linha 7-24).

- Tabela 1: substituir “fluxo de amostra” por “vazão de amostra”.

R: A informação foi inserida (Tabela 1).

- Tabela 1: os comprimentos de onda dos elementos devem ser informados com a resolução fornecida pelo instrumento.

R: A informação foi inserida (Tabela 1).

- Tabela 1: Qual a razão para usar vista radial para Cu e Fe? Existem instrumentos que não dispõem desta opção. Se for pela alta concentração, basta diluir a amostra.

R: A vista radial foi utilizada pois as linhas espectrais correspondentes se mostraram mais adequadas, com melhores recuperações para os analitos estudados. Como o instrumento dispõe dessa opção, a otimização foi feita e indicada pelo próprio equipamento.

- Página 6, linha 40: precisa ser feita uma descrição mais detalhada das amostras, procedimento de amostragem e número de amostras usadas no trabalho.

R: Os autores alteram o texto (Página 6, linha 19-21).

- Página 7, Digestão das amostras: citar uma referência em relação às condições experimentais. As amostras usadas na decomposição foram as que passaram pelo processo de extração lipídica?

R: Sim. As amostras digeridas foram as mesmas que passaram pelo processo de extração de lipídeos. Os autores alteraram o texto (página 7, linha 11).

- Página 8, linhas 26: a fração lipídica foi digerida nas mesmas condições da Tabela 2? A decomposição foi eficiente usando HNO₃ diluído a 180 °C? É muito importante verificar essa informação.

R: Sim. Os lipídeos foram digeridos conforme o programa de aquecimento descrito na tabela 2. A ausência de resíduos ao final da digestão permitiu inferir que não houve perdas de eficiência nesse processo. Além disso, outros estudos na literatura utilizaram metodologia semelhante à usada neste estudo, utilizando ácido nítrico diluído para frutas da região Amazônica (Alves et. al. Mineral Composition of Amazonian Fruits by Flame Atomic Absorption Spectrometry Using Multivariate Analysis, Biological Trace Element Research, v. 189, p. 259–266, 2019).

- Página 8, Extração sequencial das proteínas: foi feito algum balanço de massa somando as frações proteicas e comparando com o total de proteínas?

R: Não. O balanço de massa foi realizado entre as quantidades dos elementos presentes nas frações proteicas e a quantidade total desses elementos no digerido.

- Página 9, linhas 36-42: ensaio de recuperação da forma que foi feito não garante uma avaliação confiável da exatidão. Recomenda-se a comparação com outro método ou análise de material de referência certificado.

R: De acordo com referências na área, o uso de adição/recuperação é permitido na ausência de materiais de referência específicos (IUPAC).

- Página 9, determinação de proteína total: usar unidade de concentração em mg L⁻¹.

R: Os autores alteraram o texto (página 9, linha 30-31).

- Páginas 10 e 11: a discussão com a simples comparação com a literatura é pouco consistente, uma vez que na literatura foram analisadas amostras diferentes.

R: Não há trabalhos na literatura que usam o camapu como amostra, então foi feita a comparação com frutos da mesma família que o camapu, como o tomate e a beringela.

Os autores modificaram o texto, página 12 (17-27)

- Página 11, Avaliação estatística: esse item precisa ser descrito na parte experimental.

R: Os autores alteraram o texto (página 10, 21-26).

- Página 14, Exatidão do procedimento analítico: da forma como esse ensaio foi feito, esperava-se que a recuperação fosse da ordem de 100%. Ver comentário anterior a respeito desse assunto.

R: Todos os analitos estiveram de acordo com a faixa de recuperação aceitável conforme legislação, ou seja, entre 80 e 120% (ANVISA, 2017). O texto foi alterado (página 15, 5-11).

- Conclusão: está superficial (e similar a um resumo) e precisa ser revisada.

R: Os autores alteraram o texto (página 15, 17-24).

Revisor 2

Abstract

1. Mude 0.05 mol L⁻¹) sodium hydroxide by 0.05 mol L⁻¹ sodium hydroxide).

R: Os autores alteraram o texto, página 2, linha 7.

2. Mude cavity microwave oven by cavity-microwave oven

R: Os autores alteraram o texto, página 2, linha 8.

3. Mude All analyzed analytes were found in the protein fractions. Por: All the elements were determined in the protein fractions.

R: Os autores alteraram o texto, página 2, linhas 10-11.

4. The residue presented higher iron content. Higher Cu and Zn contents were found associated with albumin. This sentence is weird and should be revised as it was found higher content for all the elements.

R: Os autores alteraram o texto, página 2, linhas 12-13.

5. The total protein concentration determined in each protein fraction was 5.74 mg kg⁻¹ (albumins), 0.28 mg kg⁻¹ (globulins), 4.46 mg kg⁻¹ (glutelins 1), and 0.46 mg kg⁻¹ (glutelins 2). This study showed that the elements studied in camapu were found associated to proteins albumin, globulins, glutelins1, and glutelins 2. As informações estão repetidas nas duas sentenças e a frase deve ser reescrita em uma única.

R: Os autores alteraram o texto, página 2, 13-16.

Introdução

1. A referência citada está incorreta e deve ser revista. Segundo Bittencourt et al. (2019), o consumo regular de frutas é apontado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um importante fator de proteção e de prevenção das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT).

R: Os autores alteraram o texto, página 3, linha 16.

2. A frase: Estudos recentes na literatura têm evidenciado a importante associação entre o consumo adequado..... Este tipo de frase deve ser seguido de referencial bibliográfica e no texto não aparece nenhuma. Então, sugiro a incorporação de referências.

R: Os autores alteraram o texto, página 3, linha 12-16.

3. Linha 33: in natura deve ser em itálico.

R: Os autores alteraram o texto, página 3, linha 18.

4. O texto da página 1, da linha 40 até o parágrafo que termina na página 2, linha 5, deve ser revisto e reescrito.

R: Os autores alteraram o texto, página 3, linha 25-33; página 4, linha 1-2.

Parte experimental

1. Página 5, linha 3: As amostras foram pesadas em uma balança analítica com precisão de até quatro casas decimais (0,0001 g). Trocar por: As amostras foram pesadas em uma balança analítica.

R: Os autores alteraram o texto, página 5, linha 3.

2. Página 6, linha 22: Para o procedimento de extração sequencial das proteínas foram usadas as seguintes soluções extratoras: água ultrapura, NaCl (Neon Comercial, SP, Brasil), ácido acético (Êxodo Científica, SP, Brasil) e NaOH (Êxodo Científica, SP, Brasil). O termo solução extratora não está correto nessa sentença, pois se são soluções deveriam aparecer as concentrações. Acredito que aqui os autores deviam usar o termo reagentes. Acetona 80% (v v-1) deveria ser colocada junto ao parágrafo anterior se for mantido o termo solução.

R: Os autores alteraram o texto, página 6, linha 12-15.

3. Na Tabela 2, os autores deveriam substituir o termo Ambiente* pela temperatura registrada no equipamento, pois a temperatura ambiente varia grandemente nas diferentes regiões do Brasil.

R: Os autores alteraram o texto, Tabela 2.

4. Página 8, linha 19: centrifugado por 10 min à 3800 rpm. Neste caso não se usa crase

R: Os autores alteraram o texto, página 8, linha 7.

5. Página 8, linha 34: ao descrever o procedimento de extração, os autores não deixaram claro qual procedimento foi adotado entre as soluções extratoras. As soluções foram adicionadas diretamente sobre a amostra ou foi realizada uma etapa de limpeza entre as extrações?

R: Os autores alteraram o texto, página 8, linha 25-26.

Resultados e discussão

1. ICP OES não é uma técnica hifenada, portanto não deve ser escrito como ICP-OES.

2. A Tabela 4 e sua discussão deveria vir antes da Tabela 3, apresentação dos resultados.

R: Os autores alteraram o texto (Tabela 3 e 4).

- A conclusão deve ser reescrita procurando não repetir o que foi dito no item

resultados e discussão, mas destacando os principais avanços alcançados no trabalho.

R: Os autores alteraram o texto (página 15, 17-24).

Revisor 3

- Abstract, linha 17: observar espaçamento no trecho “in the protein fractions. Levels of Cu, Fe, and,Zn ranged from 0.07 to 0.5 mg kg⁻¹ were”.

R: Os autores alteraram o texto (página 2, linha 11-12).

- Introdução, pg 3, linha 52: “Sendo assim, algumas proteínas tendem ser solúveis”, alterar para “tendem a ser”.

R: Os autores alteraram o texto (página 3, linha 32).

- Introdução, pg 4, linha 9: “importante na atividade biológica do corpo humano. Esses íons estão ligados a proteínas” alterar para “ligados à proteínas”.

R: Os autores alteraram o texto (página 4, linha 4).

- Introdução, pg 4, linha 31: “diferentes metais (Cu, Fe, Mn e Zn) associados as proteínas. Xavier et. al. (2019),” alterar para “associados às proteínas”.

R: Os autores alteraram o texto (Tabela 1).

- Introdução, pg 4, linha 39: “a distribuição de constituintes inorgânicos em açaí, bacuri e cupuaçu, onde foi encontrado” alterar para “onde foram encontrados”.

R: Os autores alteraram o texto (Tabela 1).

- Parte experimental, pg 5, linha 27: “Thermo Scientific, USA” alterar para “EUA”.

R: Os autores alteraram o texto (Página 5, linha 17).

- Parte experimental, pg 5, linha 29: “As condições operacionais do ICP-OES” alterar para “operacionais do equipamento de ICP-OES” ou “operacionais da ICP-OES”.

R: Os autores alteraram o texto (página 5, linha 18 -19).

- Tabela 1: 1,15 kW? Alterar para k (letra minúscula).

R: Os autores alteraram o texto (Tabela 2).

- Tabela 2: Qual é a diferença entre as etapas 1 e 2? Qual o tempo de aumento da temperatura (rampa)? Qual o tempo de permanência na temperatura ajustada?

R: A etapa 1 corresponde à rampa e a etapa 2, corresponde ao patamar. As etapas foram rampa de 15 minutos para chegar à 180°C, permanecendo nesta temperatura por 15 minutos em uma potência de 800W.

- Parte experimental, pg 7, linha 55: Foi feita avaliação do teor de carbono?

R: Neste estudo, o teor de carbono não foi avaliado.

- Parte experimental, pg 9, linhas 19-23: A eficiência do preparo pode ser expressa avaliando-se parâmetros como acidez residual, teor de carbono de digeridos e etc. O procedimento aqui descrito parece limitar-se à avaliação da exatidão por meio de ensaio de adição, que permite a verificação de perdas e ou contaminações. Sugiro rever.

R: Os autores alteraram o texto (página 9, linhas 9-11).

- Parte experimental, pg 9, linha 35: Soluções da curva de calibração foram preparadas em que meio? HNO₃? Água?

R: A soluções da curva de calibração foram feitas em meio à HNO₃ 5%.

- Parte experimental, pg 9, linha 35: Por que faixas tão altas para calibração se as concentrações determinadas, com base na Tabela 3, foram na faixa de ug/L?

R: As concentrações obtidas nas amostras digeridas foram na faixa de mg/L, convertida para mg/kg baseado na massa de amostra utilizada (resultado apresentado na Tabela 3). A faixa analítica utilizada se mostrou adequada para o estudo, onde as concentrações dos analitos estiveram entre 3 e 7 mg/L.

- Resultados, pg 13, linha 15: "Níveis altos de Fe (8,8 mg kg⁻¹) foram encontrados associados a" alterar para "foram encontrados associados à".

R: Os autores alteraram o texto (página 13, linha 17).

- Resultados, pg 13, linha 39: “Fe (10,7 mg kg⁻¹) “quando comparado as frações proteicas” alterar para “quando comparado às frações proteicas”.

R: Os autores alteraram o texto (página 13, linha 31).

- Resultados, pg 14, linhas 15-24: “Eficiência do procedimento de preparo de amostras “; aqui repete-se o entendimento sobre eficiência x exatidão. Sugiro avaliar.

R: Os autores alteraram o texto (página 14, linha 13-19).

- Resultados, pg 14, linhas 54-58: Essa afirmação tem por base protocolos de extração sequenciais prévios, correto? Ao que consta neste documento, este estudo não fez a identificação seletiva de cada proteína. Sendo assim, este parágrafo deve refletir que esta hipótese está sendo assumida com base na literatura prévia.

R: Os autores alteraram o texto (Página 15, linha 1-4).

1 **Determinação e distribuição de Cu, Fe e Zn em camapu por ICP-OES**

2

3 **Cecilia Correia Pereira¹, Michelle de Souza Lemos¹, Kelly das Graças Fernandes**
4 **Dantas^{1*}** 

5

6 ¹*Grupo de Espectrometria Analítica Aplicada, Faculdade de Química, Instituto de*
7 ¹*Ciências Exatas e Naturais, Universidade Federal do Pará, 66075-970, Belém, PA,*
8 ¹*Brasil.*

9

10 *Email: kdgfernandes@ufpa.br

1 DETERMINATION AND DISTRIBUTION OF CU, FE, AND ZN IN CAMAPU BY
2 ICP OES

3 This study aimed to determine the total contents of copper, iron, and zinc in camapu and
4 protein fractions by inductively coupled plasma emission spectrometry. Firstly, lipid
5 removal was performed using chloroform and methanol (2:1). Protein fractions were
6 obtained after sequential extraction using four extractors (water, 0.5 mol L⁻¹ sodium
7 chloride, 50% acetic acid v v⁻¹ and 0.05 mol L⁻¹ sodium hydroxide). The camapu sample
8 and protein fractions were digested in a cavity-microwave oven with diluted nitric acid
9 and hydrogen peroxide. The accuracy of the procedure was evaluated using the addition
10 and recovery method in the digests and protein extracts. All the elements were
11 determined in the protein fractions. Levels of Cu, Fe, and Zn ranged from 0.07 to 0.5
12 mg kg⁻¹ were found in the lipid fraction. The residue presented higher iron content
13 compared to other elements. Higher Cu and Zn contents were found associated with
14 albumin. All elements studied were found in the protein fractions, and the total protein
15 concentration determined in each protein fraction was 5.74 mg kg⁻¹ (albumins), 0.28 mg
16 kg⁻¹ (globulins), 4.46 mg kg⁻¹ (glutelins 1) and 0.46 mg kg⁻¹ (glutelins 2).

17
18
19

Keywords: Sequential Extraction; metals; fruit; Metalloproteins; ICP OES.

1 INTRODUÇÃO

2

3 A região Amazônica é uma das regiões mais importantes quando se trata de
4 espécies frutíferas no Brasil. Os frutos da floresta proporcionam nutrientes, minerais e
5 antioxidantes que mantêm o corpo saudável e resistente às doenças (SHANLEY;
6 SERRA, 2011).

7 As frutas são alimentos indispensáveis para a composição de um padrão
8 saudável de alimentação, visto que esses alimentos contêm baixa densidade energética e
9 diversos elementos essenciais para a saúde, como vitaminas, minerais, fibras e outros
10 compostos bioativos, favorecendo a manutenção da saúde e do peso corporal (SILVA;
11 CLARO, 2019).

12 O consumo regular de frutas é apontado pela Organização Mundial da Saúde
13 (OMS) como um importante fator de proteção e de prevenção das doenças crônicas não
14 transmissíveis (DCNT). Estudos recentes na literatura têm evidenciado a importante
15 associação entre o consumo adequado desses alimentos e menor risco de mortalidade
16 por doença cardiovascular e neoplasias (BITTENCOURT et al. 2012).

17 Dentre a diversidade de frutas presentes na Amazônia tem-se a *Physalis*
18 *angulata*, conhecida como camapu. Nessa região, a fruta é consumida *in natura* e seu
19 suco é utilizado como sedativo, diurético, depurativo e antirreumático. Além disso, as
20 folhas são utilizadas no tratamento de inflamações vesicais, malária, hepatites e
21 dermatites (DIAS et al., 2020). Embora seja encontrado com frequência na região
22 amazônica, o camapu também é consumido mundialmente, em diversos países tais
23 como, a Colômbia, Equador, África do Sul, Quênia, Zimbábue, Austrália, Nova
24 Zelândia, Havaí, Índia, Malásia e China (RODRIGUES, 2009; NOVOA et al., 2006).

25 Os minerais, tais como o cobre, ferro e zinco são essenciais na dieta humana,
26 visto que exercem funções nutricionais e fisiológicas indispensáveis para o bom
27 funcionamento do organismo (HAMBIDGE, 2003; DOLAN; CAPAR, 2002). Os
28 microminerais presentes no organismo humano podem ser estudados a partir das
29 chamadas proteínas conjugadas, onde encontram-se ligados a elas os lipídeos
30 (lipoproteínas), açúcares (glicoproteínas) e metais (metaloproteínas) (TOGNON, 2012).

31 Algumas proteínas tendem a ser solúveis em água pura, enquanto que outras
32 precisam de sais, ácidos ou bases para se dissolverem. Também possuem grupos iônicos
33 livres ou carregados que migram em um campo elétrico. Devido a esse campo, as

1 proteínas se combinam com reagentes iônicos, resultando algumas vezes em compostos
2 insolúveis (CANTAROW; SCHEPARTZ, 1969).

3 De acordo com Gao et. al. (2007), os íons metálicos desempenham um papel
4 importante na atividade biológica do corpo humano. Esses íons estão ligados à proteínas
5 ou enzimas específicas as quais exercem seus efeitos como parte inerente do centro
6 ativo ou estrutural das proteínas.

7 Alguns estudos tem sido encontrados na literatura envolvendo procedimentos de
8 extração sequencial de proteínas em diferentes matrizes. Kwon et. al. (1996), realizaram
9 o fracionamento e a caracterização de proteínas de coco e observaram que albuminas e
10 globulinas eram predominantes nas frações de proteínas. Por outro lado, Naozuka et. al.
11 (2007), determinaram Cu, Fe, Mn e Zn em extratos de castanha do Brasil, semente de
12 cupuaçu e polpa de coco usando extração sólido-líquido e espectrometria de absorção
13 atômica com atomização eletrotérmica.

14 A determinação dos teores de Fe, Mn e Zn nas frações proteicas e conteúdo total
15 de proteínas em amostras de sementes de trigo e soja foi proposto por Bittencourt et al.
16 (2012). Os autores destacaram a extração sequencial como método na eficaz na
17 obtenção de frações contendo diferentes classes de proteínas e metais associados às
18 proteínas.

19 Teores de Fe e Zn obtidos em amostras de castanha de caju após extração e
20 posterior precipitação de proteínas a base de acetona forneceu informações a respeito da
21 bioacessibilidade desses elementos ligados a alguns grupos de proteínas, como
22 albumina, globulina e glutelina (XAVIER et. al., 2019).

23 Em um estudo envolvendo a distribuição de constituintes inorgânicos em frutas
24 regionais da Amazônia (açai, bacuri e cupuaçu) foram encontrados teores de Cu, Fe e
25 Zn associados às proteínas (TRINDADE, 2010).

26 Sendo assim, este estudo teve como objetivo a caracterização elementar e
27 proteica em camapu (*Physalis angulata*) a partir da determinação de Cu, Fe e Zn nos
28 digeridos, fração lipídica, fração proteica, resíduo da extração sequencial e do teor de
29 proteínas presentes no camapu.

30 **PARTE EXPERIMENTAL**

31 32 **Instrumentação**

33

1 Um liofilizador (L100 Liotop, São Carlos, SP, Brasil) foi utilizado no processo
2 de secagem das amostras até massa constante.

3 **As amostras foram pesadas utilizando uma balança analítica.**

4 Um moinho criogênico (Spex, 6770 Freezer/Mill, EUA) foi usado para
5 pulverizar as amostras a fim de obter melhor representatividade.

6 Para a separação das frações proteicas foi usada uma centrífuga (Quimis, São
7 Paulo, Brasil).

8 Um agitador do tipo Vortex (Quimis, São Paulo, Brasil) e um banho
9 termostático com agitação (**Q226M2, Quimis, São Paulo, Brasil**) foram usados para a
10 extração das proteínas presentes na amostra.

11 **Um forno de micro-ondas com cavidade foi utilizado para a digestão das**
12 **amostras (START E, Milestone, Sorisole, Itália).**

13 Para a determinação do teor de proteínas totais foi utilizado um
14 espectrofotômetro UV-Vis (Thermo Scientific, **EUA**) de feixe simples com caminho
15 óptico de 1 cm.

16 A determinação de Cu, Fe e Zn nos digeridos de camapu foi realizada usando
17 um espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente **ICP OES**
18 (**iCAP 6500, Thermo Scientific, EUA**). O gás utilizado para a manutenção do plasma
19 foi argônio de pureza 99,999% (Velox gás, Ananindeua, Pará). **As condições**
20 **operacionais do equipamento de ICP OES** estão apresentadas na Tabela 1.

21
22 **Tabela 1.** Condições operacionais para a determinação de Cu, Fe e Zn por ICP OES.

Parâmetros	Condições Operacionais
Potência de rádio frequência	1,15 kw
Vazão do Plasma	12 L min ⁻¹
Vazão do gás auxiliar	0,5 L min ⁻¹
Vazão do nebulizador	0,5 L min ⁻¹
Vazão de amostra	1,0 mL min ⁻¹
Nebulizador	Concêntrico
Câmara de nebulização	Ciclônica
Visão	Axial (a); Radial (b)
Elementos (λ /nm)	Cu (324,754 I)^b, Fe (238,204 II)^b, Zn (202,548 II)^a

23 I: Linha atômica; II: Linha iônica; a: axial; b: radial.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27

Reagentes, soluções e amostras

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Todas as diluições foram realizadas utilizando água ultrapura (resistividade 18,2 MΩ.cm) obtida a partir de um sistema de purificação Synergy-UV (Millipore, Bedford, EUA). As soluções analíticas de referência de Cu, Fe e Zn para o ICP-OES foram preparadas a partir da diluição adequada da solução padrão monoelementar contendo 1000 mg L⁻¹ (Sigma, EUA) de cada elemento.

A extração da fase lipídica das amostras de camapu foi realizada utilizando-se uma mistura de clorofórmio (Quimex, SP, Brasil) e metanol (Êxodo Científica, SP, Brasil).

Ácido acético 50% v v⁻¹ (Êxodo Científica, SP, Brasil), NaCl (Neon Comercial, SP, Brasil) e NaOH 0,05 mol L⁻¹ (Êxodo Científica, SP, Brasil) foram utilizados no preparo de soluções para o procedimento de extração sequencial das proteínas. Acetona 80% (v v⁻¹) foi utilizada para a precipitação das proteínas totais.

A digestão ácida foi realizada utilizando ácido nítrico (Neon Comercial, SP, Brasil) previamente purificado utilizando um sistema de subdestilação (Berghof, modelo BSP 929-IV, Alemanha) e peróxido de hidrogênio 30% m/m (Neon Comercial, SP, Brasil).

Para a determinação das proteínas totais foi utilizada uma mistura do corante de Comassie Brilliant Blue com álcool etílico concentrado e ácido fosfórico 85% (v v⁻¹).

Neste estudo foram utilizadas amostras de camapu adquiridas no município de Ananindeua-PA. As amostras foram coletadas diretamente da planta e armazenadas em sacos plásticos com vedação para evitar contaminação. Posteriormente, foram levadas ao laboratório para iniciar o procedimento de preparo de amostras.

Procedimento Analítico

Preparo da amostra

1 Os frutos de camapu foram submetidos ao procedimento de lavagem com água
2 desionizada para a retirada de impurezas, e em seguida a polpa foi transferida para
3 frascos previamente descontaminados. A amostra foi congelada, liofilizada e pulverizada
4 em moinho criogênico usando um programa com duas etapas de 2 min e uma etapa
5 entre os ciclos de 5 min e em seguida as amostras foram transferidas para frascos de
6 polietileno e armazenadas em um dessecador.

8 *Digestão das amostras*

9
10 O processo de digestão ácida das amostras foi realizado de acordo com o
11 procedimento proposto por **Alves et. al. (2019)** com modificações. Uma massa de
12 aproximadamente 0,25 g de amostra foi pesada em triplicata ($n = 3$) e em seguida 4 mL
13 de ácido nítrico (7 mol L^{-1}), 2 mL de H_2O_2 (30%, m m^{-1}) e 2 mL de água ultrapura
14 foram adicionados. Após a digestão, a solução obtida foi diluída com água ultrapura até
15 completar um volume de 15 mL. O programa de aquecimento do micro-ondas usado na
16 digestão das amostras de camapu está apresentado na Tabela 2.

17
18 **Tabela 2.** Programa de aquecimento do forno de micro-ondas.

Etapa	Tempo (min)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Potência (W)
1	15	180	800
2	15	180	800
3*	50	Ambiente*	0

19 *Etapa de ventilação **(Aproximadamente 25°C).**

20
21 A acidez final dos digeridos foi determinada por titulação e ajustada para 5%
22 para a posterior determinação de Cu, Fe e Zn por ICP-OES. Os parâmetros
23 instrumentais apresentados na Tabela 2.

24 25 **Procedimento de extração sequencial**

26 27 *Remoção de lipídeos*

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

No processo inicial de extração sequencial foi realizada a remoção dos lipídeos presentes no camapu. Cerca de 3,0 g da polpa seca de camapu previamente moída foi pesada em frascos volumétricos em triplicata ($n = 3$). Inicialmente, um volume de 30 mL de solução extratora de clorofórmio e metanol (2:1 v v⁻¹) foi adicionada. O frasco volumétrico contendo a mistura foi submetido a agitação por vórtex durante 15 min e centrifugado por 10 min a 3800 rpm. A separação do sobrenadante (fração lipídica) foi feita por filtração simples. O sólido (fração sem lipídeos) foi seco em estufa à uma temperatura de 30 °C por 20 min. Em seguida, a polpa de camapu sem lipídeos foi submetida ao procedimento de extração sequencial de proteínas. A fração lipídica foi armazenada em freezer para posterior digestão e análise conforme o procedimento de digestão da Tabela 2.

Extração sequencial das proteínas

O procedimento de extração sequencial foi adaptado de Kwon et. al. (1996) e Naozuka et. al. (2007). Aproximadamente 1,0 g da fração da amostra sem lipídeos foi pesada em triplicata ($n = 3$) em frascos volumétricos. Em seguida, a amostra foi submetida ao processo de extração sequencial empregando as seguintes soluções: água ultrapura (albuminas), solução aquosa de NaCl 0,5 mol L⁻¹ (globulinas), solução de ácido acético 50% (glutelinas-1) e NaOH 0,05 mol L⁻¹ (glutelinas-2). A cada etapa foram adicionados 20 mL de cada solução extratora e a mistura foi mantida sob agitação por vórtex durante 30 min. Após esse período, as misturas foram centrifugadas por 10 min à 3800 rpm e separado o sobrenadante por filtração simples. As frações proteicas obtidas foram armazenadas em freezer para posterior análise. Entre cada etapa de extração, o resíduo resultante foi lavado com água ultrapura e a solução de lavagem foi descartada. Após a extração sequencial, as frações proteicas obtidas foram precipitadas com 20 mL de solução de acetona 80% (v v⁻¹) a -14 °C durante 30 min. Após a precipitação, os frascos foram deixados à temperatura ambiente para evaporação do solvente. As proteínas precipitadas foram submetidas à digestão ácida conforme procedimento realizado para amostra e posterior análise.

1 **Digestão ácida das frações proteicas e dos resíduos obtidos no procedimento de** 2 **extração sequencial**

3

4 As frações proteicas e o resíduo obtidos proveniente do procedimento de
5 extração sequencial foram digeridos pelo procedimento de digestão ácida apresentado
6 na Tabela 2. Ao final da digestão, as soluções obtidas foram filtradas por filtração
7 simples e aferidas para 15 mL com água ultrapura. O programa de aquecimento do
8 forno de micro-ondas está descrito na Tabela 2.

9 A exatidão do procedimento de preparo de amostras foi avaliada pelo método de
10 adição e recuperação de analito, onde diferentes concentrações dos analitos foram
11 adicionados previamente à digestão.

12

13 **Determinação da concentração de Cu, Fe e Zn nos digeridos de camapu, fração** 14 **lipídica, frações proteicas e no resíduo final**

15

16 Os digeridos de camapu, da fração lipídica, das frações proteicas e do resíduo
17 foram submetidos à determinação de Cu, Fe e Zn por ICP OES usando curvas analíticas
18 preparadas em meio ácido (HNO_3) 5% contendo as concentrações de 2 a 10 mg L^{-1} .

19 O método de adição e recuperação foi realizado nos digeridos de camapu e nas
20 frações digeridas obtidas na extração sequencial para avaliar a exatidão do
21 procedimento de análise por ICP OES.

22 Nos digeridos e nas frações foram adicionadas concentrações de 3,0 mg L^{-1} Cu,
23 5,0 mg L^{-1} Fe e 7,0 mg L^{-1} Zn.

24

25 **Determinação de proteína total**

26

27 Para determinação de proteína total nas frações proteicas foi usado o método de
28 Bradford (1976). A calibração do espectrofotômetro foi realizada utilizando uma
29 solução estoque de albumina de soro bovino. As curvas analíticas foram construídas na
30 faixa de 2,0 – 20 mg L^{-1} após diluição adequada da solução estoque padrão de albumina
31 contendo 200 mg L^{-1} . Antes da análise, a amostra foi inicialmente submetida à leitura
32 de pH e posteriormente foi adicionado 0,5 mL da solução de NaOH 0,1 mol L^{-1} em 0,5
33 mL de cada fração proteica para obter um pH na faixa de 10,0 a 11,0. Após adição da

1 solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ foi retirada uma alíquota de 100 µL de cada fração e
2 acrescentado 1 mL do reagente de Bradford. As amostras foram deixadas para reagir por
3 um período de 5 min. Após este tempo a proteína foi quantificada por
4 espectrofotometria UV-VIS .

5

6 **Análise estatística**

7 A avaliação estatística foi realizada através do software IBM SPSS, versão 28
8 (SPSS inc; Chicago, IL, USA) para Windows. As concentrações dos elementos
9 estudados foram submetidas ao teste de Tukey (ANOVA) com nível de confiança de
10 95% (p <0,05) e ao test t de student para confirmar se apresenta ou não significância
11 estatística que mostre a diferença nos teores médios dos elementos entre si.

12

13 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

14

15 Os limites de detecção (LD), quantificação (LQ) e o coeficiente de correlação
16 para a determinação de Cu, Fe e Zn por ICP-OES são apresentados na Tabela 3. Para o
17 cálculo do LD e LQ foi utilizado a relação sinal/ ruído (SBR) e a concentração
18 equivalente ao sinal de fundo (BEC) para se obter a concentração do elemento com a
19 intensidade correspondente ao fundo na linha espectral que se deseja usar, como
20 mostram as equações 2 e 3.

21

$$\text{LD} = (3 \times \text{RSD}_B \times \text{BEC}) / 100 \text{ (equação 2)}$$

22

$$\text{LQ} = (10 \times \text{RSD}_B \times \text{BEC}) / 100 \text{ (equação 3)}$$

23

24 Em que $\text{RSD}_B = S_B / I_B$, onde S_B e I_B são o desvio padrão e a intensidade média
25 do branco ($n = 10$); e BEC é a concentração equivalente de fundo, que é calculado pela
26 razão entre a concentração e o SBR. (HOU; JONES, 2000).

27

28 **Tabela 3.** Limite de detecção e quantificação.

Elementos	LD (mg kg ⁻¹)	LQ (mg kg ⁻¹)	R ²
Cu	0,1	0,3	0,9999
Fe	0,2	0,6	0,9999

Zn

0,001

0,004

0,9997

Concentração total dos elementos no camapu

A concentração total (mg kg^{-1}) de Cu, Fe e Zn obtida no camapu por ICP-OES está apresentada na Tabela 4 com seus respectivos desvios-padrão.

Tabela 4. Teores médios \pm desvio padrão de Cu, Fe e Zn em camapu e seus respectivos desvio-padrão ($n=3$).

Elementos	Camapu (mg kg^{-1})
Cu	$10,8 \pm 0,9$
Fe	$32,7 \pm 1,4$
Zn	$22,0 \pm 0,9$

Pode ser observado na Tabela 4 que o Fe apresentou a maior concentração entre os elementos estudados, seguido de zinco e depois o cobre.

Trindade (2010) encontrou maiores teores de Fe, altos níveis de cobre e baixas concentrações de zinco em açaí (Fe: $39,4 \mu\text{g g}^{-1}$; Cu: $10,5 \mu\text{g g}^{-1}$; Zn: $20,3 \mu\text{g g}^{-1}$), bacuri (Fe: $46,2 \mu\text{g g}^{-1}$; Cu: $14,6 \mu\text{g g}^{-1}$; Zn: $6,3 \mu\text{g g}^{-1}$) e cupuaçu (Fe: $37,4 \mu\text{g g}^{-1}$; Cu: $2,9 \mu\text{g g}^{-1}$; Zn: $17,2 \mu\text{g g}^{-1}$) quando comparado aos valores obtidos neste estudo.

Bittencourt e colaboradores (2012) encontraram teores de ferro ($33 \mu\text{g g}^{-1}$) em sementes de trigo próximos ao valor encontrado neste estudo. Por outro lado, maiores teores de cobre e de zinco foram encontrados por esses autores quando comparado aos teores desses elementos no camapu.

Naozuka et al. (2007) determinaram Cu, Fe e Zn em castanha do Brasil ($4,4$, $8,7$ e $6,9 \mu\text{g g}^{-1}$), semente de cupuaçu ($0,84$, $3,0$ e $14 \mu\text{g g}^{-1}$) e polpa de coco ($1,1$, $6,4$ e $3,4 \mu\text{g g}^{-1}$) e encontraram menores níveis de Cu, Fe e Zn quando comparado com os valores obtidos para o camapu.

Xavier et al. (2019) obtiveram elevados teores de Fe ($55,0 \text{mg kg}^{-1}$) e Zn ($41,0 \text{mg kg}^{-1}$) em castanha de caju quando comparado aos valores encontrados neste estudo.

Os estudos a respeito da composição do camapu ainda são insipientes. Entretanto, outros estudos na literatura foram realizados em frutas e hortaliças

1 pertencentes à mesma família (*Solanaceae*), como por exemplo, a berinjela, pimentão,
2 batata e pimenta, além do tomate.

3 Bressy (2011) em seu trabalho quantificou, em tomate, teores menores e maiores
4 para Cu ($4,15 \mu\text{g g}^{-1}$) e Fe ($43,3 \mu\text{g g}^{-1}$), respectivamente e em relação ao Zn ($20,1 \mu\text{g g}^{-1}$
5) obteve teores próximos quando comparados aos teores de Zn ($22,0 \text{ mg kg}^{-1}$) neste
6 estudo. Scorsatto et al. (2017) estudaram a composição de alguns minerais presentes na
7 berinjela e encontraram teores de Cu ($10,0 \text{ mg kg}^{-1}$) e Zn ($21,0 \text{ mg kg}^{-1}$) próximos aos
8 determinados neste trabalho (Cu: $10,8 \text{ mg kg}^{-1}$ e Zn: $22,0 \text{ mg kg}^{-1}$). Enquanto que a
9 concentração de Fe ($29,0 \text{ mg. kg}^{-1}$) foi menor quando comparado a quantidade
10 encontrada neste estudo (Fe: $32,7 \text{ mg. kg}^{-1}$).

12 Determinação de Cu, Fe e Zn nas frações lipídica, proteicas e no resíduo

14 Os teores de Cu, Fe e Zn nas frações lipídicas, frações proteicas e no resíduo
15 estão apresentados na Tabela 5.

17 **Tabela 5.** Concentrações de Cu, Fe e Zn nas frações e no resíduo, somatória das frações
18 e seus respectivos desvios padrão ($n = 3$)

Frações	Cu (mg kg^{-1})	Fe (mg kg^{-1})	Zn (mg kg^{-1})
Lipídeo	$0,2^c \pm 0,1$	$0,5^c \pm 0,1$	$0,07^b \pm 0,004$
Água	$3,4^a \pm 0,1$	$8,7^{ab} \pm 1,4$	$14,9^a \pm 1,8$
NaCl	$1,6^{bc} \pm 0,01$	$8,8^a \pm 0,1$	$3,6^{ab} \pm 0,03$
Ácido acético	$2,3^{ab} \pm 0,2$	$1,8^{bc} \pm 0,01$	$1,1^b \pm 0,3$
NaOH	$0,3^c \pm 0,1$	$1,0^c \pm 0,1$	$0,8^b \pm 0,2$
Resíduo	$2,94^{ab} \pm 0,6$	$10,7^a \pm 1,0$	$1,0^b \pm 0,01$
Σ Frações	10,74	31,50	21,47
Digerido	10,80	32,70	22,00

19 Σ = Somatório. Os resultados representam médias em triplicatas. Médias indicadas por letras iguais na
20 mesma coluna, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.
21
22

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

O somatório dos teores de Cu, Fe e Zn em todas as frações (lipídeos, proteínas e resíduo) foi comparado ao valor da concentração total dos elementos estudados presentes no camapu. O teste *t* Student mostrou que os resultados não apresentam diferenças significativas entre si.

Pode ser observado que na maioria das frações, o Fe está em maior quantidade quando comparado ao Cu e Zn.

Na fração lipídica, todos os elementos estudados foram encontrados em baixas concentrações. Essa associação de íons metálicos com os lipídeos pode ser explicada pela presença de compostos de sulfolipídeos e fosfolipídeos. O primeiro composto é constituído de dois ácidos graxos, galactose e um grupo sulfonato. Por outro lado, os fosfolipídeos contêm uma molécula de glicerol, duas cadeias de ácido graxo, além de um grupo fosfato (SZPUNAR, 2000; MORENO et al., 2004). Os grupos sulfonato e fosfato são polares, logo possuem cargas negativas que são capazes de interagir com cátions (TRINDADE, 2010), como Cu, Fe e Zn, elementos de interesse nesse estudo.

Cobre, ferro e zinco foram encontrados nas frações proteicas extraídas com NaCl e ácido acético. Nessas frações, o Cu apresentou teores de 1,6 mg kg⁻¹ e 2,3 mg kg⁻¹, respectivamente. Níveis altos de Fe (8,8 mg kg⁻¹) foram encontrados associados à proteína globulina, enquanto baixos níveis desse elemento (1,8 mg kg⁻¹) foram estavam associados à proteína glutelina-1. Por outro lado, o maior teor de zinco (3,6 mg kg⁻¹) foi encontrado na fração das globulinas.

Segundo Anderson e Porath (1986), íons metálicos como Fe³⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Al³⁺ e Ca²⁺ geralmente têm capacidade de interagir com proteínas, por apresentarem caráter ácido intermediário.

Os resultados mostraram que a maior quantidade de Cu e Zn foi proveniente da extração com a água, indicando que esses elementos podem estar associados à proteína albumina, visto que esse extrator é responsável por extrair preferencialmente a albumina.

Na extração utilizando solução de NaOH foi observado um elevado teor de Fe (1,0 mg kg⁻¹) associado às glutelinas-2 quando comparado ao cobre (0,3 mg kg⁻¹) e zinco 0,8 mg kg⁻¹.

O resíduo final resultante da extração sequencial apresentou um elevado teor de Fe (10,7 mg kg⁻¹) quando comparado às frações proteicas estudadas e aos lipídeos. Isso

1 pode ser devido ao ferro estar ligado a uma proteína diferente das proteínas estudadas e,
2 ainda, em outra substância que não seja proteína. Diante disso, a utilização de outros
3 extratores que possam extrair uma proteína diferente das estudadas se faz necessária para
4 identificar a presença desse elemento.

5 Comparando-se a distribuição do zinco com os demais elementos estudados,
6 pode ser observado que esse elemento foi obtido em maior concentração na fração
7 extraída com a água, ou seja, associado às albuminas. Bittencourt et al. (2012)
8 encontrou Cu associado as albuminas, enquanto Fe e Zn estavam associados as
9 glutelinas-2 em sementes de trigo. Xavier et al. (2019) determinaram a bioacessibilidade
10 de Fe e Zn associadas as proteínas de castanha de caju e encontraram Fe e Zn ligado a
11 alguns grupos de proteína como albumina, globulina e glutelina.

12

13 **Exatidão**

14 A exatidão do procedimento foi avaliada pelo método de adição e recuperação
15 e as recuperações obtidas variaram de 99,8 a 104,6% (Cu), 100,8 a 102,9% (Fe) e de
16 98,3 a 101,4% (Zn). Para todos analitos, as recuperações estiveram de acordo com a
17 faixa de recuperação aceitável de 80% - 120%, indicando uma boa exatidão do
18 procedimento analítico (ANVISA, 2017).

19 As recuperações encontradas para a exatidão do procedimento de preparo das
20 amostras variaram de 91,9 a 107,9% (Cu), 88,3 a 109,6% (Fe) e 94,2 a 101,2% (Zn).
21 Diante desses resultados pode-se inferir que não houve perdas dos analitos durante o
22 procedimento de preparo de amostras.

23

24 **Teor de proteína total**

25 As concentrações das proteínas foram calculadas a partir da equação da reta e
26 o coeficiente de correlação (R) foram iguais a $y = 0,0011x + 0,0919$. A curva de
27 calibração obtida apresentou o coeficiente de correlação (R) igual a 0,9973. Os teores de
28 proteínas obtidos estão apresentadas na Tabela 6.

29 **Tabela 6.** Concentração total de proteínas (mg kg^{-1}) nas frações proteicas de camapu e
30 seus respectivos desvios-padrão ($n = 3$)

31

Frações	Concentração (mg kg^{-1})
Água (Albumina)	$5,74 \pm 0,10$

NaCl (Globulina)	0,28 ± 0,01
Ácido acético (Glutelina 1)	4,46 ± 0,20
NaOH (Glutelina 2)	0,46 ± 0,02

1 Fonte: o autor.

2 Baseado em estudos prévios da literatura, a utilização da água à 60 °C e dos
3 reagentes extratores NaCl, ácido acético e NaOH promove a extração de proteínas dos
4 grupos da albumina, globulina, glutelina-1 e glutelina-2, respectivamente (KWON et al.,
5 1996; NAOZUKA et al., 2007; TRINDADE, 2010).

6 Pode ser observado que a maior concentração das proteínas foi encontrada no
7 extrator de água a 60 °C (5,74 mg kg⁻¹), seguida do ácido acético (4,46 mg kg⁻¹). Os
8 menores teores foram encontrados nos extratores NaOH (0,46 mg kg⁻¹) e NaCl (0,28 mg
9 kg⁻¹).

10 Bittencourt et. al. (2012) afirmaram que a quantificação de proteínas totais
11 depende da metodologia adotada e da composição química da amostra. Desse modo, a
12 escolha do método a ser utilizado é de suma importância, levando em consideração a
13 sensibilidade, natureza dos constituintes da amostra e o grau de confiabilidade nos
14 resultados obtidos devido aos interferentes da amostra e do método escolhido.

15

16 CONCLUSÃO

17

18 O procedimento proposto para extração sequencial foi adequado para a
19 determinação de Cu, Fe e Zn associados às metaloproteínas estudadas. A identificação e
20 a quantificação dos analitos nas diferentes frações de proteínas é apenas uma etapa
21 inicial para a caracterização das metaloproteínas em camapu. Estudos complementares
22 sobre a biodisponibilidade são necessários para verificar a quantidade desses nutrientes
23 que pode ser absorvida pelo organismo. Os teores de Cu, Fe e Zn associados às
24 proteínas encontrados no camapu confirmaram que este fruto apresenta-se com uma
25 fonte rica de minerais essenciais importantes para o organismo humano.

26

27 REFERÊNCIAS

28 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. RESOLUÇÃO
29 DE DIRETORIA COLEGIADA Nº 166: **Validação de métodos analíticos**. 2017. 21
30 p.

31

1 ALVES, B. F.; PEREIRA JUNIOR, J. B.; CARVALHO, F. I. M.; DANTAS FILHO, H.
2 A.; DANTAS, K. G. F. **Biol. Trace Elem. Res**, 189: 259-266. 2019.
3
4 ANDERSSON, L.; PORATH, J. **Anal. Biochem**, 154: 250. 1986.
5
6 ANVISA. Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Aprova Regulamento
7 Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a
8 rotulagem nutricional. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 2003.
9
10 BITTENCOURT, M. L.; DIOGO A. P. D; AUGUSTI, L. R; COSTA, L. M.
11 Determinação de Cu, Fe, Mn, Zn e do Teor de Proteína Total em Amostras de Trigo e
12 Soja após Procedimento de Extração Sequencial. **Quim. Nova**, v. 35, n. 10, 1922-1926,
13 2012.
14
15 BRADFORD, M.M.A rapid and sensitive method for the quantitation of
16 microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
17 **Anal. Biochem**,v.72, p.248, 1976.
18
19 BRESSY, F. C. **Determinação de micronutrientes e contaminantes em**
20 **amostras de tomates por técnicas espectroanalíticas**.2011. Dissertação
21 (Mestrado em Química Analítica). Universidade Federal da Bahia, 2011.
22
23 CANTAROW, A.; SCHEPARTZ, B. 1969. **Biochemistry**. 4ª Ed., Atheneus S. A. Rio
24 de Janeiro.920pp (in Portuguese).
25
26 DIAS, F. G. B; FERREIRA, M. J. G; SILVA, L. M. R; MENEZES, R. C.S;
27 FIGUEIREDO, E. A. T. Bioaccessibility of the bioactive compounds and antimicrobial
28 activity of aqueous extracts of *Physalis angulata* L.1. **Revista Ciência Agronômica**, v.
29 51, n. 3, e 20196619, 2020.
30
31 DOLAN, S.P.; CAPAR, S. G. Mult-element analysis of food by microwave digestion
32 and inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. **Journal of Food**
33 **Composition and Analysis**, 15: 593-615. 2002.
34
35 HAMBIDGE, K. M.; Biomarkers of mineral trace intake and status. **J Nutr**, 133: 948S-
36 55S. 2003.
37
38 HOU, Xiandeng; JONES, Bradley T. Inductively coupled plasma/optical emission
39 spectrometry. **Encyclopedia of analytical chemistry**, v. 11, p. 9468-9485, 2000.
40
41 KWON, K., Park, K. H., Rhee, K. C. Fractionation and Characterization of proteins
42 from coconut (*Cocos nucifera* L.). **American Chem. Society**, v. 44 (7), 1741-1745,
43 1996.
44
45 NAOZUKA, J., OLIVEIRA, P. V. Cu, Fe, Mn and Zn Distribution in Protein Fractions
46 of Brazil-Nut, Cupuassu Seed and Coconut Pulp by Solid-Liquid Extraction and
47 Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry, **J. Braz. Chem. Society**, 1547-1553,
48 2007.
49

- 1 NOVOA, R. H. et al. **La madurez del fruto y el secado del cáliz influyen en el**
2 **comportamiento poscosecha de la uchuva (*Physalis peruviana* L.) almacenada a 12**
3 **°C.** *Agronomía Colombiana*, v. 24, n. 1, p. 77-86, 2006.
- 4 Scorsatto, M.; PIMENTEL, A. C. SILVA, A. J. R.; SABALLY, K.; ROSA, G.;
5 OLIVEIRA, G. M. M. Avaliação de Compostos Bioativos, Composição Físico-
6 Química e Atividade Antioxidante In Vitro da Farinha de Berinjela. **International**
7 **Journal of Cardiovascular Sciences**, 2017.
- 8
9 RODRIGUES, E.; ROCKENBACH, I. I.; CATANEO, C.; GONZAGA, L.V.;
10 CHAVES, S.E.; FETT, R. **Minerals and essential fatty acids of the exotic fruit**
11 ***Physalis peruviana* L.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 29 (3), Setembro 2009.
- 12
13 SHANLEY P, SERRA M MEDINA G (2011). **Árvores frutíferas e plantas úteis na**
14 **vida Amazônica.** FAO CIFOR e PPI. Disponível em:
15 <http://www.fao.org/docrep/015/i2360e/i2360e.pdf>. Acessado em 2 de dezembro de
16 2019
- 17
18 SILVA. L. E. S.; CLARO.R. M. **Tendências temporais do consumo de frutas e**
19 **hortaliças entre adultos nas capitais brasileiras e Distrito Federal, 2008-2016.** *Cad.*
20 *Saúde Pública* 2019.
- 21
22
23 SILVA, E. B.; FIORAVANTI, M. C. S.; SILVA, L. ARAÚJO, F. E. G.; MENEZES, L.
24 B.; MIGUEL, M. P.; VIERIRA, D. **Característica leucocitária, relação**
25 **albumina/globulina, proteína plasmática e fibrinogênio de bovinos da raça Nelore,**
26 **confinados e terminados a pasto.** *Ciência rural*, v.38, n.8, nov, 2008.
- 27
28 SPUNAR, J. Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis:
29 metallomics, metalloproteomics, and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics.
30 **Analyst**, v. 130, p. 442-465, 2005.
- 31
32 TOGNON, A.L. **Quantificação e avaliação da bioacessibilidade in vitro de micro e**
33 **macro elementos em frutas, hortaliças e cereais.** Dissertação (Ciências- Química).
34 Universidade de São Paulo, 2012.
- 35
36 Thompson, M.; Stephen, L.; Ellison, R.; Wood, R. Harmonized Guidelines for Single-
37 Laboratory Validation of Methods of Analysis (IUPAC Technical Report). *Pure App.*
38 *Chem.* 2002, 75, 835–855.
- 39
40 TRINDADE, S. L. **Determinação e distribuição de elementos-traço em frutas**
41 **regionais.** Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal do Pará, 2010.
- 42
43 XAVIER, A. D. S; FURTADO, D. Z. S; ASSUNÇÃO, N. A; NASCIMENTO, A. N.
44 **Bioaccessibility of Fe and Zn (associated to proteins) in cashew nut. *Journal of Food***
45 **Composition and Analysis.** 2019.