

## DETERMINAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE Cu, Fe E Zn EM CAMAPU POR ICP-OES

Cecilia Correia Pereira<sup>a</sup>, Michelle de Souza Lemos<sup>a</sup> e Kelly das Graças Fernandes Dantas<sup>a,\*</sup><sup>a</sup>Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Federal do Pará, 66075-970 Belém – PA, Brasil

Recebido em 02/04/2023; aceito em 21/12/2023; publicado na web 13/03/2024

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

Keywords: sequential extraction; metals; fruit; metalloproteins; ICP-OES.

## 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.<sup>1</sup>

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.<sup>2</sup>

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.<sup>3</sup>

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.<sup>4</sup> Embora seja encontrado com frequência na região Amazônica, o camapu também é consumido mundialmente, em diversos países tais como, a Colômbia, Equador, África do Sul, Quênia, Zimbábue, Austrália, Nova Zelândia, Havai, Índia, Malásia e China.<sup>5,6</sup>

Os minerais, tais como o cobre, ferro e zinco são essenciais na dieta humana, visto que exercem funções nutricionais e fisiológicas indispensáveis para o bom funcionamento do organismo.<sup>7,8</sup> Os microminerais presentes no organismo humano podem ser estudados a partir das chamadas proteínas conjugadas, onde se encontram ligados a elas os lipídeos (lipoproteínas), açúcares (glicoproteínas) e metais (metalloproteínas).<sup>9</sup>

Algumas proteínas tendem a ser solúveis em água pura, enquanto que outras precisam de sais, ácidos ou bases para se dissolverem. Também possuem grupos iônicos livres ou carregados que migram em

um campo elétrico. Devido a esse campo, as proteínas se combinam com reagentes iônicos, resultando algumas vezes em compostos insolúveis.<sup>10</sup>

Os íons metálicos desempenham um papel importante na atividade biológica do corpo humano. Esses íons estão ligados às proteínas ou enzimas específicas às quais exercem seus efeitos como parte inerente do centro ativo ou estrutural das proteínas.<sup>11</sup>

Alguns estudos têm sido encontrados na literatura envolvendo procedimentos de extração sequencial de proteínas em diferentes matrizes. Kwon *et al.*<sup>12</sup> realizaram o fracionamento e a caracterização de proteínas de coco e observaram que albuminas e globulinas eram predominantes nas frações de proteínas. Naozuka e Oliveira<sup>13</sup> determinaram Cu, Fe, Mn e Zn em extratos de castanha do Brasil, semente de cupuaçu e polpa de coco usando extração sólido-líquido e espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica. Bittencout *et al.*<sup>3</sup> determinaram Fe, Mn e Zn nas frações proteicas e no conteúdo total de proteínas em amostras de sementes de trigo e soja. Os autores destacaram a extração sequencial como método eficaz na obtenção de frações contendo diferentes classes de proteínas e metais associados às proteínas. Xavier *et al.*<sup>14</sup> obtiveram teores de Fe e Zn em amostras de castanha de caju após extração e posterior precipitação de proteínas a base de acetona fornecendo informações a respeito da bioacessibilidade desses elementos ligados a alguns grupos de proteínas, como albumina, globulina e glutelina. Trindade<sup>15</sup> estudou a distribuição de constituintes inorgânicos em frutas regionais da Amazônia (açai, bacuri e cupuaçu) e encontrou níveis de Cu, Fe e Zn associados às proteínas.

Sendo assim, este estudo teve como objetivo a caracterização elementar e proteica em camapu (*Physalis angulata*) a partir da determinação de Cu, Fe e Zn nos digeridos, fração lipídica, fração proteica e resíduo da extração sequencial. Além disso, o teor de proteínas presentes no camapu foi determinado.

## PARTE EXPERIMENTAL

## Instrumentação

Um liofilizador (L100 Liotop, São Carlos, Brasil) foi utilizado no

\*e-mail: kdgfernandes@ufpa.br

processo de secagem das amostras até massa constante.

As amostras foram pesadas utilizando uma balança analítica.

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 (Q226M2, Quimis, São Paulo, Brasil) foram usados para a extração das proteínas presentes na amostra.

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

Para a determinação do teor de proteínas totais foi utilizado um espectrofotômetro UV-Vis (Thermo Scientific, EUA) de feixe simples com caminho óptico 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 (ICP-OES) (iCAP 6500 Duo, Thermo Scientific, EUA). 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

Parâmetro	Condições operacionais
Potência de radiofrequência	1,15 kW
Vazão do plasma	12 L min <sup>-1</sup>
Vazão do gás auxiliar	0,5 L min <sup>-1</sup>
Vazão do nebulizador	0,5 L min <sup>-1</sup>
Vazão de amostra	1,0 mL min <sup>-1</sup>
Nebulizador	Concêntrico
Câmara de nebulização	Ciclônica
Visão	Axial (a); Radial (b)
Elementos ( $\lambda$ nm <sup>-1</sup> )	Cu (324,754 I) <sup>b</sup> , Fe (238,204 II) <sup>b</sup> , Zn (202,548 II) <sup>a</sup>

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 M $\Omega$  cm) obtida a partir de um sistema de purificação Synergy-UV (Millipore, Bedford, EUA). As soluções analíticas de referência de Cu, Fe e Zn foram preparadas a partir da diluição adequada da solução padrão monoelementar contendo 1000 mg L<sup>-1</sup> (Sigma, EUA) de cada elemento.

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

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

A digestão ácida foi realizada utilizando ácido nítrico concentrado (Neon Comercial, São Paulo, Brasil) previamente purificado utilizando um sistema de subdestilação (Berghof, modelo BSP 929-IV, Alemanha) e peróxido de hidrogênio 30% m m<sup>-1</sup> (Neon Comercial, São Paulo, 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<sup>-1</sup>).

Neste estudo foram utilizadas amostras de camapu adquiridas no município de Ananindeua, PA, Brasil. 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

Os 250 frutos de camapu foram submetidos ao procedimento de lavagem com água deionizada 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, em seguida as amostras foram transferidas para frascos de polietileno e armazenadas em um dessecador.

### Digestão das amostras

Uma massa de aproximadamente 0,25 g de amostra foi pesada em triplicata ( $n = 3$ ) e em seguida 4 mL de ácido nítrico (7 mol L<sup>-1</sup>), 2 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%, m m<sup>-1</sup>) e 2 mL de água ultrapura foram adicionados.<sup>16</sup> 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 consistiu em três etapas: (i) rampa de aquecimento de 25 a 180 °C em 15 min a 800 W; (ii) patamar em 180 °C por 15 min a 800 W; (iii) ventilação até temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) por 50 min.

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.

## Procedimento de extração sequencial

### Extração de lipídeos

No processo inicial de extração sequencial foi realizada a extração 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<sup>-1</sup>) foi adicionado. O frasco volumétrico contendo a mistura foi submetido à 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 conforme o procedimento descrito anteriormente para digestão das amostras.

### Extração sequencial das proteínas

O procedimento de extração sequencial foi adaptado de Kwon *et al.*<sup>12</sup> e, Naozuka e Oliveira.<sup>13</sup> 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<sup>-1</sup> (globulinas), solução de ácido acético 50% (glutelinas-1) e NaOH 0,05 mol L<sup>-1</sup> (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<sup>-1</sup>) 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 proveniente do procedimento de extração sequencial foram digeridos pelo procedimento de digestão ácida. 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 foi o mesmo utilizado para a digestão ácida.

A eficiência do procedimento de preparo de amostras foi avaliada pelo método de adição e recuperação de analito, onde foram adicionadas concentrações de 0,8, 1,0 e 1,3 mg L<sup>-1</sup> de Cu, Fe e Zn às amostras 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 preparadas em meio ácido (HNO<sub>3</sub>, 5% v v<sup>-1</sup>) contendo as concentrações de 0, 2, 4, 6, 8 e 10 mg L<sup>-1</sup>.

O método de adição e recuperação de analito foi usado para avaliar as medidas por ICP-OES nos digeridos de camapu e nas frações digeridas obtidas na extração sequencial. Nos digeridos e nas frações foram adicionadas concentrações de 3,0, 5,0 e 7,0 mg L<sup>-1</sup> de Cu, Fe e Zn.

### Determinação de proteína total

Para determinação de proteína total nas frações proteicas foi usado o método de Bradford.<sup>17</sup> 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 mg L<sup>-1</sup> após diluição adequada da solução estoque padrão de albumina contendo 200 mg L<sup>-1</sup>. 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<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> 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.

### Análise estatística

A avaliação estatística foi realizada através do *software* IBM SPSS, versão 20 (IBM Corp., Armonk, NY) para Windows.<sup>18</sup> As concentrações dos elementos estudados foram submetidas ao teste de Tukey (ANOVA) com nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ) e ao test *t*

de Student para confirmar se apresenta ou não significância estatística que mostre a diferença nos teores médios dos elementos entre si.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os limites de detecção (LOD), quantificação (LOQ) e o coeficiente de correlação para a determinação de Cu, Fe e Zn por ICP-OES são apresentados na Tabela 2. Para o cálculo do LOD e LOQ 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 1 e 2.

$$\text{LOD} = (3 \times \text{RSD}_B \times \text{BEC}) / 100 \quad (1)$$

$$\text{LOQ} = (10 \times \text{RSD}_B \times \text{BEC}) / 100 \quad (2)$$

Sendo,  $\text{RSD}_B = S_B / I_B$ , onde  $S_B$  e  $I_B$  são, respectivamente, o desvio padrão e a intensidade média do branco ( $n = 10$ ), e o BEC é a concentração equivalente de fundo, que é calculado pela razão entre a concentração e o SBR.<sup>19</sup>

As equações da reta obtidas para Cu, Fe e Zn foram  $y = 581,25x + 30,451$  ( $R^2 = 0,9999$ ),  $y = 133,08x + 4,1786$  ( $R^2 = 0,9999$ ) e  $y = 14778x + 1790,4$  ( $R^2 = 0,9997$ ).

**Tabela 2.** Limite de detecção e quantificação

Elemento	LOD (mg kg <sup>-1</sup> )	LOQ (mg kg <sup>-1</sup> )
Cu	0,1	0,3
Fe	0,2	0,6
Zn	0,001	0,004

### Concentração total dos elementos no camapu

A concentração total (mg kg<sup>-1</sup>) 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 desvios padrão ( $n = 3$ )

Elemento	Camapu (mg kg <sup>-1</sup> )
Cu	10,8 ± 0,9
Fe	32,7 ± 1,4
Zn	22,0 ± 0,9

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

Trindade<sup>15</sup> encontrou maiores teores de Fe, altos níveis de Cu e baixas concentrações de Zn em açaí (Fe: 39,4; Cu: 10,5; Zn: 20,3 µg g<sup>-1</sup>), bacuri (Fe: 46,2; Cu: 14,6; Zn: 6,3 µg g<sup>-1</sup>) e cupuaçu (Fe: 37,4; Cu: 2,9; Zn: 17,2 µg g<sup>-1</sup>) quando comparado aos valores obtidos neste estudo.

Bittencourt *et al.*<sup>3</sup> encontraram teores de Fe (33 µg g<sup>-1</sup>) em sementes de trigo, próximo ao valor encontrado neste estudo. Por outro lado, maiores teores de Co e de Zn foram encontrados por esses autores quando comparado aos teores desses elementos no camapu.

Naozuka e Oliveira determinaram Cu, Fe e Zn em castanha do Brasil (4,4 8,7 e 6,9 µg g<sup>-1</sup>), semente de cupuaçu (0,84, 3,0 e 14 µg g<sup>-1</sup>) e polpa de coco (1,1, 6,4 e 3,4 µg g<sup>-1</sup>) e encontraram menores níveis de Cu, Fe e Zn quando comparado com os valores obtidos para o camapu.

Xavier *et al.*<sup>14</sup> obtiveram elevados teores de Fe (55,0 mg kg<sup>-1</sup>) e Zn (41,0 mg kg<sup>-1</sup>) 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 pertencentes à mesma família (*Solanaceae*), tais como a berinjela, pimentão, batata, pimenta e tomate.

Bressy<sup>20</sup> quantificou teores menores e maiores para Cu (4,15 µg g<sup>-1</sup>) e Fe (43,3 µg g<sup>-1</sup>) em tomate e, em relação ao Zn (20,1 µg g<sup>-1</sup>) obteve teores próximos quando comparados aos teores de Zn (22,0 mg kg<sup>-1</sup>) neste estudo. Scorsatto *et al.*<sup>21</sup> estudaram a composição de alguns minerais presentes na berinjela e encontraram teores de Cu (10,0 mg kg<sup>-1</sup>) e Zn (21,0 mg kg<sup>-1</sup>) próximos aos determinados neste trabalho (Cu: 10,8 e Zn: 22,0 mg kg<sup>-1</sup>). Por outro lado, a concentração de Fe (29,0 mg kg<sup>-1</sup>) foi menor quando comparado a quantidade encontrada neste estudo (Fe: 32,7 mg kg<sup>-1</sup>).

#### 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 4.

**Tabela 4.** 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 <sup>-1</sup> )	Fe (mg kg <sup>-1</sup> )	Zn (mg kg <sup>-1</sup> )
Lipídeo	0,2 <sup>c</sup> ± 0,1	0,5 <sup>c</sup> ± 0,1	0,07 <sup>b</sup> ± 0,004
Água	3,4 <sup>a</sup> ± 0,1	8,7 <sup>ab</sup> ± 1,4	14,9 <sup>a</sup> ± 1,8
NaCl	1,6 <sup>bc</sup> ± 0,01	8,8 <sup>a</sup> ± 0,1	3,6 <sup>ab</sup> ± 0,03
Ácido acético	2,3 <sup>ab</sup> ± 0,2	1,8 <sup>bc</sup> ± 0,01	1,1 <sup>b</sup> ± 0,3
NaOH	0,3 <sup>c</sup> ± 0,1	1,0 <sup>c</sup> ± 0,1	0,8 <sup>b</sup> ± 0,2
Resíduo	2,94 <sup>ab</sup> ± 0,6	10,7 <sup>a</sup> ± 1,0	1,0 <sup>b</sup> ± 0,01
Σ Frações	10,74	31,50	21,47
Digerido	10,80	32,70	22,00

Σ = 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 (lipídeos, proteínas e resíduo) foi comparado ao valor da concentração total dos elementos estudados presentes no camapu. O teste *t* Student foi aplicado e permitiu inferir que os resultados não apresentam diferenças significativas entre si, demonstrando boa exatidão dos métodos propostos para a extração.

Pode ser observado na Tabela 4, que na maioria das frações obtidas após a extração sequencial, o Fe apresentou a maior concentração quando comparado ao Cu e Zn.

Na fração lipídica, todos os elementos estudados foram encontrados em baixas concentrações. A 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.<sup>22</sup> Os grupos sulfonato e fosfato são polares, logo possuem cargas negativas que são capazes de interagir com cátions,<sup>15</sup> como Cu, Fe e Zn, elementos de interesse nesse estudo.

De modo geral, cobre, ferro e zinco foram encontrados em todas as frações proteicas estudadas. Níveis altos de Zn (14,9 mg kg<sup>-1</sup>) foram encontrados na fração extraída com a água. Por outro lado, baixos níveis de Zn (0,8 mg kg<sup>-1</sup>) estavam associados à glutelina-2, proteína extraída com NaOH. O maior teor de cobre (3,4 mg kg<sup>-1</sup>)

foi encontrado na fração das albuminas nesse estudo.

Os íons metálicos como Fe<sup>3+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup> e Ca<sup>2+</sup> geralmente têm capacidade de interagir com proteínas por apresentarem caráter ácido intermediário.<sup>23</sup>

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<sup>-1</sup>) associado às glutelinas-2 quando comparado ao cobre (0,3 mg kg<sup>-1</sup>) e zinco (0,8 mg kg<sup>-1</sup>).

O resíduo final resultante da extração sequencial apresentou um elevado teor de Fe (10,7 mg kg<sup>-1</sup>) quando comparado às frações proteicas estudadas e aos lipídeos. Isso pode ser devido ao Fe estar ligado a uma proteína diferente das 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. Trindade<sup>15</sup> encontrou em frutas, altas concentrações de Cu, Fe e Zn no resíduo final após o procedimento de extração sequencial de proteínas.

Comparando-se a distribuição do Zn 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.*<sup>3</sup> utilizaram as soluções extratoras água, NaCl, etanol e NaOH e encontraram maior concentração dos metais nos extratos associados às proteínas do tipo globulina (extração com NaCl).

Xavier *et al.*<sup>14</sup> 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

As recuperações obtidas pelo método de adição e recuperação para a avaliação das medidas por ICP-OES foram de 100, 103 e 105% (Cu), 101, 102 e 103% (Fe) e de 98, 100 e 101% (Zn). Para todos analitos, as recuperações estiveram de acordo com a faixa de recuperação aceitável de 80-120%,<sup>24</sup> indicando uma boa exatidão do procedimento analítico.

As recuperações encontradas na avaliação da eficiência do procedimento de preparo das amostras foram de 92, 100 e 108% (Cu), 88, 101 e 110% (Fe) e 94, 98 e 101% (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  $y = 0,0011x + 0,0919$ . A curva de calibração obtida apresentou o coeficiente de correlação (R) igual a 0,9973. Os teores de proteínas obtidos estão apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Concentração total de proteínas nas frações proteicas de camapu e seus respectivos desvios padrão (n = 3)

Frações	Concentração (mg kg <sup>-1</sup> )
Água (albumina)	5,74 ± 0,10
NaCl (globulina)	0,28 ± 0,01
Ácido acético (glutelina-1)	4,46 ± 0,20
NaOH (glutelina-2)	0,46 ± 0,02

Fonte: Autor.

Baseado em estudos prévios da literatura, a utilização da água a 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.<sup>12,13,15</sup>

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

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.<sup>3</sup>

## CONCLUSÕES

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

## REFERÊNCIAS

1. Shanley, P.; Medina, G. *Em Fruit Trees and Useful Plants in Amazonian Life*; Shanley, P.; Cymerys, M.; Serra, M.; Medina, G., eds.; FAO: Italy, 2011. [Link] acessado em Janeiro 2024
2. Silva, L. E. S.; Claro, R. M.; *Cadernos de Saúde Pública* **2019**, *35*, 1. [Crossref]
3. Bittencourt, M. L.; Diogo, A. P. D.; Augusti, L. R.; Costa, L. M.; *Quim. Nova* **2012**, *35*, 1922. [Crossref]
4. Dias, F. G. B.; Ferreira, M. J. G.; Silva, L. M. R.; Menezes, R. C. S.; Figueiredo, E. A. T.; *Rev. Cienc. Agron.* **2020**, *51*, 3. [Crossref]
5. Rodrigues, E.; Rockenbach, I. I.; Cataneo, C.; Gonzaga, L. V.; Chaves, S. E.; Fett, R.; *Cienc. Tecnol. Aliment. (Campinas, Braz.)* **2009**, *29*, 642. [Crossref]
6. Novoa, R. H.; Bojacá, M.; Galvis, J. A.; Fischer, G.; *Agronomía Colombiana* **2006**, *24*, 77. [Link] acessado em Janeiro 2024
7. Hambidge, K. M.; *The Journal of Nutrition* **2003**, *133*, 948S. [Crossref]
8. Dolan, F. P.; Capar, E. G.; *J. Food Compos. Anal.* **2002**, *15*, 593. [Crossref]
9. Tognon, A. L.; *Quantificação e Avaliação da Bioacessibilidade In Vitro de Micro e Macro Elementos em Frutas, Hortaliças e Cereais*; Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil, 2012. [Link] acessado em Janeiro 2024
10. Cantarow, A.; Schepartz, B.; *Biochemistry*, 4<sup>th</sup> ed.; Atheneu: Rio de Janeiro, 1969.
11. Gao, Y.; Chen, C.; Zhang, P.; Chai, Z.; Wei, H.; Huang, Y.; *Anal. Chim. Acta* **2003**, *485*, 131. [Crossref]
12. Kwon, K.; Park, K. H.; Rhee, K. C.; *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 1741. [Crossref]
13. Naozuka, J.; Oliveira, P. V.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2007**, *18*, 1547. [Crossref]
14. Xavier, A. D. S.; Furtado, D. Z. S.; Assunção, N. A.; Nascimento, A. N.; *J. Food Compos. Anal.* **2019**, *83*, 103259. [Crossref]
15. Trindade, S. L.; *Determinação e Distribuição de Elementos-Traço em Frutas Regionais*; Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Pará, Belém, Brasil, 2010. [Link] acessado em Janeiro 2024
16. Alves, B. F.; Pereira Junior, J. B.; Carvalho, F. I. M.; Dantas Filho, H. A.; Dantas, K. G. F.; *Biol. Trace Elem. Res.* **2019**, *189*, 259. [Crossref]
17. Bradford, M. M.; *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248. [Crossref]
18. *IBM SPSS Statistics for Windows*, versão 20.0; IBM Corp.; Armonk, NY, 2011.
19. Hou, X.; Bradley, T. J. Em *Encyclopedia of Analytical Chemistry*; Meyers, R. A., ed.; John Wiley & Sons: Chichester, 2000, p. 9468. [Link] acessado em Janeiro 2024
20. Bressy, F. C.; *Determinação de Micronutrientes e Contaminantes em Amostras de Tomates por Técnicas Espectroanalíticas*; Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil, 2011. [Link] acessado em Janeiro 2024
21. Scorsatto, M.; Pimentel, A. C.; Silva, A. J. R.; Sabally, K.; Rosa, G.; Oliveira, G. M. M.; *International Journal of Cardiovascular Sciences* **2017**, *30*, 235. [Crossref]
22. Szpunar, J.; *Analyst* **2005**, *130*, 442. [Crossref]
23. Andersson, L.; Porath, J.; *Anal. Biochem.* **1986**, *154*, 250. [Crossref]
24. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) No. 166, de 24 de julho de 2017, *Dispõe sobre a Validação de Métodos Analíticos e dá outras Providências*, 2017. [Link] acessado em Janeiro 2024