

## DETERMINAÇÃO DE Cu, Fe, Mn, Zn E DO TEOR DE PROTEÍNA TOTAL EM AMOSTRAS DE TRIGO E SOJA APÓS PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO SEQUENCIAL

Leila M. Bittencourt, Diogo A. P. D. Lana, Rodinei Augusti e Letícia M. Costa\*

Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, 31270-090 Belo Horizonte - MG, Brasil

Adriano M. C. Pimenta, Agenor V. dos Santos e Ana Paula F. Gonçalves

Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, 31270-090 Belo Horizonte - MG, Brasil

Recebido em 10/1/12; aceito em 20/6/12; publicado na web em 17/9/12

DETERMINATION OF Cu, Fe, Mn, Zn AND TOTAL PROTEIN CONTENT IN WHEAT AND SOYBEAN SAMPLES AFTER SEQUENTIAL EXTRACTION PROCEDURE. A sequential extraction procedure was applied to wheat and soybean seed samples. The total protein content (determined by two distinct methods: Bradford and bicinchoninic acid-BCA) and distribution of Cu, Fe, Mn and Zn in each fraction was determined. The sequential extraction employed four different solutions: water, 0.5 mol L<sup>-1</sup> NaCl, ethanol/water (70:30 v v<sup>-1</sup>) and 0.5 mol L<sup>-1</sup> NaOH. For both samples, the highest concentration of metals was observed in those extracts associated with globulin-type proteins using NaCl solution. Regarding protein content, higher levels were obtained using the BCA method.

Keywords: sequential extraction; protein; metals.

### INTRODUÇÃO

O trigo (*Triticum aestivum* L.) é uma importante fonte de energia e um alimento rico em proteínas, o que tem despertado o interesse em relacionar a quantidade, composição ou estrutura proteica à qualidade nutricional do cereal e outras características funcionais.<sup>1</sup> O trigo contém em sua composição 60-70% de carboidratos, 12% de proteína (glúten), 1,9% de lipídios, ácido ascórbico, vitamina E, sendo rico em nutrientes essenciais como ferro e zinco.<sup>2,3</sup>

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill), uma planta pertencente à família das Leguminosae, apresenta grande importância econômica para o Brasil. Tem sido relacionada a vários efeitos benéficos para a saúde humana, incluindo a redução do risco de doenças cardiovasculares, câncer e derrames.<sup>4</sup> Em média, a soja possui 40% de proteínas, 20% de lipídios, 34% de carboidratos e 5% de minerais, sendo fonte de Ca, Cu, Fe, K, Mg, P e Zn.<sup>5</sup>

A maioria dos metais presentes em alimentos está ligada a proteínas ou enzimas que são responsáveis por funções específicas do metabolismo corporal.<sup>6-8</sup> Tais metais são cruciais para os organismos vivos, pois participam de atividades essenciais, tais como regulação da expressão genética, processos enzimáticos e catalíticos, transporte e armazenamento, dentre outras.<sup>6</sup> O conhecimento sobre o modo como um metal está ligado às biomoléculas (proteínas e peptídeos ou ácidos nucleicos), sua forma química (metalômica) e a interação metal-biomolécula (metaloproteômica) tem sido mandatório para melhor se compreender os processos biológicos.<sup>9,10</sup> De fato, acredita-se que as metaloproteínas compreendam um terço de todas as proteínas presentes no organismo humano.<sup>11</sup>

Uma das etapas fundamentais nos estudos sobre metaloproteínas (ou mesmo proteínas associadas a metais via ligações não covalentes)<sup>9</sup> envolve a quantificação do teor total de proteínas nas amostras. O desenvolvimento de metodologias para a quantificação de proteínas totais é de grande interesse, tanto para os profissionais ligados à indústria de alimentos,<sup>12</sup> quanto para laboratórios de análises clínicas

e pesquisadores de outras áreas.<sup>13</sup>

Todos os métodos de dosagem de proteína baseiam-se na formação de compostos coloridos, devido à reação de certos grupos ou radicais com reagentes químicos específicos. O método Bradford<sup>14</sup> baseia-se na interação do corante G-250 com proteínas que contenham aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas<sup>15,16</sup> (o complexo colorido resultante absorve fortemente em  $\lambda = 595$  nm). Apesar de ser um método rápido, sensível e estar sujeito a um número menor de interferentes quando comparado a outros métodos, apresenta algumas desvantagens, tais como, variação da absorvidade específica para diferentes proteínas, falta de linearidade na lei de Lambert-Beer e resultados não confiáveis para as amostras que possuem proteínas de baixo peso molecular.<sup>16</sup> O método do ácido bicinonínico (BCA) tem sido recomendado em estudos de comparação de metodologias e se baseia na reação de redução Cu (II) → Cu (I), em meio alcalino, promovida pelas proteínas. O Cu (I), por sua vez, forma um complexo com o BCA, o qual absorve fortemente na região de  $\lambda = 562$  nm. Este método é considerado mais simples no preparo dos reagentes e tão sensível quanto o método de Lowry.<sup>16</sup> Apresenta como desvantagens a dependência da temperatura na incubação das amostras, a variação da absorvidade específica para diferentes proteínas e a variação da absorbância com o tempo.<sup>17</sup>

Este trabalho teve como objetivo estudar a distribuição de Cu, Fe, Mn e Zn nas frações oriundas de uma extração sequencial aplicada a amostras de trigo e soja utilizando-se como extratores água, solução aquosa de cloreto de sódio, solução de etanol/água e solução aquosa de hidróxido de sódio. Adicionalmente, foi realizado um estudo comparativo dos métodos Bradford e BCA para a dosagem de proteína total nos diferentes extratos.

### PARTE EXPERIMENTAL

#### Amostras

Amostras de grãos de trigo e soja de uma única marca foram adquiridas no comércio de Belo Horizonte (MG, Brasil). As amostras

\*e-mail: leticia@ui.ufmg.br

**Tabela 1.** Programa de aquecimento para determinação de Cu, Fe, Mn e Zn

Etapas	Temperatura (°C)	Rampa (s)	Patamar (s)	Razão do fluxo (mL min <sup>-1</sup> )
Secagem	100	5	20	250
Secagem	140	15	15	250
Pirólise	1000 <sup>a</sup> /1400 <sup>b</sup> /1200 <sup>c</sup> /700 <sup>d</sup>	10 <sup>a-c</sup> /20 <sup>b-d</sup>	20	250
Atomização	2500 <sup>a</sup> /2300 <sup>b</sup> /2000 <sup>c</sup> / 1800 <sup>d</sup>	0	5	0
Limpeza	2600	1	5	250
Resfriamento	20	1	10	250

<sup>a</sup>Cu; <sup>b</sup>Fe; <sup>c</sup>Mn; <sup>d</sup>Zn.

foram moídas em liquidificador e passadas por uma peneira plástica (1 mm). À amostra de soja foi adicionada água deionizada para facilitar a moagem. Depois de moída, esta amostra foi seca em estufa a 35 °C. As amostras foram armazenadas em frascos plásticos estéreis, os quais foram mantidos fechados até o momento das extrações.

### Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas com reagentes químicos de grau analítico e água de alta pureza obtida em sistema Milli-Q (18,2 mW cm<sup>-1</sup>, Millipore, Bedford, MA, EUA).

As soluções de referência foram preparadas por diluições apropriadas das soluções estoque contendo 1000 mg L<sup>-1</sup> de cada elemento. Clorofórmio, metanol, etanol, NaCl, NaOH, HNO<sub>3</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (v/v) foram utilizados no preparo das soluções (Merck, Darmstadt, Germany). Para a quantificação do conteúdo de proteína total pelo método de Bradford e BCA foram utilizados kits comerciais, empregando-se BSA (albumina de soro bovino) para a construção da curva analítica (BioAgency, Amburg, Germany).

Todas as vidrarias foram descontaminadas após imersão em solução de HNO<sub>3</sub> 10% (v/v) durante a noite, seguido de lavagem em água bidestilada.

### Instrumentação

Para a determinação de Fe, Cu, Zn, Mn foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica Perkin Elmer, modelo AAnalyst400, equipado com forno de grafite e com correção de fundo por lâmpada de deutério (Norwalk, CT, EUA), empregando-se lâmpadas de cátodo oco (Perkin-Elmer) para Fe ( $\lambda = 248,33$  nm, fenda (entrada/saída) = 1,8/1,35 nm), Cu ( $\lambda = 324,75$  nm, fenda = 2,7/0,8 nm), Mn ( $\lambda = 279,48$  nm, fenda = 1,8/0,6 nm) e Zn ( $\lambda = 213,86$  nm, fenda = 2,7/1,8 nm).

Todas as medidas foram baseadas em valores de absorbância integrada (área do pico). O volume das amostras e padrões injetados no tubo de grafite pelo pipetador automático foi de 20  $\mu$ L. Foi empregado argônio de alta pureza (99,996% da White Martins, Belo Horizonte, MG, Brasil). Tubos de grafite pirolítico com plataforma de L'Vov inserida foram usados em todas as análises. Para Fe e Mn utilizou-se nióbio como modificador permanente, enquanto que para Cu e Zn se trabalhou sem o uso de modificadores. Os programas de aquecimento para determinação de Cu, Fe, Mn e Zn são apresentados na Tabela 1.

A digestão ácida das amostras de trigo e soja foi realizada em um forno de micro-ondas com cavidade, em frascos reacionais de perfluoroalcoxi (PFA) com sensores de temperatura e pressão acoplados (Ethos, Milestone, Sorisole, Itália). O programa de aquecimento utilizado encontra-se descrito na Tabela 2.

Um espectrofotômetro Ultrospec 2100 pro (Biochrom LTD, Cambridge, UK), equipado com lâmpada de xenônio e de comprimentos de onda na faixa entre 190-900 nm, foi utilizado para a quantificação de proteínas.

**Tabela 2.** Programa de aquecimento do forno micro-ondas com cavidade

Etapas	Potência (W)	t rampa (min)	T (°C)	T patamar (min)
1	750	10	180	-
2	750	-	180	20
Ventilação	0	0	30	-

### Procedimento de extração sequencial baseado na solubilidade proteica

Cerca de 5,0 g das amostras de trigo e soja, previamente trituradas, foram utilizadas para a extração sequencial sólido-líquido. Inicialmente, adicionaram-se 10 mL de uma mistura contendo metanol e clorofórmio (1:2 v/v) para a extração da fração lipídica. A amostra foi submetida à agitação mecânica por 15 min, centrifugada por 10 min a 1800 rpm e a fração lipídica descartada. Em seguida, a amostra foi submetida ao procedimento de extração em quatro etapas sucessivas empregando água deionizada, solução aquosa de NaCl 0,5 mol L<sup>-1</sup>, etanol/água 70:30 (v/v) e solução aquosa de NaOH 0,5 mol L<sup>-1</sup>. Em cada etapa foram adicionados 10 mL do reagente extrator e a mistura foi mantida sob agitação mecânica por 30 min. Após este período, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 1800 rpm e os sobrenadantes recuperados de cada fração foram aferidos para 15,0 mL e armazenados em freezer até o momento da análise. O procedimento de extração empregado foi adaptado da literatura.<sup>6</sup>

### Determinação da concentração total dos metais

Amostras de trigo e soja *in natura*, assim como o resíduo obtido após o procedimento de extração sequencial foram submetidas à digestão ácida assistida por radiação micro-ondas. Cerca de 200 mg das amostras *in natura* e residual foram pesadas, diretamente no frasco reacional e mantidas em contato com 6,0 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado por 30 min. Posteriormente, adicionou-se 1,0 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e as amostras foram digeridas (Tabela 2). Os digeridos foram diluídos para um volume final de 20,0 mL e analisados por GF AAS.

### Quantificação do teor de proteína total

No estudo comparativo entre os métodos Bradford e BCA foi realizada a quantificação de proteína total nas frações de trigo e soja obtidas após cada etapa da extração sequencial. Para tanto, as diferentes frações foram diluídas 10 vezes para garantir que o teor de proteína total estivesse dentro da faixa linear da curva analítica (curva padrão da proteína albumina) e as frações se mantivessem límpidas.

Para o método BCA, adicionaram-se 200  $\mu$ L de uma mistura composta pelos reagentes A (carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, ácido bicinconínico e tartarato de sódio em hidróxido de sódio

**Tabela 3.** Concentrações de Cu, Fe, Mn e Zn, em  $\mu\text{g g}^{-1}$ , nas amostras *in natura* e nos resíduos das amostras obtidos após o procedimento de extração sequencial e digestão em forno micro-ondas com cavidade

		Cu	Fe	Mn	Zn
Amostra <i>in natura</i>	Trigo	4,3 ± 0,6	33 ± 3	31 ± 2	28,5 ± 0,6
	Soja	10,6 ± 0,1	79 ± 4	38,1 ± 0,8	39,8 ± 0,1
Resíduo das amostras	Trigo	3,95 ± 0,05	28 ± 2	19 ± 1	27 ± 1
	Soja	8,3 ± 0,7	83 ± 4	43,2 ± 0,9	31 ± 1

0,1 mol L<sup>-1</sup>) e B (solução aquosa de sulfato de cobre 4% m/v) a 25  $\mu\text{L}$  de cada fração proteica. Para o método Bradford, foram adicionados 40  $\mu\text{L}$  do reagente concentrado (etanol, ácido fosfórico e corante azul brilhante de coomassie G250) a 160  $\mu\text{L}$  de cada fração.

A placa de Elisa contendo as amostras e os padrões de albumina foi agitada lentamente por 30 s e incubada por 30 min à temperatura ambiente e a 37 °C para os métodos Bradford e BCA, respectivamente. Posteriormente, as amostras foram analisadas no espectrofotômetro e cada reação teve sua absorbância determinada nos comprimentos de onda de 595 e 562 nm para os métodos Bradford e BCA, respectivamente. Todas as amostras e padrões foram preparados em triplicata.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Determinação da concentração total dos metais

Para as análises de Fe e Mn por GF AAS foi utilizado o nióbio como modificador permanente. Alguns modificadores foram avaliados e o nióbio foi escolhido por promover uma melhor correção do sinal de fundo, gerando maior intensidade da razão entre o sinal de absorbância e o sinal de fundo, além de produzir melhor repetibilidade dos resultados.

As concentrações totais de Cu, Fe, Mn e Zn foram determinadas nos digeridos das amostras de trigo e soja *in natura* e nos resíduos obtidos após aplicação do procedimento de extração sequencial. Os limites de detecção para Cu, Fe, Mn e Zn foram de 0,25; 0,99; 0,87 e 0,99  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente, calculados a partir dos parâmetros da curva analítica pela análise de 10 replicatas independentes do branco analítico.<sup>18,19</sup>

Os resultados da Tabela 3 mostram que as amostras de trigo e soja são ricas em ferro e possuem menor teor de cobre, resultados consistentes com dados fornecidos pela Tabela Brasileira de Composição de Alimentos.<sup>20</sup>

De acordo com os dados da Tabela 3, verifica-se que a concentração dos metais nas amostras de trigo e soja *in natura* apresentaram valores próximos àqueles obtidos na fração residual. Vale ressaltar que se trata de um procedimento de extração sequencial que emprega soluções diluídas ou mesmo água.

Comparando-se os resultados apresentados na Tabela 3, observa-se que as concentrações de Fe e Mn na fração residual da amostra de soja foram maiores, em comparação às concentrações destes elementos na amostra *in natura*. Uma possível explicação pode estar relacionada ao procedimento de extração, no qual há manipulação exaustiva das amostras com diferentes reagentes, ocasionando possíveis contaminações.

### Determinação de Cu, Fe, Mn e Zn em cada fração

As concentrações de Cu, Fe, Mn e Zn foram determinadas nas diferentes frações das amostras de trigo e soja, após extração sequencial. Os resultados são apresentados nas Tabelas 4 e 5.

Neste trabalho, as amostras de trigo e soja foram inicialmente moídas e peneiradas no intuito de se obter um menor tamanho das

**Tabela 4.** Concentrações de Cu, Fe, Mn e Zn, em  $\mu\text{g g}^{-1}$ , nas frações da amostra de trigo submetida à extração sequencial (média ± desvio padrão, n = 3)

	Cu	Fe	Mn	Zn
Água	0,20 ± 0,02	0,53 ± 0,02	3,50 ± 0,09	0,32 ± 0,03
NaCl	0,55 ± 0,06	1,90 ± 0,01	2,4 ± 0,2	0,42 ± 0,05
Etanol	0,11 ± 0,01	0,36 ± 0,01	0,080 ± 0,001	0,11 ± 0,01
NaOH	0,13 ± 0,01	0,64 ± 0,04	0,70 ± 0,02	< LQ

**Tabela 5.** Concentrações de Cu, Fe, Mn e Zn, em  $\mu\text{g g}^{-1}$ , nas frações da amostra de soja submetida à extração sequencial (média ± desvio padrão, n = 3)

	Cu	Fe	Mn	Zn
Água	0,87 ± 0,01	0,82 ± 0,01	0,39 ± 0,01	1,8 ± 0,2
NaCl	0,95 ± 0,05	1,7 ± 0,1	0,46 ± 0,08	2,5 ± 0,2
Etanol	0,96 ± 0,07	< LD	0,30 ± 0,09	2,90 ± 0,04
NaOH	0,64 ± 0,02	< LD	1,0 ± 0,1	1,2 ± 0,2

partículas e, conseqüentemente, uma maior eficiência na extração dos elementos inorgânicos e da fração proteica.

O somatório das concentrações de Cu, Fe, Mn e Zn em todas as frações (Tabelas 4 e 5), incluindo a fração residual (Tabela 3), foi comparado ao valor da concentração dos elementos nas amostras *in natura* (Tabela 3). As porcentagens de recuperação para Cu, Fe, Mn e Zn foram de 114, 97, 83 e 98% para trigo e de 110, 108, 119 e 99% para soja.

De forma geral, para a amostra de trigo, o manganês foi o elemento que apresentou maior concentração nas frações obtidas após extração sequencial, seguido do ferro. A maior facilidade de extração do Mn em relação ao Fe tem sido relatada na literatura para diferentes tipos de amostras.<sup>21,22</sup>

Para a amostra de soja, verificaram-se elevadas concentrações de Fe e Mn na amostra *in natura*, porém baixa concentração desses elementos nas frações, indicando forte interação com os constituintes desta matriz orgânica. O Zn foi o elemento mais disponível em todas as frações do procedimento sequencial.

Procedimentos de extração sequencial são morosos, porém podem fornecer informações relacionadas à mobilidade, transporte e disponibilidade dos elementos químicos nas matrizes.<sup>23</sup>

### Associação de Cu, Fe, Mn e Zn às proteínas em cada fração

Segundo Naozuka e Oliveira<sup>6</sup> e Agboola *et al.*,<sup>24</sup> as proteínas podem ser classificadas de acordo com sua solubilidade. Esses autores relatam que os extratores utilizados neste trabalho, isto é, água, solução aquosa de NaCl, água/etanol e solução aquosa de NaOH extraem, preferencialmente, as proteínas do grupo das albuminas, globulinas, prolaminas e glutelinas, respectivamente.

Deste modo, os resultados da Tabela 4 mostram que Cu, Fe, Mn e Zn apresentam maiores concentrações na fração proveniente da extração com a solução aquosa de NaCl, indicando que estes elementos

podem estar associados às proteínas do grupo das globulinas para a amostra de trigo. O manganês apresentou elevada concentração na fração extraída com água, a qual é responsável pela extração preferencial das albuminas. De maneira geral, os elementos avaliados estão menos associados às proteínas do grupo das prolaminas, as quais são preferencialmente extraídas com etanol.

Para a amostra de soja (Tabela 5) é possível concluir que os elementos Cu, Fe e Zn podem interagir, preferencialmente, com as proteínas da classe das globulinas. Já o Mn, apresentou maiores teores na fração extraída com solução de NaOH, responsável pela extração das glutelinas.

É importante destacar que as proteínas albumina, globulina, prolamina e glutelina possuem aminoácidos ricos em enxofre e grupos com cargas, tais como cisteína,<sup>25</sup> arginina, ácido glutâmico, dentre outros, fato que favorece a alta afinidade dos íons metálicos a estes aminoácidos.

#### Quantificação do conteúdo total de proteína em cada fração: comparação dos métodos Bradford e BCA

Diferentes métodos têm sido empregados para a quantificação de proteína total em amostras de origem animal ou vegetal. No entanto, poucos são os trabalhos que compararam os resultados de tais métodos. Diversos fatores devem ser analisados antes da escolha de uma metodologia para a quantificação de proteínas totais, porém o conhecimento da natureza dos constituintes da amostra e de suas concentrações aproximadas é essencial. Isto facilita a identificação dos possíveis interferentes e, conseqüentemente, favorece a escolha de um método mais apropriado para cada situação. Outros fatores importantes são a sensibilidade, que é dependente da concentração de proteína na amostra e do volume de amostra disponível, a rapidez, o custo da metodologia e, não menos importante, o grau de confiabilidade nos resultados obtidos devido aos interferentes do método escolhido.

Os métodos avaliados empregam reagentes químicos que reagem especificamente com proteínas para formar produtos de coloração, que são medidos espectrofotometricamente.<sup>17,26</sup> Neste trabalho, a concentração de proteína total foi determinada pelos métodos de Bradford e BCA nas diferentes frações das amostras de trigo e soja obtidas após procedimento de extração sequencial. Os resultados são apresentados nas Tabelas 6 e 7.

**Tabela 6.** Teor de proteína total, em mg g<sup>-1</sup>, nas frações da amostra de trigo quantificada pelos métodos Bradford e BCA (média ± desvio padrão, n = 3)

Bradford		BCA	
Fração	Concentração (mg g <sup>-1</sup> )	Fração	Concentração (mg g <sup>-1</sup> )
H <sub>2</sub> O	3,8 ± 0,1	H <sub>2</sub> O	5,2 ± 0,5
NaCl	3,8 ± 0,5	NaCl	1,6 ± 0,1
EtOH	3,2 ± 0,5	EtOH	1,20 ± 0,01
NaOH	8,2 ± 0,5	NaOH	8,2 ± 1,0

A albumina (BSA) foi utilizada como padrão para construção das curvas analíticas. Os parâmetros das curvas para os métodos de Bradford e BCA foram, respectivamente:  $y = 0,013x + 0,1732$  ( $R = 0,97$ ) e  $y = 0,0354x + 0,1705$  ( $R = 0,99$ ). De acordo com estes resultados, o valor do coeficiente angular (inclinação da curva) para a curva analítica construída para quantificação das amostras pelo método Bradford (0,013) foi menor quando comparado ao da curva BCA (0,0354), indicando uma menor sensibilidade do método Bradford. Os valores dos coeficientes de correlação linear (R) foram comparáveis,

**Tabela 7.** Teor de proteína total, em mg g<sup>-1</sup>, nas frações da amostra de soja quantificada pelos métodos Bradford e BCA (média ± desvio padrão, n = 3)

Bradford		BCA	
Fração	Concentração (mg g <sup>-1</sup> )	Fração	Concentração (mg g <sup>-1</sup> )
H <sub>2</sub> O	8,2 ± 0,3	H <sub>2</sub> O	40 ± 2
NaCl	7,0 ± 0,4	NaCl	22 ± 2
EtOH	3,7 ± 0,2	EtOH	6,4 ± 0,1
NaOH	11 ± 1	NaOH	34 ± 1

indicando boa linearidade das curvas para os dois métodos.<sup>19</sup>

Os dados apresentados nas Tabelas 6 e 7 mostram que os teores de proteína total obtidos pelos dois métodos, nas frações provenientes da amostra de soja, são superiores àqueles da amostra de trigo, o que confirma que a soja é uma matriz com um elevado conteúdo proteico.<sup>20</sup>

De maneira geral, os resultados mostram que as maiores e menores concentrações de proteína foram obtidas nas frações extraídas com solução de NaOH e etanol/água, respectivamente, tanto para as amostras de trigo quanto de soja. Naozuka e Oliveira também observaram esta tendência ao quantificar proteínas totais em amostras de castanha do Brasil, semente de cupuaçu e polpa de coco. Os autores concluíram que a solução de NaOH não é seletiva, podendo extrair proteínas de várias classes.

Holding e Larkins afirmam que as prolaminas representam aproximadamente 70% das proteínas encontradas em milho e trigo.<sup>27</sup> Elevados teores de proteínas pertencentes ao grupo das glutelinas foram observados em amostras de trigo.<sup>28</sup> Para a amostra de trigo avaliada neste trabalho, maior concentração de proteína total foi determinada na fração extraída com solução de NaOH, associada preferencialmente à extração das proteínas do grupo das glutelinas (Tabela 6).

De acordo com Nagano e Tokita, as globulinas são as principais proteínas de armazenamento presentes na soja.<sup>29</sup> Pelos resultados apresentados na Tabela 7, observa-se que foi determinado elevado teor de proteína total na fração extraída com solução de NaCl, a qual extrai preferencialmente as globulinas.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que foram encontradas menores concentrações dos metais nas frações com um elevado teor proteico (comparando-se as Tabelas 4 com 6 e 5 com 7). Este fato também foi observado por Magalhães e Arruda, ao estudarem 11 procedimentos diferentes de extração de proteínas e metaloproteínas em castanha-da-Índia.<sup>30</sup>

Para as frações da amostra de soja (Tabela 7) verificou-se que os valores de concentração de proteína total obtidos pelo método Bradford foram menores que os encontrados pelo método BCA. Este fato também foi observado por Miwa<sup>17</sup> ao comparar diferentes métodos colorimétricos para a quantificação de proteínas em lagoas de estabilização e por Crossman e colaboradores,<sup>26</sup> ao avaliarem diferentes métodos de quantificação de proteína em amostras de algas marinhas.

A menor concentração de proteína total determinada pelo método Bradford pode ser explicada levando-se em consideração que peptídeos contendo menos de oito ligações peptídicas não se ligam ao corante G250 e, portanto, não são quantificados. Outra explicação para a subestimação utilizando o método Bradford é a baixa solubilização das proteínas particuladas. Já o método BCA, além de apresentar um reagente específico para proteínas, é capaz de quantificar peptídeos com no mínimo três aminoácidos, ou seja, duas ligações peptídicas.<sup>17</sup>

Vale a pena destacar que o método Bradford apresentou uma curva analítica linear em uma faixa estreita (não mostrada). Este

fato é crítico, pois trabalhos fora dessa estreita faixa de concentração podem levar a erros na quantificação das proteínas. Esta estreita faixa pode ser devida às variações no valor do pH quando se adiciona o corante G250 às amostras.<sup>17</sup>

É importante enfatizar que a quantificação de proteína total pode ser afetada pela metodologia empregada e pela composição da amostra e, portanto, um determinado método deve ser empregado levando-se em consideração sua sensibilidade, a natureza dos constituintes da amostra e o grau de confiabilidade nos resultados obtidos, devido aos interferentes da amostra e do método escolhido.

## CONCLUSÃO

A extração sequencial sólido-líquido utilizada foi um método eficaz na obtenção de frações contendo, possivelmente, diferentes classes de proteínas e diferentes metais (Cu, Fe, Mn e Zn) associados a elas. O estudo comparativo entre os métodos de quantificação de proteína total por Bradford e BCA indicou maiores teores de proteína nas determinações realizadas por este último. Os resultados apresentados mostram que o método BCA é o mais indicado para quantificação de proteína total nas frações das amostras de trigo e soja. Finalmente, a avaliação de metodologias de quantificação de proteína total é desejável para trabalhos envolvendo matrizes alimentícias.

## AGRADECIMENTOS

L. M. Bittencourt agradece ao Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa (CNPq) pela bolsa concedida. L. M. Costa agradece ao CNPq o financiamento concedido (projetos nº478076/2009-6 e nº308795/2009-1).

## REFERÊNCIAS

1. Bean, S. R.; Lookhart, G. L.; *J. Chromatogr., A* **2000**, *881*, 23.
2. Stomph, T. J.; Jiang, W.; Struik, P. C.; *Trends Plant Sci.* **2009**, *14*, 123.
3. Singh, B.; Datta, P. S.; *Radiat. Phys. Chem.* **2010**, *79*, 819.
4. Rah, J. H.; Hasler, C. M.; Painter, J. E.; Novakofski, K. M. C.; *J. Nutr. Educ. Behav.* **2004**, *36*, 238.
5. Yamada, L. T. P.; Barcelos, M. F. P.; Sousa, R. V.; Lima, A. L.; *Ciênc. Agrotec.* **2004**, *27*, 406.
6. Naozuka, J.; de Oliveira, P. V.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2007**, *18*, 1547.
7. Naozuka, J.; Marana, S. R.; de Oliveira, P. V.; *J. Food Compos. Anal.* **2010**, *23*, 78.
8. Kannamkumarath, S. S.; Wuilloud, R. G.; Caruso, J. A.; *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 5773.
9. Garcia, J. S.; Magalhães, C. S.; Arruda, M. A. Z.; *Talanta* **2006**, *69*, 1.
10. Becker, J. S.; Mounicou, S.; Zoriy, M. V.; Becker, J. S.; Lobinski, R.; *Talanta* **2008**, *76*, 1183.
11. Becker, J. S.; Lobinski, R.; Becker, J. S.; *Metallomics* **2009**, *1*, 312.
12. Baddini, A. L. Q.; da Cunha, L. E. R.; de Oliveira, A. M. C.; Cassella, R. J.; *Anal. Biochem.* **2010**, *397*, 175.
13. Qin, W.; Dan, W.; Bin, D.; Zaijun, L.; Yanqiang, H.; *J. Food Compos. Anal.* **2006**, *19*, 76.
14. Bradford, M. M.; *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248.
15. Kamizake, N. K. K.; Gonçalves, M. M.; Zaia, C. T. B. V.; Zaia, D. A. M.; *J. Food Compos. Anal.* **2003**, *16*, 507.
16. Zaia, D. A. M.; Zaia, C. T. B. V.; Lichtig, J.; *Quim. Nova* **1998**, *21*, 787.
17. Miwa, A. C. P.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2003.
18. Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 771.
19. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução 899, de 29/05/2003, *Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos*.
20. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação (NEPA) e Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP); *Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO)*, Versão 2, 2ª ed., Ed. da UNICAMP: Campinas, 2006.
21. Matos, W. O.; Menezes, E. A.; Gonzales, M. H.; Costa, L. M.; Trevizan, L. C.; Nogueira, A. R. A.; *Spectrochim. Acta, Part B* **2009**, *64*, 615.
22. Lesniewicz, A.; Jaworska, K.; Zyrnicki, W.; *Food Chem.* **2006**, *99*, 670.
23. Bacon, J. R.; Davidson, C. M.; *Analyst* **2008**, *133*, 25.
24. Agboola, S.; Ng, D.; Mills, D.; *J. Cereal Sci.* **2005**, *41*, 283.
25. Kuppannan, K.; Albers, D. R.; Schafer, B. W.; Dielman, D.; Young, S. A.; *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 516.
26. Crossman, D. J.; Clements, K. D.; Cooper, G. J. S.; *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **2000**, *244*, 45.
27. Holding, D. R.; Larkins, B. A.; *Adv. Plant Biochem. Molecular Biol.* **2008**, *1*, 107.
28. Skylas, D. J.; Dyk, D. V.; Wrigley, C. W.; *J. Cereal Sci.* **2005**, *41*, 165.
29. Nagano, T.; Tokita, M.; *Food Hydrocolloid* **2011**, *25*, 1647.
30. Magalhães, C. S.; Arruda, M. A. Z.; *Talanta* **2007**, *71*, 1958.