

Dosagem do triptofano em alimentos.

GERSON FERREIRA PINTO

Instituto de Nutrição da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

RESUMO

O presente artigo versa sobre a dosagem do triptofano em cereais e leguminosas usando hidrólise com papaina e procedimento colorimétrico com paradimetilaminobenzaldeído. A recuperação conseguida foi superior a 90%.

INTRODUÇÃO

O problema de dosagem do triptofano em produtos alimentares, principalmente em cereais e leguminosas, não tem encontrado até agora uma solução satisfatória, que se preste à rotina, por método químico.

A hidrólise alcalina, muito divulgada para a liberação deste composto, embora possa ser aplicada com sucesso no caso de proteínas puras (1, 2), apresenta inconvenientes que limitam sua aplicação em alimentos (3).

O interesse desta dosagem em cereais, como no caso do Milho Opaco-2, em que o teor de triptofano pode servir de controle das experiências para sua melhoria, é bastante acentuado, principalmente porque este aminoácido essencial aparenta ser limitante (4) em comparação com a "proteína modelo da FAO" (5).

O procedimento ora publicado derivou de modificações progressivas das técnicas de Lombard & Lange (6) e de Spies & Chambers (7) visando superar dificuldades relacionadas

com o doseamento do triptofano em cereais e leguminosas, tais como reprodutividade e recuperação.

Material e Método

Os reagentes usados foram da Merck (pa.), com exceção dos fosfatos de sódio e do hidróxido de potássio que foram provenientes da Reagem (Brasil).

- a— H_2SO_4 21,4N
- b— NaH_2PO_4 0,05N
- c— Na_2HPO_4 0,05N
- d— Tampão fosfato 0,05N pH 7,5 (recentemente preparado)
- e— KOH 0,1N
- f— CCl_4
- g— Soluções padrão de triptofano:

Solução Do: Num becher de 200 ml colocar 130 mg de triptofano pesado exatamente. Adicionar aproximadamente 20 ml de NaH_2PO_4 0,05N. Adicionar 1 ml de ácido ortofosfórico xaroposo. Agitar até solubilização total. Levar a pH 7,5 com NaOH saturada. Transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 100 ml e avolumar com tampão pH 7,5. Esta solução não deve ser usada se estiver turva.

1 ml solução Do = 1,3 mg de triptofano

Solução Do': Transferir 10 ml da solução Do para um balão volumétrico de 100 ml e avolumar com tampão fosfato pH 7,5. O mesmo cuidado válido para a solução Do se aplica a esta solução.

1 ml solução Do' = 130 μ g de triptofano

- h— $NaNO_2$ 0,04% (recém preparada)
- i— Solução de PDAB: 30 mg de paradimetilaminobenzaldeído/9 ml H_2SO_4 21,4N
- j— Solução de papaína 2%. Homogeneizar e centrifugar a 3000 rpm por 15 minutos. Usar o sobrenadante. Experiências com papaína de outra procedência que não Merck não deram resultados satisfatórios.

Técnica da curva sêbre a mostra

Tôdas as amostras foram calculadas de forma a conter aproximadamente 0,02g de proteína (N. 6,25) e sofreram micropulverização prévia.

Em 6 ampôlas de 10 ml cada e codificadas com os símbolos M, PM1, PM2, PM4, PM6 e PM8, colocamos amostra pesada

exatamente. À ampôla PM8 adicionamos 0,5 ml da solução Do de triptofano, e às ampôlas PM1, PM2, PM4 e PM6 adicionamos respectivamente 0,5, 1,0, 2,0 e 3,0 ml de solução Do'. Em tôdas as ampôlas adicionamos 1 ml da solução de papaína a 2%, completamos o volume líquido adicionado a 5 ml e adicionamos 1 gôta de NaCN 5%. Simultâneamente preparamos outra série de ampôlas de mesma capacidade e codificads com os seguintes sômbolos: B, P, P1, P2, P4, P6, e P8. As ampôlas de P a P8 tiveram o mesmo tratamento das correspondentes de M a PM8 respectivamente, com apenas a diferença de não ter sido colocada amostra nas mesmas. À ampôla B adicionamos apenas 5 ml de tampão fosfato pH 7,5 e 1 gota de NaCN 5%.

Todas as ampôlas foram aquecidas em banho-maria a 70°C por 5 minutos e a seguir seladas com auxílio de maçarico. Agitamos levemente para forçar a mistura da amostra com o meio hidrolisante. Deixamos por 12 horas em estufa a 70°C. Após êste período resfriamos as ampôlas à temperatura ambiente e as abrimos. Transferimos seus conteúdos para tubos de centrifugação prèviamente marcados com a mesma simbologia das ampôlas correspondentes. Lavamos as ampôlas com solução de KOH 0,1N, sendo usados exatamente 5 ml para um total de 6 lavagens em cada ampôla. Os líquidos de lavagem foram recolhidos juntamente com o hidrolizado no tubo correspondente. Em cada tubo adicionamos 3 ml de tetracloreto de carbono. Agitamos a mistura enérgicamente por 3 minutos. Centrifugamos por 15 minutos a 3000 rpm. De cada tubo retiramos 1 ml de solução sobrenadante e o transferimos para tubos de ensaio, prèviamente marcados com a simbologia adotada, mantendo as respectivas correspondências. Em outro tubo de ensaio, que codificamos com o símbolo BM, colocamos 1 ml de solução sobrenadante do tubo de centrifugação simbolizado por M. A tôdos os tubos, com exceção dos tubos B e BM, adicionamos 9 ml de solução de PDAB. Aos tubos B e BM adicionamos 9 ml de H₂SO₄ 21,4N. Agitamos tôdos os tubos enérgicamente ao abrigo da luz e os deixamos no escuro por 90 minutos à temperatura ambiente. Findo êste período, adicionamos a cada tubo 0,1 ml de NaNO₂ 0,04%. Novamente agitamos os tubos enérgicamente ao abrigo da luz e os deixamos no escuro por 30 minutos à temperatura ambiente. Lemos as absorbâncias em colorímetro Lumetron a 580 m μ contra água.

Técnica sem curva sôbre a amostra

As amostras foram calculadas de forma a conter aproximadamente 0,02 g de proteína (Nx6,25) e sofreram micropulverização prévia.

Aqui também procedemos da forma anteriormente mencionada com relação aos tubos B, P, P1, P2, P4, P6 e P8. Os tubos M, BM e PM2 foram realizados conforme procedimento anterior, porém em duplicata para trabalharmos com o valor da absorbância média. A leitura das absorbâncias foi feita como anteriormente a 580 m μ contra água.

Resultados

A Fig. 1 foi realizada com os dados de uma experiência com milho opaco-2 segundo o procedimento da curva sôbre a amostra. A amostra continha 10,5% de proteína (Nx6,25), e a cada ampôla M, PM1, PM2, PM4, PM6 e PM8 foram adicionadas exatamente 0,2 gramas da amostra micropulverizada.

Os tubos da série simbolizada por P permitiram o traçado da "curva padrão" de triptofano e os tubos da série simbolizada por PM forneceram dados que permitiram o traçado da "curva sôbre a amostra". Os tubos B e BM são "Blanks".

Aparentemente a recuperação não é constante com relação ao triptofano adicionado. Entretanto, podemos determinar o ponto de recuperação máxima e/ou liberação(*) máxima de triptofano, que é aquele em que a "curva sôbre a amostra" se afasta mais da "curva padrão". Na experiência reportada, a recuperação foi máxima no ponto PM1. Por êste ponto, tiramos uma paralela à "curva padrão" e sua interseção com o eixo das absorbâncias corresponde ao teor de triptofano na amostra em um máximo de recuperação e/ou liberação.

O ponto de interseção da "curva sôbre a amostra" com o eixo das ordenadas para a experiência apresentada corresponde a uma absorbância de 0,186 considerando-se que a "curva sôbre a amostra" já foi lançada no gráfico descontando-se as interferências colorimétricas devidas ao milho, ou seja, o valor da absorbância (DO) no gráfico é dado por: $DO = DO(\text{lido}) - BM + B$, onde BM e B são os "blank" da amostra e dos reagentes respectivamente. Entrando-se com êste valor na "curva padrão", encontramos finalmente o teor de

(*) O termo "liberação" foi usado no sentido de "disponibilidade do triptofano para reação com o PDAB". Não implica em triptofano livre.

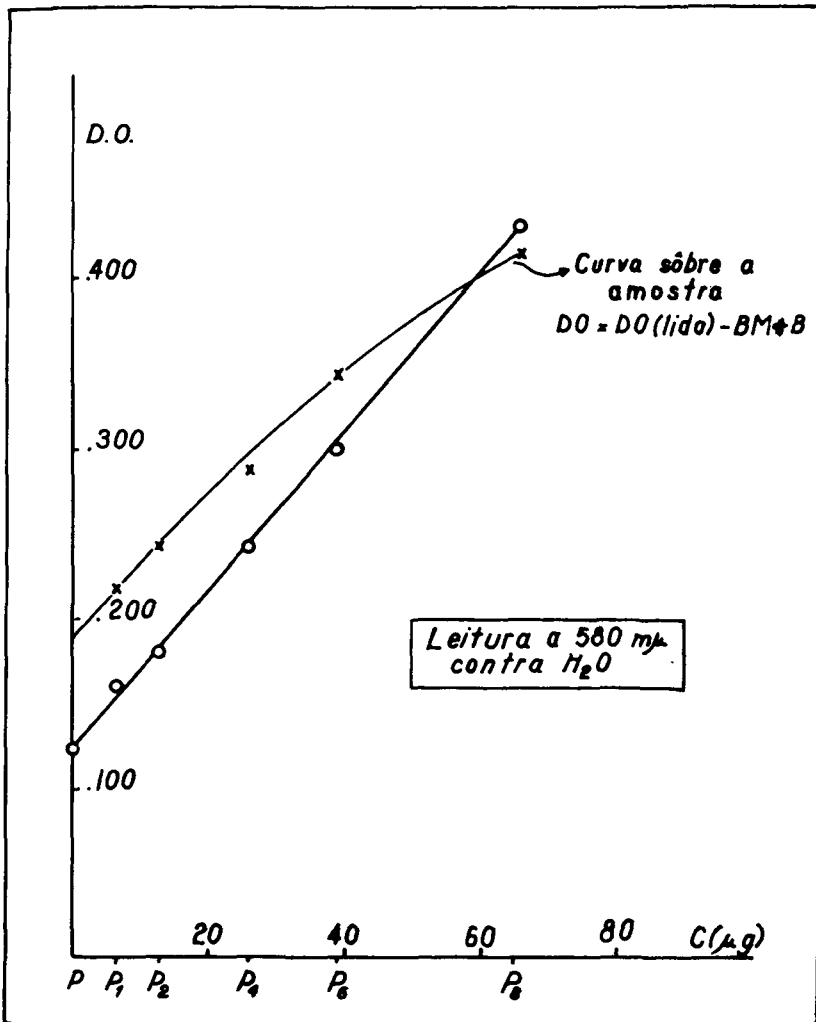


Figura 1.—Curva de absorbância X concentração de triptofano determinada com padrão e com amostra de milho opaco-2.

triptofano no milho opaco-2, ou seja, 0,67 g de triptofano/100 g de proteína (Nx6,25).

Para o cálculo da recuperação no ponto máximo, procedemos da seguinte maneira:

Leitura para o milho opaco-2 (extrapolada e descontadas as interferências): 0,186 unidades de absorbância

Leitura correspondente no eixo das abcissas: $14 \mu\text{g} = 14 \times 10^{-5} \text{ g}$ na amostra

Leitura no ponto PM1 (descontadas as interferências): 0,217 unidades de absorbância

Leitura correspondente no eixo das abcissas: $20,4 \times 10^{-5} \text{ g}$ na amostra.

Recuperação: $(20,4 - 14,0) \times 10^{-5} / 6,5 \times 10^{-5} = 0,98 = 98\%$.

A Tabela 1 apresenta alguns resultados encontrados segundo o presente procedimento com a mesma amostra de milho opaco-2.

TABELA 1

Exp.	% triptofano	recuperação %	média	desvio padrão
21	0,71	92		
22	0,67	98		
25	0,65	(§)	0,68	$\pm 0,026$
26	0,60	(§)		

(§) O máximo de liberação do triptofano foi encontrado sobre o eixo das absorbâncias.

Testes com feijão prêto, caseína e milho comum foram realizados e são apresentados na Tabela 2. Entretanto, para o feijão e a caseína os dados foram obtidos com o procedimento sem curva sobre a amostra. A leitura média da absorbância dos tubos M (descontadas as interferências) lançada contra a curva padrão, nos permitiu a determinação do teor em triptofano das amostras. A recuperação foi determinada com auxílio da leitura média das absorbâncias dos tubos PM2 descontadas as interferências.

TABELA 2

Amostra	% triptofano	recuperação %	valor da literatura
Feijão prêto	1,2	95	1,07(8)
Caseína	1,3	109	1,2 (9)
Milho comum	0,5	93	0,6(8) a 0,3(10)

Discussão dos Resultados

Testes iniciais, não reportados no presente artigo, em concordância com as afirmações de Lombard & Lange, mostraram que a digestão com papaína seguida de clarificação com

tetracloreto de carbono não altera o conteúdo de triptofano livre.

A aplicação da hidrólise em pH neutro, com algumas modificações no método de Lombard & Lange e utilizando uma fase colorimétrica sugerida por Spies & Chambers, nos permitiram a determinação do teor de triptofano no milho, em feijão e em caseína com boa reprodutividade e recuperação.

O procedimento da "curva sobre a amostra" aplicado ao milho, que apresenta recuperação e/ou liberação de triptofano variável com teor de triptofano adicionado, nos possibilitou a determinação do teor de triptofano na amostra nas condições de máximo de recuperação do aminoácido.

A recuperação no feijão e na caseína não sofrendo influência tão acentuada da presença de triptofano livre, nos permitiu dispençar o procedimento da curva sobre a amostra, apresentando também uma recuperação elevada.

Na Tabela 2 apresentamos ainda, para fins comparativos, dados da literatura para os alimentos considerados. Como pode ser observado, os dados são concordantes.

SUMMARY

Tryptophan analysis in foods

A method based on a hidrolisis with papain followed of a colorimetric reaction with p-dimethylamino benzaldehyde in cereals and legumes, is described.

BIBLIOGRAFIA

- 1—Spies, J. R., Chambers, D. C., "Chemical Determination of Tryptophan in Proteins", *Anal. Chem.*, 21, N° 10, 1249-1266 (1949).
- 2—Spies, J. R., "Determination of Tryptophan in Proteins", *Anal. Chem.*, 39, N° 12, 1412-1416 (1967).
- 3—"The Determination of Tryptophan in Foods", *Nutrition Reviews*, 22, N° 11, 347-349 (1964).
- 4—Pinto, G. F., Freitas, J., "Estudos do Perfil de Aminoácidos do Milho Opaco-2", *Produtos & Nutrição*, XXVIII/XXIX, 14-27 (1971).
- 5—FAO, OMS, "Necesidades de Proteínas", informe N° 37, serie de Informes Técnicos, N° 301, Roma, 1966.
- 6—Lombard, J. H., Lange, D. J., "The Chemical Determination of Tryptophan in Foods and Mixed Diets", *Anal Biochem.*, 10, 260-265 (1965).

- 7—Spies, J. R., Chambers, D. C., "Chemical Determination of Tryptophan", *Anal. Chem.*, 20, N° 1, 30-39 (1948).
- 8—Altschul, A. M., "Processed Plant Protein Foodstuffs", Academic Press Inc., N. Y., 1958.
- 9—U. S. Department of Agriculture, "Methods for Microbiological and Chemical Determinations of Essential Amino Acids in Proteins and Foods", Miscellaneous Publication N° 696, Washington, 1950.
- 10—Shimokomaki, M., *Boletim do Centro Tropical de Pesquisas e Tecnologia de Alimentos*, N° 13, 51-56 (1968).