

DETERMINACION COLORIMETRICA DE TRIPTOFANO EN ALIMENTOS

M. C. Mondragón,¹ F. Barne¹ y M. Calderón¹

Instituto Nacional de Nutrición, Caracas, Venezuela

RESUMEN

Se describe una modificación del método colorimétrico de Spies y Chambers para la determinación de triptofano en alimentos, el cual se basa en la condensación del aminoácido con el p-dimetilamino benzaldehído en medio de ácido sulfúrico. Ese producto es luego tratado con solución de nitrito sódico, produciéndose una coloración azul proporcional a la cantidad de triptofano presente. Se variaron las concentraciones de ácido sulfúrico y de nitrito de sodio hasta obtener un máximo desarrollo del color (ácido sulfúrico 16 N y solución de nitrito de sodio al 0.350/o).

Se aplicó el método a una diversidad de alimentos, coincidiendo los resultados con aquéllos obtenidos por el método microbiológico, con excepción de los caldos de frijol, los que aparentemente contienen factores que interfieren con ambos métodos. En resumen, el procedimiento es sencillo, sensitivo, y da resultados reproducibles.

Manuscrito modificado recibido: 13-10-81.

1 Miembros de la División de Investigaciones, Instituto Nacional de Nutrición, Apartado 2049, Caracas 1010, Venezuela.

INTRODUCCION

La determinación de triptofano en alimentos es de gran importancia, ya que frecuentemente constituye uno de los aminoácidos limitantes en las proteínas vegetales (1). No obstante, los métodos existentes para su determinación son complejos y laboriosos, como lo es su determinación microbiológica con el *Lactobacillus arabinosus* (2), uno de los procedimientos más difundidos. Otros métodos son de dudosa precisión o bien se realizan con equipos automáticos que no están al alcance de la mayoría de los laboratorios.

La coloración desarrollada por el triptofano con el p-dimetilamino benzaldehído y el nitrito de sodio en ácido sulfúrico, investigada por Spies y Chambers (3), ofrece grandes posibilidades. En un trabajo posterior (4), los mismos autores describen la determinación química de triptofano en varias proteínas y en presencia de sustancias añadidas, tales como aminoácidos y carbohidratos. Señalan, además, un procedimiento general para su determinación en proteínas bajo condiciones predeterminadas.

Rama, Tara y Krishman (5), aplican el procedimiento de Spies y Chambers a muestras de leguminosas, e indican que la concentración de nitrito de sodio debe ser incrementada de 0.05% a 0.20%, ya que con ello se consiguen mejores resultados. El contenido de triptofano determinado en estas condiciones para seis muestras, osciló entre 0.7 y 1.7 g/16 g N, mientras que los valores notificados en la literatura para las mismas muestras están comprendidos entre 0.5 y 0.8 g/16 g N.

En vista de estas discrepancias, resolvimos estudiar este método, realizando las modificaciones necesarias para aplicarlo a diversos alimentos, y comparando luego los resultados, con los obtenidos por el método microbiológico (2).

MATERIALES Y METODOS

Las muestras de variedades o cultivares de leguminosas utilizadas en el estudio fueron suministradas por el Centro de Investigaciones Agrícolas de Maracay, Venezuela. Las harinas vegetales procedían de la industria, y las mezclas vegetales de formulaciones preparadas en nuestro laboratorio con fines experimentales. Todas se molieron finamente, a modo de pasar un tamiz malla 60; algunas fueron sometidas a cocción a fuego abierto hasta su ablanda-

miento y luego de secadas por corriente de aire caliente, molidas.

A fin de calcular el balance del aminoácido triptofano en las fracciones obtenidas al cocinar los frijoles a fuego abierto, se separaron las semillas cocidas del caldo remanente valiéndose de un colador. Las dos fracciones se secaron con aire caliente y después de pesadas, se molieron finamente.

Para la determinación colorimétrica se suspendieron las muestras, cuyo contenido de triptofano era entre 50 y 100 mcg, en 10 ml de ácido sulfúrico que contenía 30 mg de p-dimetilamino benzaldehído. Después de 18 horas a la temperatura del laboratorio, se les agregó 0.1 ml de solución de nitrito de sodio, determinándose la absorbancia a 590 m μ . Con miras a encontrar las condiciones óptimas del desarrollo del color, se variaron las concentraciones de la solución de nitrito de sodio de 0.20/o a 0.40/o, y las de ácido sulfúrico, a 19 N y 16 N.

Una vez determinadas las condiciones óptimas, o sea, ácido sulfúrico 16 N y solución de nitrito de sodio al 0.350/o, se procedió al análisis de las muestras según la metodología señalada.

Con fines comparativos todas las muestras se analizaron tanto por el método químico como por el método microbiológico (2).

Para medir la absorbancia se usó un colorímetro Coleman y cubetas de 1 cm de espesor.

Los cálculos estadísticos se hicieron por el test de significancia "t" de Student (7).

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados que se exponen en la Tabla 1, demuestran que en las condiciones de trabajo señaladas por Rama, Tara y Krishman (5), los niveles de triptofano determinados para muestras de frijoles son muy bajos (1-1), comparados con los obtenidos para las mismas muestras aplicando el método microbiológico (1-5). Al incrementar la concentración de la solución de nitrito de sodio a 0.250/o se consigue aumentar esos niveles (1-2), los cuales permanecen prácticamente iguales al usar soluciones de nitrito al 0.300/o (1-3). Las mismas pruebas se realizaron disminuyendo la concentración de ácido sulfúrico a 16 N, concentración a la que se encontró un desarrollo máximo del color usando solución de nitrito de sodio al 0.350/o. Los niveles de triptofano determinados (1-4), fueron prácticamente iguales a los obtenidos por medio de método microbiológico ($P < 0.01$).

TABLA 1

TRIPTOFANO (g/16 g N) EN MUESTRAS DE FRIJOL DETERMINADO POR EL METODO COLORIMETRICO, VARIANDO LAS CONCENTRACIONES DE ACIDO SULFURICO Y NITRITO SODICO, COMPARADO CON EL OBTENIDO POR EL METODO MICROBIOLÓGICO

Muestras	Método colorimétrico				Método microbiológico
	(1-1)*	(1-2)*	(1-3)*	(1-4)*	(1-5)*
	H ₂ SO ₄ :	19 N	19 N	19 N	16 N
	NaNO ₂ :	0.20/o	0.25/o	0.30/o	0.35/o
		g/16 g N	g/16 g N	g/16 g N	g/16 g N
Frijol negro (crudo)	0.69	0.88	0.85	1.12(0.08)	1.16(0.08)
Frijol negro (cocido)**	0.78	0.99	0.97	1.27(0.06)	1.26(0.07)
Frijol blanco (crudo)	0.82	0.90	0.91	1.26(0.06)	1.22(0.08)
Frijol blanco (cocido)**	0.87	0.85	0.87	1.35(0.05)	1.25(0.04)

* (1-1) Condiciones según Rama, Tara y Krishman (5).

* (1-2), (1-3) Aumentando las concentraciones de nitrito de sodio.

* (1-4) Condiciones óptimas encontradas.

* (1-5) Método microbiológico.

** Frijol cocido completo (semillas + caldo).

Las cifras entre paréntesis son las desviaciones estándar de los resultados.

TABLA 2

TRIPTOFANO EN MUESTRAS DE LEGUMINOSAS, CEREALES Y LECHE DETERMINADO POR EL METODO COLORIMETRICO Y POR EL METODO MICROBIOLÓGICO

Muestras	N* g/100 g	No. de muestras analizadas	Método colorimétrico			Método microbiológico		
			No. de determi- naciones	Tripto- fano g/16 g N	DE	No. de determi- naciones	Tripto- fano g/16 g N	DE
Frijoles	3.77	18	50	1.16	0.08	18	1.14	0.08
Maíz corriente	1.65	3	7	0.57	0.02	3	0.59	0.03
Maíz (Opaco-2)	1.58	3	9	0.85	0.20	3	0.83	0.23
Soya, semillas	5.60	10	16	1.27	0.21	20	1.18	0.15
Harina de maíz precocida	1.23	3	6	0.56	0.07	3	0.57	0.04
Harinilla de maíz	1.51	3	3	1.21	0.18	3	1.18	0.08
Germen de maíz	1.75	2	8	0.85	0.03	2	0.88	0.05
Harina de soya No. 9	8.07	1	3	1.09	0.04	1	1.04	—
Harina de arroz	1.19	2	5	1.52	0.04	3	1.48	0.05
Formulaciones a base de maíz-soya y arroz-soya	3.81	8	29	1.19	0.25	17	1.14	0.23
Arepas desecadas de maíz	1.41	3	6	0.56	0.04	3	0.53	0.01
Aislado de germen de trigo	3.70	1	2	1.32	0.21	1	1.32	—
Aislado de soya	13.72	1	2	1.37	0.02	1	1.32	—
Leche completa en polvo	4.41	2	5	1.18	0.07	2	1.13	0.07

DE = Desviación estándar de las diferentes muestras analizadas, con respecto al promedio total obtenido.

* Véase referencia (6).

TABLA 3

TRIPTOFANO EN FRIJOL COMPLETO COCIDO, SEMILLAS Y CALDOS, DETERMINADO POR EL METODO COLORIMETRICO Y POR EL METODO MICROBIOLÓGICO

Muestras	Peso seco obtenido	No. de muestras analizadas	Método colorimétrico				Método microbiológico			
			No. de determinaciones	Triptof. g/16 g N	DE	Balance del aa* o/o	No. de determinaciones	Triptof. g/16 g N	DE	Balance del aa* o/o
Frijol negro cocido completo		5	9	1.21	0.03		5	1.24	0.08	
Semillas	(88 ^o /o)	3	3	1.36	0.01	99	3	1.40	0.02	99
Caldo desecado	(12 ^o /o)	3	11	0.41	0.20	4	15	0.88	0.18	9
Frijol blanco cocido completo		4	4	1.01	0.03		4	0.98	0.04	
Semillas	(74 ^o /o)	4	4	1.20	0.05	88	4	1.19	0.05	90
Caldos	(26 ^o /o)	4	4	0.84	0.12	22	4	1.13	0.16	30

* Distribución del aminoácido en cada fracción (o/o).

Esta metodología se aplicó a un número de muestras (Tabla 2), comparando siempre los resultados obtenidos por el análisis microbiológico. Los ensayos de significación (7) practicados demuestran que los promedios logrados por el método químico fueron iguales a los promedios por el método microbiológico, ya que las diferencias encontradas no fueron significativas en ningún caso ($P < 0.01$).

Los análisis de triptofano en el frijol completo cocido y en las dos fracciones separadas de caldos y semillas coladas, así como los cálculos de balance del aminoácido contenido en esas fracciones, se detallan en la Tabla 3. Según se observa, el triptofano permanece en su mayor parte en las semillas. Los hallazgos, tanto para el frijol completo como para las semillas coladas —blancas o negras— son estadísticamente iguales por los dos métodos, no siendo así para los caldos, en cuyo caso el método microbiológico dio mayores resultados que el método químico, especialmente en los caldos de frijol negro.

En este caso, sin embargo, también la reproducibilidad en ensayos repetidos por ambos métodos es buena. Los cálculos de balance indican que los valores obtenidos por los dos procedimientos siempre dan resultados que suman más de 100%. Es posible, pues, que algún factor o factores en los caldos de frijoles interfieran con la determinación del triptofano.

El método, con la modificación propuesta, es sencillo y rápido, y rinde resultados reproducibles, permitiendo así el análisis de 30 muestras y más en un solo paso, sin tener que realizar la hidrólisis alcalina de las proteínas. Con base en los hallazgos, se recomienda de manera tentativa para trabajos rutinarios de laboratorio.

SUMMARY

COLORIMETRIC DETERMINATION OF TRYPTOPHAN IN FOODS

A modification of the method of Spies and Chambers for the determination of tryptophan in food products is described. The results were compared with those obtained with the microbiological method and gave identical results. The results on tryptophan content of bean broth were consistently higher than expected. Apparently, bean broth contains certain factors, which interfere with both procedures. In summary, the modified method is simple and easy to perform in large numbers of samples.

BIBLIOGRAFIA

1. Kaul, A. K. **Nuclear Techniques for Seed Improvement**. Viena, IAEA, 1973, p. 1.
2. Koch, F. C. & M. E. Hanke. **Practical Methods in Biochemistry**. 6th ed. Baltimore, Md., Williams & Wilkins Co., 1953.
3. Spies, J. R. & D. C. Chambers. Chemical determination of tryptophan. Study of color-forming reactions of tryptophan, p-dimethylamino-benzaldehyde and sodium nitrate in sulphuric acid solution. **Anal. Chem.**, **20**: 30, 1948.
4. Spies, J. R. & D. C. Chambers. Chemical determination of tryptophan in proteins. **Anal. Chem.**, **21**: 1249, 1949.
5. Rama, M. V., M. R. Tara & Ch. K. Krishnan. **J. Food Sci. Technol.** (Mysore), **11**: 213-216, 1974.
6. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of the AOAC**. 13 th ed. Washington, D. C., The Association, 1980, p. 858.
7. "Student". **Student's Collected Papers**. Cambridge, Mass., University Press, 1942.