

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

ISSN 1518-4277

Dezembro, 2002

Documentos 22



Metodologia para Análise de Aminoácidos Protéicos em Grãos de Milho



Hélio Teixeira Prates

Sete Lagoas, MG
2002





Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Milho e Sorgo

Rod. MG 424 km 45
Caixa Postal 151
35701-970 Sete Lagoas, MG
Fone: (31) 3779 1000
Fax: (31) 3779 1088
Home page: www.cnpms.embrapa.br
E-mail: sac@cnpms.embrapa.br

Comitê de Publicações da Embrapa Milho e Sorgo

Presidente: Ivan Cruz
Secretário-Executivo: Frederico O.M. Durães
Membros: Antônio Carlos de Oliveira, Arnaldo Ferreira da Silva, Carlos Roberto Casela, Fernando Tavares Fernandes e Paulo Afonso Viana

Supervisor editorial: José Heitor Vasconcellos
Revisor de texto: Dilermando Lúcio de Oliveira
Normalização bibliográfica: Maria Tereza Rocha Ferreira
Tratamento de ilustrações: Tânia Mara Assunção Barbosa
Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa

1ª edição

1ª impressão (2002): 300 exemplares

Todos os direitos reservados.

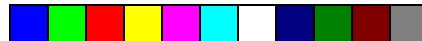
A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Prates, Hélio Teixeira
Metodologia para análise de aminoácidos
protéicos em grãos de milho / Hélio Prates Teixeira.
Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2002.
21p. (Embrapa Milho e Sorgo.Documentos, 22)

1. Milho-Grão-Aminoácidos. 2. Milho-Qualidade-Grão.
I. Título. II. Série.

© Embrapa 2002





Autor

Hélio Teixeira Prates

PhD, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo

Rod. MG 424 km 65 - Cx. Postal 151

35701-970 Sete Lagoas, MG

Fone: (31) 3779-1004 Fax: (31) 3779-1088

htprates@cnpms.embrapa.br





Apresentação

O conhecimento do teor de aminoácidos nos alimentos é informação valiosa para nutricionistas e a indústria de alimentos.

O objetivo deste trabalho foi ajustar metodologia para determinação quantitativa dos níveis de aminoácidos protéicos em grão de milho, por cromatografia de troca iônica, utilizando cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC).

Hélio Teixeira Prates
PhD Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo



Sumário

Introdução	9
Metodologia	10
Condições Analíticas do Analisador de Aminoácidos.....	13
Considerações Finais	16
Agradecimentos	16
Biografia Consultada	17
Aminogramas	18



Metodologia para Análise de Aminoácidos protéicos em Grãos de Milho

Hélio Teixeira Prates

Introdução

A metodologia de análise de aminoácidos utiliza uma técnica laboriosa envolvendo várias etapas. Por outro lado, existe uma variedade de equipamentos de diferentes tipos de fabricação, o que acrescenta mais variáveis a serem observadas para uma boa execução da metodologia. Essas dificuldades só podem ser superadas desde que se façam os ajustes necessários para cada caso e haja uma uniformização de resultados. Essa iniciativa foi tomada por Llames e Fontaine (1994), através de um estudo colaborativo, em que foram abordados todos os métodos disponíveis.

Este trabalho tem como objetivo apresentar metodologia ajustada para as condições do Laboratório de Agroquímica da Embrapa Milho e Sorgo, com base naquela preconizada por Llames e Fontaine (1994), através de trabalho em colaboração com a Profa. Eloísa de O. Simões Saliba – Chefe do Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da Escola de Veterinária da UFMG, utilizando cromatográfico líquido de alta eficiência (HPLC), adaptado com sistema de análise de aminoácidos, modelo Shimadzu LC-10A.

Metodologia

Análise de Aminoácidos Protéicos

- Após recebimento da amostra moída, triture-a manualmente em gral até passar em peneira de 60 mesh.
- A amostra deve ter um peso equivalente a 20 mg de **proteína bruta**. Colocar em tubo de ensaio de 20 mL, com tampa rosqueável.
- Acrescentar 10 mL de HCl 6 N, deixar no ultrassom por 5 min.
- Retirar o ar do tubo injetando nitrogênio gasoso por 30 segundos, rosquear a tampa (bem vedada) e deixar em estufa a 110°C, por um período de 24 h.
- Retirar da estufa, deixar esfriar, filtrar em filtro Whatman nº 1 (ou equivalente) para balão de fundo redondo de 50 mL, lavando o filtrado com água Milli-Q.
- Evaporar até quase secura, no evaporador rotatório, a 60°C.
- Transferir a amostra para balão volumétrico de 10 mL e completar o volume utilizando tampão citrato pH 2,2 (durante a transferência, limpar bem o balão contendo a amostra com tampão citrato, para não deixar resíduos).
- Tomar 1 mL e colocar em balão de 10 mL, completando o volume com tampão citrato pH 2,2. Verificar o pH, que deve estar entre 2,2 e 2,5 (caso contrário, ajustá-lo com HCl ou NaOH).
- Tomar 1 mL da amostra em seringa descartável, filtrar em unidade filtrante Millex (membrana PTFE, 0,22 µm de diâmetro de poro e 13mm de diâmetro) e colocar no amostrador automático, para posterior injeção no analisador de aminoácidos. O aminograma IV.1 mostra uma mistura de padrões dos aminoácidos protéicos e o aminograma IV.2, uma amostra de milho proveniente do Laboratório de Nutrição Animal da UFMG.

Importante:

- 1 – Os resultados de **proteína bruta** e **gordura** (%) devem acompanhar a amostra para a análise de aminoácidos.
- 2 - As amostras devem ter, no máximo, até 5% de **gordura**. Caso contrário, a análise de aminoácidos será realizada no resíduo do extrato etéreo.
- 3 – A hidrólise ácida utilizada não quantifica **metionina** e **cistina**, os quais são subestimados, sendo o **triptofano** decomposto (Llames e Fontaine, 1994).

Análise de Metionina e Cistina por Hidrólise Ácida com Pré-oxidação

Para evitar a degradação de parte da metionina e cistina durante a hidrólise ácida, esses aminoácidos foram determinados numa segunda amostra, utilizando etapa de oxidação com ácido perfórmico previamente à hidrólise ácida. Dessa forma, a metionina é quantificada como metionina sulfônica e a cisteína, como ácido cistéico.

- Após o recebimento da amostra moída, triture-a manualmente em gral até passar em peneira de 60 mesh.
- A amostra deve ter um peso equivalente a 20 mg de **proteína bruta**. Colocar em balão de fundo redondo, com capacidade de 50 mL.
- Utilizando capela, adicionar 8 mL de ácido perfórmico e deixar em banho de gelo por 4h. Colocar 0,3 mL de ácido bromídrico (48%), deixando 30 min. em banho de gelo .
- Evaporar até quase securo, no evaporador rotatório, a 60°C .
- Transferir para tubo de ensaio de 20 mL com tampa rosqueável, usando HCl 6N, até atingir aproximadamente 10 mL.

- Tampar o tubo (bem vedado) e colocar na estufa por um período de 24 h.
- Retirar da estufa, deixar esfriar, filtrar em filtro Whatman n.1 (ou equivalente) para balão do evaporador rotatório de 50 mL, lavando o filtrado com água Milli-Q.
- Evaporar até quase securo, no evaporador rotatório, a 60°C .
- Transferir a amostra para balão volumétrico de 10 mL e completar o volume utilizando tampão citrato pH 2,2 (durante a transferência, limpar bem o balão contendo a amostra com tampão citrato, para não deixar resíduos).
- Tomar 1 mL e colocar em balão de 10 mL, completando o volume com tampão citrato pH 6,0. Verificar o pH, que deve estar entre 6,1 e 6,2 (caso contrário, ajustá-lo com HCl ou NaOH).
- Tomar 1 mL da amostra em seringa descartável, filtrar em unidade filtrante Millex (membrana PTFE, 0,22 µm de diâmetro de poro e 13mm de diâmetro) e colocar no amostrador automático, para posterior injeção no analisador de aminoácidos. Metionina sulfônica (aminograma IV.3) e ácido cistéico (aminograma IV.4).

Importante:

- a) Os resultados de **proteína bruta** e **gordura** (%) devem acompanhar a amostra, para a análise de aminoácidos.
- b) As amostras devem ter no máximo 5% de gordura. Caso contrário, a análise de aminoácidos será realizada no resíduo do extrato etéreo.

Condições Analíticas do Analisador de Aminoácidos

Preparo de soluções para o analisador de aminoácidos

Fase móvel

a) Fase móvel A (AA-MA):

- Encher 1/3 do volume de um balão volumétrico de 2 L com água Milli-Q
- Dissolver 39,2 g de citrato de sódio di-hidratado, sal tri-sódico p.a (0,2 N)
- Adicionar 140 mL de etanol 99,5 %, p.a
- Acrescentar 33,3 mL de ácido perclórico 60%, p.a
- Ajustar pH 3,22, com hidróxido de sódio p.a ou ácido perclórico p.a.
- Completar volume para 2 litros com água Milli-Q

b) Fase móvel B (AA-MB):

- Encher 1/3 do volume de um balão volumétrico de 2 L com água Milli-Q
- Dissolver 117,6 g de citrato de sódio di-hidratado, sal tri-sódico p.a (0,6 N)
- Dissolver 24,8 g de ácido bórico p.a.(0,2 M)
- Adicionar 60 mL de NaOH 4 M
- Acertar o pH 10.0
- Completar volume para 2 litros com água Milli-Q

c) Fase móvel C (AA-MC):

- 8 g de NaOH para 1000 mL de H₂O (0,2 M)

Obs.: o pH das fases móveis A e B só deverá ser ajustado 24 h após o preparo e deve ser lido em potenciômetro, com três casas decimais. Fase móvel A - pH 3,22 e fase móvel B - pH 10,0.

Preparo de soluções de reação pós-coluna

a) Solução de reação

- Encher metade de um balão volumétrico de 1 L com água Milli-Q
- Dissolver os reagentes na seguinte seqüência:
 - 40,70 g de Na_2CO_3 p.a
 - 18,80 g de K_2SO_4 p.a
 - 13,57 g de H_3BO_3 p.a
- Completar volume para 1 litro.

b) Solução pós-coluna de hipoclorito de sódio - NaClO (AA-RA)

- Colocar 0,2 mL de solução NaClO p.a. em balão volumétrico de 500 mL e completar com solução de reação preparada no item a

c) Solução de reação pós-coluna OPA – ortofitaldialdeído (AA-RB)

- Dissolver 400 mg de OPA em 7 mL de etanol (pureza para HPLC) e transferir para balão volumétrico de 500 mL
- Adicionar 1 mL de 2-mercaptoethanol p.a
- Completar o volume com solução de reação preparada no item a

Obs.: as soluções de fase móvel A (AA-MA), B (AA-MB) e C (AA-MC) e de pós-coluna A (AA-RA) e B (AA-RB) devem ser filtradas com filtro de membrana de diâmetro de poro de $0,45\mu\text{m}$ e degaseificadas em ultrassom, antes de serem usadas no analisador de aminoácidos.

d) Solução de ácido perfórmico (100 mL) para abertura de amostra para análise de metionina

- Colocar, em um erlenmeyer de 125 mL, 10 mL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 30% p.a.

- Acrescentar 90 mL de ácido fórmico 88% p.a e deixar em repouso por 30 min.
- Em seguida, deixar em banho de gelo por 15 min.

Obs.: a solução deve ser preparada no dia da análise

e) Solução de Citrato (100 ml) para diluição das amostras para injeção no analisador de aminoácidos.

- Pesar 1,961 g de citrato de sódio di-hidratado, sal tri-sódico p.a para 100mL de H₂O (0,2 N)

Obs.: ajustar pH da solução 2,2 para os aminoácidos e 6,0 para a metionina e cistina

Importante:

Os reagentes a serem utilizados devem ser de boa qualidade, sendo que, para as fases móveis, devem ser de qualidade tipo "SIGMA ULTRA". Esse cuidado deve ser observado, para não se colocar em risco a coluna do analisador de aminoácidos.

Condições analíticas do analisador de aminoácidos

Volume de injeção: 10 µL

Temperatura de forno: 60°C

Detetor de fluorescência: EX λ 350 nm

EM λ 450 nm

Coluna de separação : Shim-pack Amino-Na

Coluna Trap de Amônia : Shim-pack ISC-30Na

Para a separação dos aminoácidos, usar fase móvel A, B e C, de acordo com o seguinte gradiente:

Time (min.)	Function	Value
9.00	Conc. B	0
13.00	Conc. B	7
17.20	Conc. B	8
17.21	Conc. B	11
20.80	Conc. B	11
20.81	Conc. B	50
22.00	Conc. B	58
22.01	Conc. B	100
28.80	Solenoid Valve	1
29.30	Conc. B	100
29.31	Conc. B	0
33.00	Solenoid Valve	2
35.00	T. Flow	0.6
36.50	T. Flow	0.7
43.30	T. Flow	0.7
44.00	T. Flow	0.6
45.00	Stop	0

a) 0-9 min - fase móvel A

b) > 35 min - fase móvel C

Para a reação de derivatização pós-coluna, usar soluções:

AA-RA - solução NaClO

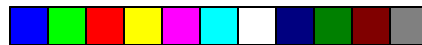
AA-RB - solução OPA

Considerações finais

A análise de triptofano é normalmente realizada por espectrofotometria.

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer a participação e a colaboração inestimável da Profa. Eloísa de O. Simões Saliba, da Escola de Veterinária da UFMG, juntamente com seus estudantes de pós-graduação, em particular aos Drs. Flávia Maria de Oliveira



Borges e Paulo Campos Christo Fernandes, que tiveram suas teses defendidas na Escola de Veterinária, utilizando análise de aminoácidos em aparelho similar (Fernandes, 1997).
Agradecemos também o empenho e a dedicação dos funcionários Nilson Machado Lopes e Carlos Henrique de Paula Pires no desempenho de suas funções no Laboratório de Agroquímica.

Bibliografia consultada

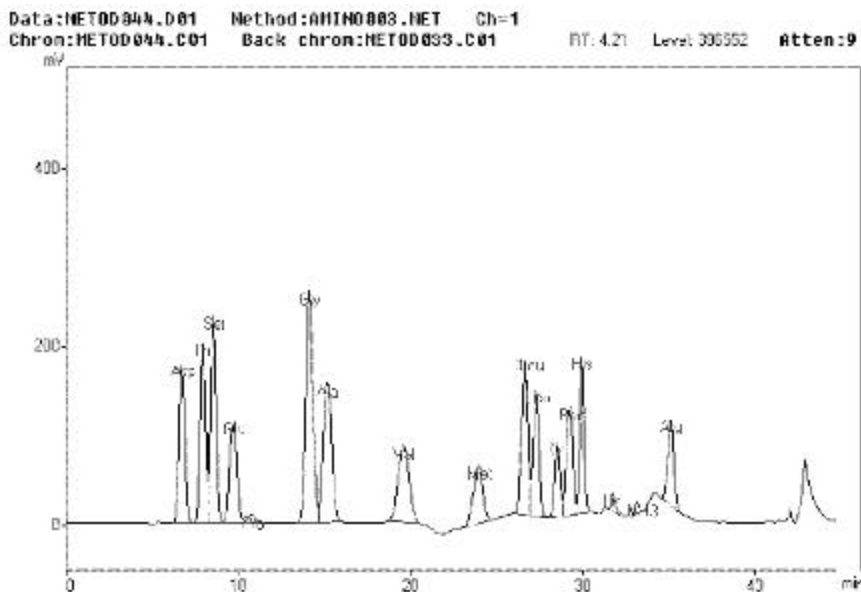
FERNANDES, P.C.C. **Degradabilidade ruminal de aminoácidos do farelo de soja em bovinos**. 1997. 120 f. Tese(Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. Belo Horizonte.

LLAMES, C.R.; FONTAINE, J. Determination of Amino Acids in Feeds: Collaborative Study, **Journal of the Association of Official Agricultural Chemists**, Washington, v.77, n.6, p.1362-1402, 1994.



Aminogramas

- Aminograma de mistura de padrões com 10 ppm de cada aminoácido

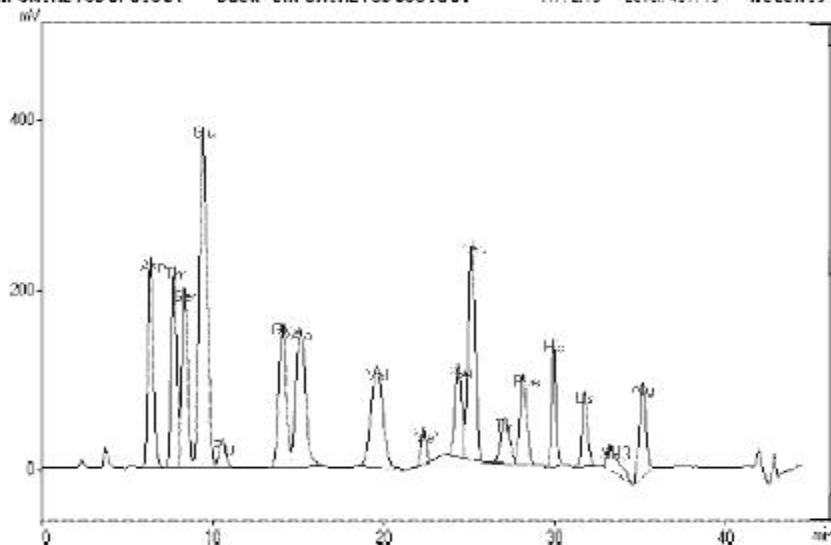


** Peak Report ** METOD044.D01 02/03/26 08:25:40

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	6.640	3642172	181794	1		10.0000	Asp
2	7.866	4458921	204541	2		10.0000	Thr
3	8.481	5144033	234643	3		10.0000	Ser
4	9.652	3036843	114736	4		10.0000	Gln
5	10.730	267458	8774	5		10.0000	Pro
6	14.093	7736488	259622	6		10.0000	Gly
7	15.151	4963230	157545	7		10.0000	Ala
8	19.580	4112724	86895	9		10.0000	Val
9	23.911	2398689	66529	10		10.0000	Met
10	26.630	4064687	177857	11		10.0000	Ileu
11	27.281	3341735	143176	12		10.0000	Leu
12	28.566	1844401	83956	13		10.0000	Tyr
13	29.255	2824458	122193	14		10.0000	Phe
14	29.941	3072634	178328	15		10.0000	His
15	31.830	367341	21584	16		10.0000	Lis
16	33.166	236826	13142	17		10.0000	NH3
17	35.136	2399456	98496	18		10.0000	Arg
TOTAL		53912096	2153810			169.9999	

- Aminograma de amostra de milho proveniente da UFMG

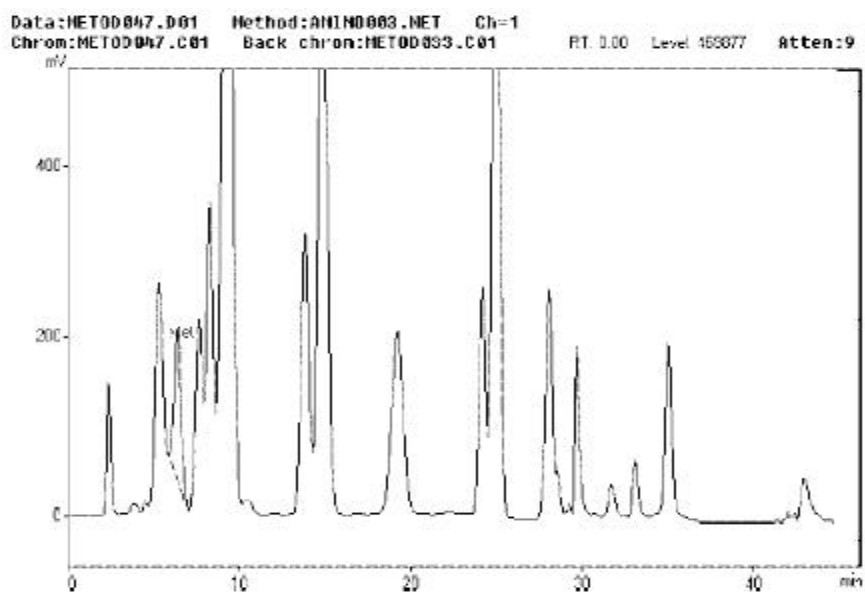
Data:METOD070.D01 Method:AMINO003.MET Ch=1
 Chrom:METOD070.C01 Back chron:METOD003.C01 RT: 2.10 Level: 491719 Atten:9



** Peak Report ** METOD070.D01 02/04/02 14:41:24

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK IDNO	CONC	NAME
1	6.329	4890541	237216	1	24.3137	Asp
2	7.653	5062399	227076	2	14.1590	Thr
3	8.294	4740701	209311	3	12.6949	Ser
4	9.390	10860612	393735	4	52.0232	Gln
5	10.509	790969	29092	5	24.7864	Pro
6	14.036	4898082	162181	6	7.4423	Gly
7	15.100	5441046	155771	7	15.5775	Ala
8	19.587	5320328	109443	9	14.3081	Val
9	22.329	888937	37964	10	5.5782	Met
10	24.344	2824885	102523	11	9.3385	Ileu
11	25.147	7114497	250346	12	31.0633	Leu
12	27.094	1665384	45462	13	13.4831	Tir
13	28.198	2721016	97615	14	12.7514	Phe
14	29.935	2520191	143047	15	12.4176	His
15	31.802	1670860	82164	16	22.2621	Lis
16	33.227	1263605	26730	17	20.3865	NH3
17	35.140	2611407	101725	18	16.2001	Arg
TOTAL		65285458	2411400		308.7857	

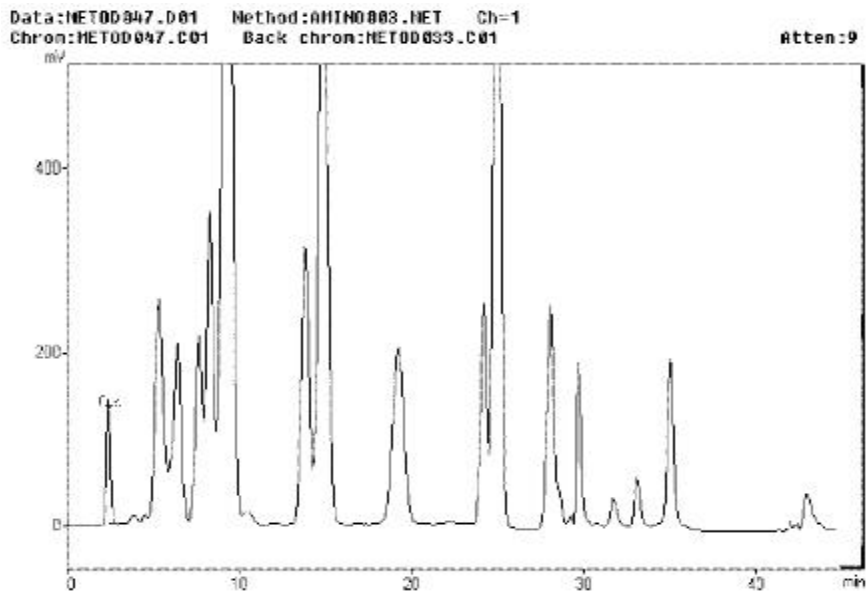
- Aminograma de metionina sulfônica em amostra de milho IHP



** Peak Report ** MET00047.D01 02/03/26 11:12:12

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK IDNO	CONC	NAME
1	6.382	4934399	183536	1	43.2619	Met
TOTAL		4934399	183536		43.2619	

- Aminograma de ácido cistéico da amostra de milho IHP



** Peak Report ** MET00047.D01 02/03/26 11:12:12

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK IDNO	CONC	NAME
1	2.287	2447718	153386	1	24.5241	Cys
TOTAL		2447718	153386		24.5241	