



**DETERMINAÇÃO DE TRIPTOFANO EM MATRIZES ALIMENTARES COMPLEXAS POR  
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)**

Bruna G. O. B. dos **Santos**<sup>1</sup>, Maria T. **Bertoldo Pacheco**<sup>2</sup>, Lucia Del Carmen **de La Hoz Urrejola**<sup>2</sup>,  
Vera Sônia **Nunes da Silva**<sup>3</sup>

**Nº 14231**

**RESUMO** - O triptofano é um aminoácido aromático essencial, e contribui efetivamente na síntese protéica e na regulação de importantes mecanismos fisiológicos, além de ser o precursor da serotonina. Está presente em diversos tipos de alimentos, porém em baixas concentrações. O objetivo principal deste estudo foi a implementação da metodologia para quantificação de triptofano submetido a hidrólise alcalina e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando Fenilisotiocianato (PITC) como reagente derivatizante. Para efeito de comparação, em paralelo foi utilizado o método enzimático espectrofotométrico. Os resultados dos teores de triptofano encontrados nas amostras pelo Método\_1 (espectrofotométrico) e Método-2 (cromatografia líquida de alta eficiência) apresentaram diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) somente para as amostras de tilápia-B e C. Adicionalmente, os métodos mostraram-se eficientes para os produtos analisados, de acordo com as condições estabelecidas para as quantidades de aminoácidos essenciais do alimento, no caso o triptofano, segundo as exigências da RDC 54/12.

**Palavras-chave:** triptofano, derivatização, padrão interno, hidrólise alcalina.

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Eng. de Alimentos, FAJ, Jaguariúna - SP, brunagabriela28@hotmail.com

2 Colaborador: Pesquisador, CCQA/ITAL, Campinas – SP

3 Orientador: Pesquisador, CCQA/ITAL, Campinas-SP, vera.silva@ital.sp.gov.br



**ABSTRACT** – *Tryptophan is an essential aromatic amino acid, contributes effectively in protein synthesis and regulation of important physiological mechanisms, and besides being the precursor of serotonin. It is present in many types of food, but in low concentrations. The main objective of this study was to implement the method for quantification of tryptophan subjected to alkaline hydrolysis and liquid chromatography (HPLC) using phenylisothiocyanate (PITC) as derivatizing reagent. For comparison, in parallel the enzymatic spectrophotometric method was used. The results of the levels of tryptophan found in the samples by Método\_1 (spectrophotometric) and Method-2 (high performance liquid chromatography) showed statistical differences ( $p < 0.05$ ) only for samples of tilapia B and C. In addition, the methods were effective for the products analyzed in accordance with the conditions set for the quantities of essential amino acids from food, if tryptophan, as required by RDC 54/12.*

**Key-words:** tryptophan, derivatization, internal standard, alkaline hydrolysis.

## **1 INTRODUÇÃO**

O triptofano é um aminoácido aromático essencial, e contribui efetivamente na síntese proteica e na regulação de importantes mecanismos fisiológicos, além de ser o precursor da serotonina. Diversos estudos têm mostrado que a serotonina tem participação na modulação da motilidade gastrointestinal, tônus vascular periférico, tônus vascular cerebral, além de exercer importante função plaquetária e na fisiopatologia de diversas desordens de humor, vômito, enxaquecas, síndrome do intestino irritável e hipertensão sistêmica e pulmonar (MOHAMMAD-ZADEH et al., 2008).

As principais fontes deste aminoácido são alimentos de origem animal como peixes, frutos do mar (mariscos, ostras), aves (carne escura de frango e peru) e carne bovina e em alguns alimentos de origem vegetal (soja, nozes, feijão). Sua quantificação tornou-se indispensável após dezembro de 2012, com o estabelecimento da RDC 54/2012 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para o uso das alegações de fonte e alto teor de proteínas, as proteínas do alimento devem atender a um critério mínimo de qualidade, de acordo com os níveis de aminoácidos preconizados pela FAO/WHO (2007). O presente Regulamento Técnico se aplica à Informação Nutricional Complementar (INC) contida nos rótulos dos alimentos embalados produzidos e comercializados no território dos Estados Partes do MERCOSUL, ao comércio entre eles e às importações extrazona, embalados na ausência do cliente e prontos para oferta aos consumidores (ANVISA, 2012).



O triptofano pode ser quantificado por espectrofotometria (SPIES, 1967), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com derivatização pré-coluna com fenilisotiocianato (WHITE; HART; FLY, 1988; HAGEN; FROST; AUGUSTIN, 1989) ou derivatização pós-coluna com ninidrina (SPACKMAN, STEIN e MOORE, 1958). Dentro deste contexto, o presente trabalho teve como finalidade, quantificar o teor de triptofano por CLAE com derivatização pré-coluna com fenilisotiocianato em matrizes alimentares complexas, os resultados obtidos foram comparados estatisticamente aos obtidos pelo método espectrofotométrico e adicionalmente foi verificado se os mesmos atendiam as exigências estabelecidas pela ANVISA na RDC 54/2012.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

**2.1. Matéria-prima:** Padrão de triptofano marca SIGMA com 99% de pureza. Neste estudo, a denominação “matrizes alimentares complexas”, foi utilizada para classificar os alimentos passíveis em dificultar a ação das enzimas durante a hidrólise enzimática, ou seja. matrizes alimentares de difícil homogeneização devido sua heterogeneidade, paredes celulares resistentes ou formar complexos coloridos, os quais podem mascarar a leitura espectrofotométrica, entre outros aspectos. Para tanto, os produtos selecionados para o estudo foram alimentos reconhecidos como fontes de triptofano, a farinha de soja por apresentar facilidade de homogeneização, pescados (tilápia) e aves (frango) devido a heterogeneidade de ambos. Foram adquiridas três marcas diferentes denominadas como A, B e C oriundas do comércio da região de Campinas - SP.

**2.2. Métodos:** Determinação de proteína AOAC (2010), quantificação de triptofano por hidrólise enzimática (SPIES, 1967) e por cromatografia líquida de alta eficiência (WHITE; HART; FLY, 1988; HAGEN; FROST; AUGUSTIN, 1989) após sofrer hidrólise alcalina.

**2.3. Solução Padrão de Triptofano:** Foi utilizada uma massa referente ao padrão de triptofano com precisão ( $51,0 \pm 0,05$  mg) e transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL e dissolvida em ácido clorídrico 0,1M para obtenção de uma solução-mãe com concentrado  $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ . Posteriormente foram utilizadas massas referentes a 0,0642g; 0,1327g; 0,3132g; 0,7996g e 1,5827g, as quais foram adicionadas em balões volumétricos com capacidade para 5 mL, foram adicionados também 0,5 mL de padrão interno (ácido  $\alpha$ -aminobutírico) nos cinco pontos da curva.

**2.4. Derivatização pré-coluna do padrão:** Com auxílio de uma seringa de 100 $\mu$ L foi transferida uma alíquota de 40 $\mu$ L para o tubo de vidro para o procedimento da derivatização (reação pré-coluna com Fenilisotilcianato-PITC). O tubo foi colocado no *vial* de secagem. Posteriormente, adicionado 22 $\mu$ L e solução de re-secagem, a amostra então, foi homogeneizada e seca



## 8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

novamente. Depois de seco, adicionou-se 22µL de solução derivatizante. As cinco concentrações do padrão de triptofano foram homogeneizadas e permaneceram em repouso por 20 minutos, e posteriormente foram secas por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 500µL de diluente, e levadas ao ultrassom por 10 minutos e posteriormente homogeneizadas em vortex e centrifugadas por 5 minutos a 3.000 rpm., e finalmente transferidas frascos de injeção específicos para cromatografia líquida (HAGEN; FROST; AUGUSTIN, 1989).

**2.5. Parâmetros Cromatográficos:** A temperatura da coluna foi de 50°C, a fase móvel foi composta por: acetonitrila: acetato de sódio. A fase móvel foi filtrada através de um sistema de filtração Millipore vácuo equipado com um filtro de 0,45 µM, e desgaseificadas em ultrasson. O detector UV foi ajustado para 254nm (WHITE; HART; FLY, 1988).

**2.6. Determinação de triptofano (TRP) nas amostras:** As amostras foram analisadas em triplicatas pelos dois métodos propostos. O Método\_1 (espectrofotométrico): O TRP foi determinado após hidrólise enzimática com pronase a 40 °C durante 22-24 horas, seguido de reação colorimétrica com 4-dimetilaminobenzaldeído (DAB) em ácido sulfúrico 21,1N e leitura em espectrofotômetro a 590 nm. O teor de triptofano foi calculado a partir de uma curva padrão de TRP. O Método-2 (cromatografia líquida de alta eficiência): A amostra foi submetida a hidrólise alcalina com NaOH 4N, e reação pré-coluna com Fenilisotilcianato (PITC) e quantificação em CLAE fase reversa utilizando-se como padrão interno, o ácido α-aminobutírico e detecção por UV a 254nm.

**2.7. Análise estatística:** Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey (Pimentel Gomes, 2009), para determinação da diferença significativa entre as médias (nível de significância de  $p \leq 0,05$ ), utilizando o programa SAS – *Statistical Analysis System* (SAS, Cary, USA).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

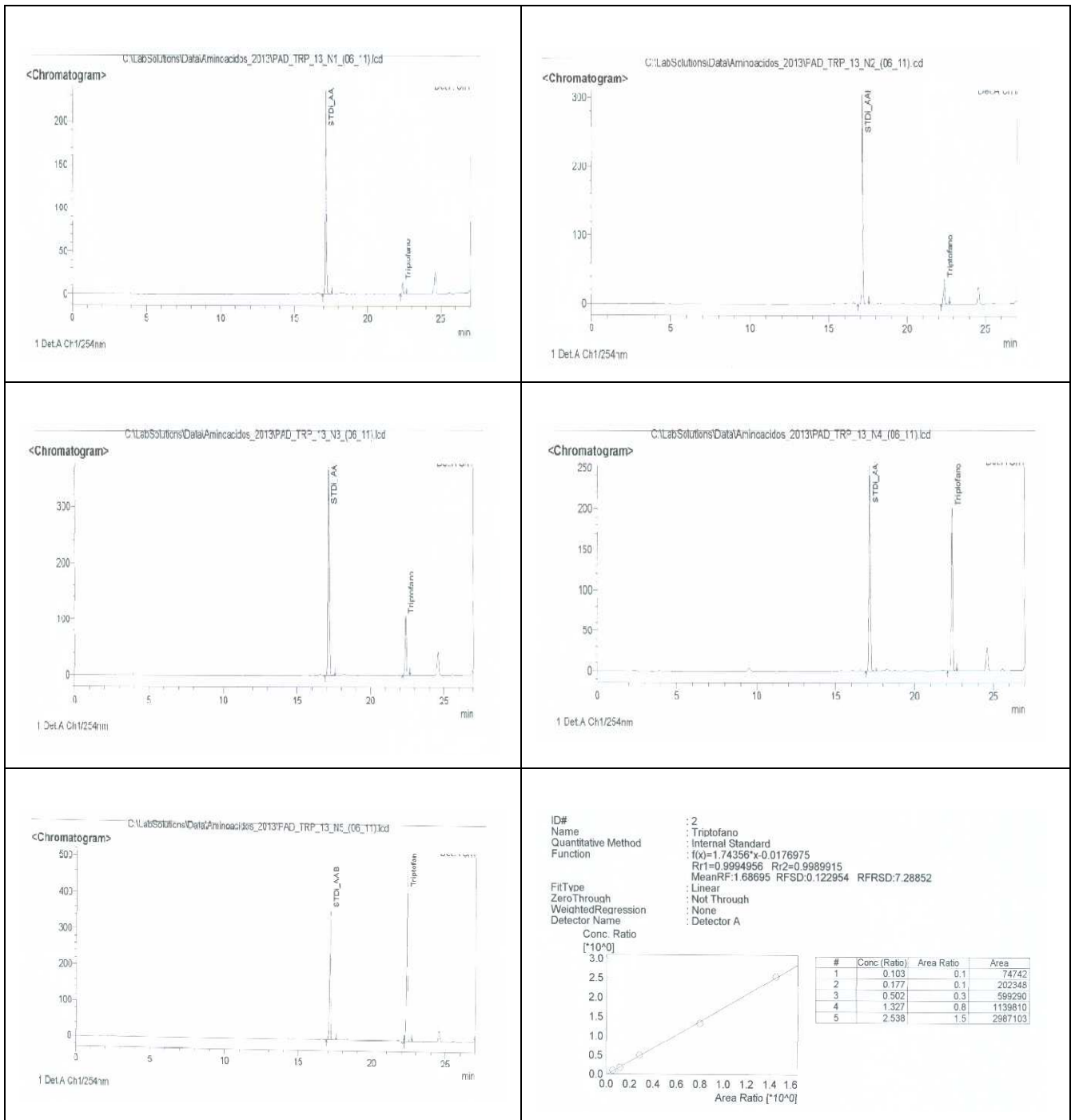
#### 3.1. Curva padrão de triptofano

Os cromatogramas dos padrões injetados foram integrados utilizando o software do computador acoplado ao equipamento, obtendo, assim, as áreas dos picos em cada concentração do aminoácido (Figuras 1, 2 e 3). Dando origem a curva de calibração (Figura 4) de triptofano, baseado na equação da reta ( $y = ax + b$ ). As concentrações dos componentes do padrão em 5 níveis foram calculadas como:  $C(\text{g}/100 \text{ mL ou } 100\text{g}) = 2,50 \times 10^{-4} \times \text{PM} \times \text{massa do padrão (g)} /$



**8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014**  
**12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo**

vol(g). O PM refere-se ao peso molecular do triptofano. A curva padrão elaborada com cinco concentrações apresentou  $R^2 = 0,9990$ . Na Figura 1 estão apresentados os cromatogramas referentes às concentrações de triptofano e a curva padrão gerada, a qual apresentou  $R^2 = 0,9990$ ; sendo, portanto este valor um indicativo da qualidade da curva analítica.



**Figura 1.** Cromatogramas das concentrações de triptofano nos cinco níveis (1, 2, 3, 4 e 5) e a curva padrão de triptofano.



### 3.2. Resultados de proteína

Tabela 1. Teor médio de proteína (g/100g de amostra) encontrado nas matrizes alimentares estudadas.

Amostras	A	B	C
Tilápia	19,71 ± 0,01 <sup>a</sup>	19,93 ± 0,43 <sup>a</sup>	19,29 ± 0,59 <sup>a</sup>
Frango	17,72 ± 0,36 <sup>a</sup>	17,84 ± 0,91 <sup>a</sup>	18,00 ± 1,70 <sup>a</sup>
Farinha de soja	35,90 ± 0,14 <sup>a</sup>	34,53 ± 1,38 <sup>a</sup>	35,75 ± 0,76 <sup>a</sup>

\*Resultados expressos como média ± desvio padrão das análises em triplicata. Médias seguidas por uma mesma letra na mesma linha não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 3.3. Resultados dos teores de triptofano encontrados nas amostras pelo método espectrofotométrico e o método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

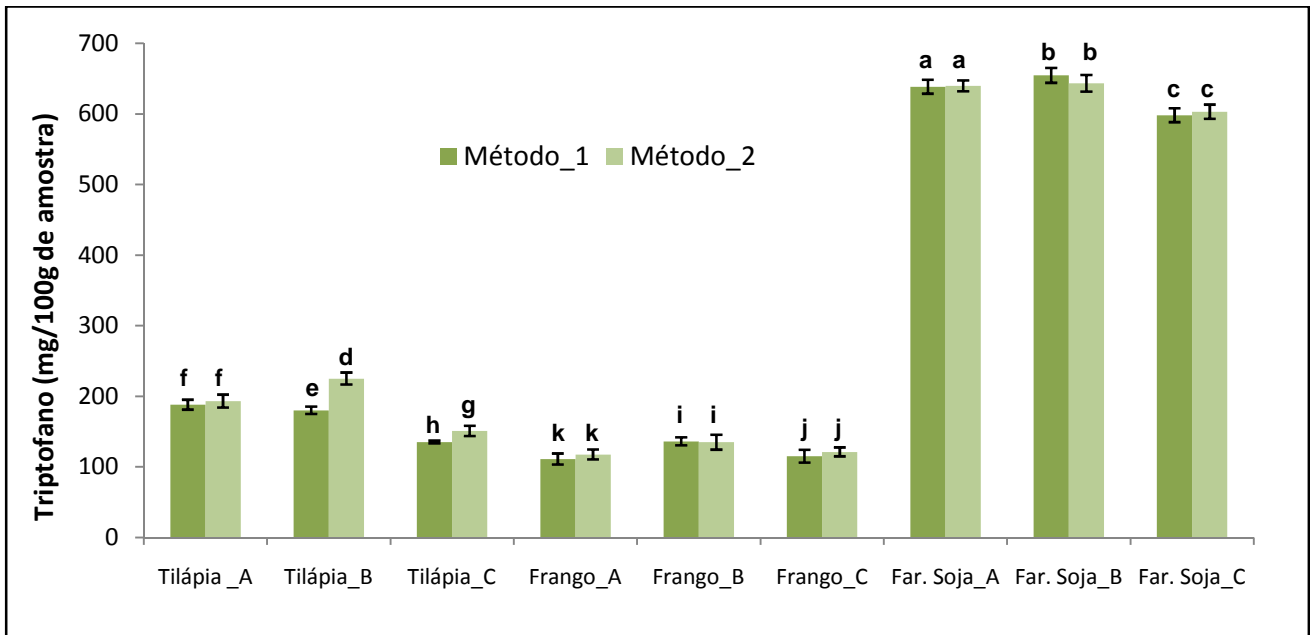
Para a análise estatística as amostras foram avaliadas individualmente, somente para efeito de comparação entre os dois métodos para a mesma amostra. Na Figura 2 estão apresentados os resultados dos teores de triptofano encontrados nas amostras: Método\_1 (hidrólise enzimática/espectrofotométrico) e Método-2 (hidrólise alcalina/CLAE) somente as amostras de tilápia B e C apresentaram diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ), embora no ensaio espectrofotométrico os valores numéricos tenham sido inferiores aos obtidos na CLAE, mas não influenciaram na resposta final, ou seja, os valores esperados para o pescado estudado. Para melhor compreensão na Tabela 2 estão relacionados alguns parâmetros importantes observados durante o estudo para efeito de comparação entre os dois métodos.

Para as matrizes alimentares utilizadas, os métodos mostraram-se eficientes, ou seja, permitiram a quantificação do triptofano presentes nas amostras, desta forma o fabricante poderá classificar seus produtos de acordo com as condições estabelecidas para as quantidades de aminoácidos essenciais do alimento, no caso o triptofano, segundo as exigências da RDC 54/12.

Tabela 2. Comparação entre os métodos estudados.

Método-1: Espectrofotométrico	Método-2: CLAE
Facilidade de execução	Técnico muito bem treinado em CLAE
Cor do extrato pode interferir na reação	Cor do extrato não interfere na reação
Insumos de médio custo	Insumos de alto custo
Fácil interpretação resultados	Difícil interpretação dos cromatogramas
Produto reação estável	Produto da reação instável*
Sem derivatização	Derivatização pré-coluna**

\*Devido a derivatização pré-coluna, os produtos da reação são muitas vezes instáveis e podem afetar os resultados de quantificação. \*\*O reagente de derivatização é misturado diretamente com a amostra e pode reagir com componentes coexistentes na matriz da amostra.



**Figura 2.** Teores triptofano (mg/100g de amostra) obtidos no Método\_1 (hidrólise enzimática/espectrofotométrico) e no Método-2 (hidrólise alcalina/CLAE). Valores médios  $\pm$  desvio padrão das análises em triplicata. As letras iguais para a mesma amostra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

A hidrólise alcalina seguida por CLAE para determinação de triptofano poderá ser utilizada como ferramenta adicional para comprovação do teor de triptofano, em casos específicos como: amostras resistentes a hidrólise, por exemplo, a queratina bruta (lã de carneiro) ou em situações onde a coloração inerente a amostra possa acarretar em resultado falso positivo. Nestes casos, o laboratório poderá utilizar as duas metodologias para efeito de comparação e garantir o resultado final, visto que atualmente tanto a hidrólise alcalina seguida por CLAE como a hidrólise enzimática seguida pela leitura no espectrofotômetro são técnicas instrumentais muito utilizadas por pesquisadores e laboratórios analíticos.

#### 4 CONCLUSÃO

Os resultados evidenciaram um bom desempenho do método de CLAE com derivatização pré-coluna em relação ao método enzimático espectrofotométrico, porém o estudo revelou parâmetros importantes que devem ser considerados para seleção do método analítico.

#### 5 AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBIC, pela bolsa concedida.

Ao CCQA – ITAL, pela oportunidade de estágio.



## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA, 2012, Resolução Regulamento Técnico sobre Informação Nutricional RDC 54/2012, **Alegações Nutricionais em Alimentos**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 18/jun./2013.

**AOAC, Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 18th ed., HORWITZ, W. (Ed.), Gaithersburg, Maryland: AOAC, 2005. Current through Revision 3, 2010.

ERSPAMER, V., ASERO, B. Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. **Nature** 169: 800-801, 1952.

FAO/WHO (2007). **Energy and protein requirements**. Report of a Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation. Geneva, World Health Organization, 2007 (WHO Technical Report Series, No. 935).

FERNSTROM, J.D.; FALLER, D.V. Neutral amino acids in brain: changes in response to food ingestion. **Journal of Neurochemistry**. 30: 1513-1538, 1978.

HAGEN, S. R.; FROST, B.; AUGUSTIN, J. Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid chromatography of aminoacids in food. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 72, n.6, n. 912-916, Nov.-Dec, 1989.

MOHAMMAD-ZADEH, L. F; MOSES, L; GWALTNEY-BRANT, S. M. Serotonin: a review. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 31, n. 3, p. 187-99, 2008.

OLDENDORF, W.H.; SZABO, J. Amino acids assignment to one of three blood-brain Barrier amino acid carriers. **American Journal of Physiology**, 230: 94-98, 1976.

PIMENTEL GOMES, F. **Curso de Estatística Experimental**. 15ªed. Piracicaba: FEALQ, 2009.

RAPPORT, M.M.; GREEN, A.A.; PAGE, I.H. Serum vasoconstrictor (serotonin). IV. Isolation and characterization. **The Journal of Biological Chemistry**, 176: 1243-1251, 1948.

SAS INSTITUTE INC. SAS Use's Guide. Cary: SAS Institute Inc, 1028p., 1983.

SPACKMAN, D. H.; STEIN, W. H.; MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. **Analytical Chemistry**, Washington, v.30, n.3, p.1190-1206, June, 1958.

SPIES, J. R. Determination of tryptophan in proteins. **Analytical Chemistry, Arlington**, v.39, p.1412-1415, 1967.

WHITE, J. A.; HART, R. J.; FLY, J. C. An evaluation of waters pico-tag system for the amino acid analysis of food materials. **Journal of Automatic Chemistry**, v. 8, p.170-177, 1988.