

AMINOÁCIDOS LIVRES DO FEIJÃO
60 DIAS (*Phaseolus vulgaris* L.)¹

José D.P. Arzolla²
Homero Fonseca³

RESUMO

Os aminoácidos livres da nova variedade de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) de 60 Dias, foram estudados por cromatografia em papel utilizando-se o seguinte par de solventes: 1) fenol-água, 8:2 (p/v); 2) butanol-ácido acético-água, 4:1:1 (v/v).

Os aminoácidos identificados e dosados nos extratos foram: ácido aspártico, ácido glutâmico, lisina, serina, asparagina, glicina, treonina, alanina, glutamina, histidina, ácido gama-aminobutírico, arginina, metionina, valina e leucina.

As determinações quantitativas foram feitas por eluição das manchas dos cromatogramas seguidas de colorimetria.

Os aminoácidos mais abundantes foram lisina, ácido glutâmico e ácido aspártico.

INTRODUÇÃO

O feijão tem sido, por muitos anos, o alimento básico para o brasileiro e outros povos latino-americanos. É consumido regularmente em todos os lares, ricos ou pobres. Ele constitui, para uma grande parte destes povos, a única fonte de proteína, bem como outros compostos essenciais ao organismo humano tais como as vitaminas B₁, B₂ e niacina, sais minerais de potássio, sódio, cálcio, magnésio, ferro, etc.

¹ Entregue para publicação em 1/12/1970.

² Professor Associado do Departamento de Química da ESALQ.

³ Professor de Disciplina do Departamento de Tecnologia Rural da ESALQ.

Muitas variedades de feijão são consumidas no Brasil. As mais populares são: mulatinho, preto, bico de ouro e rosinha. Menos importantes são: roxinho, opaco, opaquinho, chumbinho, jalo, fradinho e outros de uso mais regional como o macassa (*Vigna sinensis*) no nordeste do Brasil.

A literatura brasileira sobre o assunto é abundante de citações de autores estrangeiros, e resultados de análises de feijões exóticos. Para os feijões nacionais, a literatura existente é composta de trabalhos com análises da composição percentual de um grande número de variedades. Exemplo disto são os trabalhos de PAULA (1952) com o estudo da composição percentual de 10 variedades brasileiras, e o trabalho de BETHLEM et al (1953) que trabalhou com 50 variedades de feijão, soja e outros feijões estrangeiros.

Pouca atenção tem sido dada à determinação quantitativa dos aminoácidos livres e das proteínas dos feijões brasileiros. O trabalho de MATOS JR. (1952) sobre os aminoácidos do feijão mulatinho e do mesmo MATOS JR. (1955) com o feijão macassa são os poucos existentes na literatura.

A presente pesquisa relata as análises feitas dos aminoácidos livres de uma variedade de feijão de ciclo curto, comumente conhecida como "feijão de 60 Dias".

No início das análises, notou-se que uma apreciável quantidade de aminoácidos livres ocorria no extrato alcoólico. Determinações dos compostos nitrogenados foram feitas e encontrou-se 240 mg de nitrogênio não protéico em 100 g de material. Cromatogramas do extrato foram feitos e mostraram um grande número de aminoácidos, daí o interesse de sua determinação quantitativa.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

As amostras do feijão de 60 Dias foram fornecidas pela ex-Cadeira de Agricultura e Genética Aplicada da ESALQ. Esta é uma variedade de ciclo curto e as sementes são de cor marron clara ligeiramente arredondadas e de tamanho médio.

Métodos

Preparação do extrato

As técnicas propostas por ARZOLLA & FONSECA (1966) foram as seguintes. Amostras de 10 g de feijão finamente triturado, mais 200 ml de etanol a 70% foram colocados em Erlenmeyers de 250 ml, fechados e deixados por uma noite. Em seguida, agitados por 5 horas e então colocados em banho de água a 65°C por uma hora. A suspensão foi decantada, passada para bēquer e filtrada.

Nitrogênio não protéico

Uma alíquota do extrato foi tomada e procedeu-se à determinação do nitrogênio total presente, pelo método micro-Kjeldahl.

Purificação do extrato

Uma alíquota de 20 ml foi tomada e passada através de uma coluna de resina catiônica (Dowex 50 x 8, 100-200 "mesh") para separar os aminoácidos. Um teste com ninhidrina a 5% em etanol foi feito no efluente para certificar-se se todos aminoácidos tinham sido retidos na coluna. Em seguida, os aminoácidos foram deslocados da coluna com 20 ml de hidróxido de amônio 3 N. O eluato foi evaporado até a secura num banho de água a 65°C e o resíduo dissolvido em 2 ml de isopropanol a 10%.

Esta solução foi guardada em refrigerador a 4°C num frasco hermético.

Cromatografia

Amostras de 30-60 µl foram cromatografadas bidimensionalmente em papel de filtro Whatman nº 1, tamanho 40 x 40cm, usando-se técnica ascendente.

Os solventes usados foram: fenol-água, 8:2 (p/v) com 0,4% de 8-hidroxiquinoleína, na primeira dimensão, e butanol-ácido acético-água, 4:1:1 (v/v) na segunda dimensão.

Os cromatogramas correram o tempo suficiente para os solventes atingirem cerca de 37 cm de caminhamento, em ambas as dimensões.

Identificação dos aminoácidos

Os aminoácidos foram identificados de acordo com os seguintes critérios: 1) Comparação dos Rfs; 2) Coloração particular das manchas; 3) Reativos específicos.

Para o desenvolvimento da cor foram usados os reagentes:

- a) ninhidrina a 0,5% de etanol, adicionada de 0,01% de 8-hidroxiquinoleína;
- b) isatina a 0,25% em acetona;
- c) reagente de Folín (THOMPSON, 1959).

A maioria dos aminoácidos foi identificada pelo teste da ninhidrina. A presença de metionina foi verificada pela reação do iodeto de platina (SMITH, 1960).

Determinação quantitativa

Um colorímetro Klett-Summerson foi usado para a determinação colorimétrica quantitativa dos aminoácidos. A técnica de PORTER et al (1957) foi seguida com algumas modificações.

As manchas foram reveladas, pulverizando-se o papel com a ninhidrina. O papel foi seco ao ar e então aquecido por 30 minutos em estufa a 65°C em atmosfera saturada de vapores de etanol. As manchas foram então recortadas do papel e eluídas do papel com 6 ml de etanol tamponado ($K_2HPO_4 + NaH_2PO_4$, 0,025 M em etanol a 50%) por submersão por 8 horas em câmara fria. As soluções foram transferidas para um tubo de colorímetro e determinada sua absorvância em 540 m μ , contra um padrão de leucina que correu no mesmo cromatograma. Três brancos do papel foram tomados para eliminação da interferência do fundo.

A quantidade de cada aminoácido presente em 100 g do material foi calculada com os resultados obtidos na colorimetria.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor de nitrogênio total nos grãos foi 3,17 g. O nitrogênio não protéico (extrato alcoólico) somou 0,24 g. Constatou-se que 9 mg desta última fração era nitrogênio amoniacal.

QUADRO 1 - Conteúdo de aminoácidos do feijão 60 Dias em mg/100g

Aminoácido	Teor	Aminoácido	Teor
Lisina*	360	Arginina	45
Ácido aspártico	337	Treonina*	42
Ácido glutâmico	225	Metionina*+Valina*	30
Alanina	90	Leucina*	15
Asparagina	75	Serina	15
Histidina	67	Glutamina	15
Ácido gama amino butírico	60	Glicina	7

* Aminoácidos essenciais

O Quadro 1 mostra 15 aminoácidos que estiveram presentes em todos os cromatogramas. A exceção de metionina e valina, a separação de todos os compostos foi muito boa. A presença da metionina foi confirmada pela reação do iodeto de platina. A leucina apareceu como uma mancha redonda indicando a provável ausência de iso-leucina e nor-leucina. O espaço entre leucina e metionina + valina denota a ausência de fenilalanina.

De acordo com as quantidades presentes dos 15 aminoácidos identificados neste estudo eles podem ser grupados em: 1) Alto teor: lisina, ácido aspártico e ácido glutâmico; 2) Teor médio: alanina, asparagina, histidina e ácido gama aminobutírico; 3) Teor baixo: arginina, treonina, serina, metionina, valina, leucina, glutamina e valina.

Dos 5 aminoácidos essenciais encontrados, apenas lisina apresentou teor alto. Os altos teores observados para lisina, ácido aspártico e ácido glutâmico estão em concordância com os teores encontrados por PAULA (1952) para aqueles aminoácidos, na faseolina.

Por outro lado, foram encontrados asparagina, glutamina e ácido gama aminobutírico não citados nos trabalhos de PAULA (1952) e de BLOCK & BOLLING, de BETHLEM e de MATOS JR. , todos estes citados por MATOS JR. (1955).

Outras manchas não identificadas, de alta e baixa intensidade apareceram frequentemente em todos cromatogramas. Os Rfs. de compostos conhecidos neste par de solventes não nos

permitiram concluir pela identidade daquelas manchas.

CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou que os aminoácidos livres do feijão de 60 Dias representam uma porção de aproximadamente 7% dos compostos nitrogenados. Além disso, eles constituem-se numa fonte de aminoácidos prontamente disponível para o organismo humano.

SUMMARY

Free amino acids of the new 60 Days beans variety (*Phaseolus vulgaris* L.) were studied by two dimensional ascending paper chromatography with the following pair of solvents: 1) phenol-water, 8:2 (v/v); 2) butanol-acetic acid-water, 4:1:1 (v/v).

The amino acids identified and measured in the extracts were: aspartic acid, glutamic acid, lysine, serine, asparagine, glycine, threonine, alanine, glutamine, histidine, gama amino-butyric acid, arginine, methionine, valine and leucine.

Determinations were made by elution of the spots followed by colorimetry. The more abundant amino acids were lysine, glutamic acid and aspartic acid.

LITERATURA CITADA

- ARZOLLA, J.D.P. & H. FONSECA, 1966. Cromatografia de aminoácidos. Boletim Didático nº 14. ESALQ, USP. Piracicaba. 54 pp.
- BETHLEM, M.L.B., H.P. NEVES, F. MALOUK & M. TAVEIRA. 1953. Composição centesimal de 50 variedades de feijões existentes no Brasil. Rev. Bras. de Farm., Ano XXXIV, nº 7 pág. 260.
- MATOS JR., A.G., 1952. Análise do feijão mulatinho. Rev. Bras. de Med., IX, 6.

- MATOS JR., A.G., 1955. Aminoácidos do feijão macassa. Anais da Soc. Biol. de Pernambuco, Tomo XIII, nº 1. Recife.
- PAULA, R.D.G., 1952. Alimentos. Vol. II. Livraria Editora Casa do Estudante do Brasil, Rio de Janeiro.
- PORTER, C.A., D. MARGOLIS & P. SHARP, 1957. Quantitative determination of amino acids by paper chromatography. Contributions from Boyce Thompson Institute, 18, nº 11.
- SMITH, I., 1960. Chromatographic and Eletrophoretic Techniques. Vol. I. Chromatography. Interscience Publishers, Inc. New York, 617 pp.
- THOMPSON, J.F., 1959. The Botanical Review, Vol. 25, nº 1. New York Botanical Garden, New York.

