

Nº 05, dez/96, p.1-4

ANÁLISE DO TEOR DE PROTEÍNAS E CARBOIDRATOS EM PRODUTOS DE ORIGEM VEGETAL POR RMN DE ¹³C ¹.

Ana Carolina M. Zeri ²
Tito José Bonagamba ³
Luiz Alberto Colnago ⁴
Rubens Bernardes Filho ⁵
Edison Vidoto ⁶
Horácio Panepucci ³

Os teores de proteínas e carboidratos totais normalmente são usados na avaliação da qualidade nutricional, desde pastagens até alimentos "in natura", ou industrializados para consumo humano. Os métodos clássicos de análise dos teores de proteína (Lowry; Bradford e Kjeldahl) e açúcares (Dubois) são métodos químicos demorados, com várias etapas, que destroem as amostras e fornecem informações apenas sobre um tipo de componente.

Recentemente, foram introduzidos métodos físicos de análise, como a espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) e a espectroscopia de alta resolução em sólidos por Ressonância Magnética Nuclear (RMN), que possibilitam a obtenção de informações sobre esses componentes em um único experimento e sem destruir a amostra. Desses métodos, a espectroscopia de infravermelho próximo já está estabelecida e vem sendo usada em alguns laboratórios.

Um dos inconvenientes dessa análise é que os sinais dos vários componentes da amostra estão sobrepostos nos espectros e necessitam de procedimentos de calibração sofisticados, exigindo várias amostras com grande variação das concentrações dos produtos a serem analisados (proteína e carboidratos, por exemplo). Além disso, necessitam de algumas gramas de amostra na forma de pó ou de algumas centenas de gramas para sementes intactas.

¹ Pesquisa financiada com recursos EMBRAPA projeto 03.0.94.013, FAPESP, FINEP e CNPq.

² Físico, Bs, IFSC-USP, 1465, CP 369, CEP 13560-970, São Carlos-SP

³ Físico, Dr., IFSC-USP, 1465, CP 369, CEP 13560-970, São Carlos-SP

⁴ Farmacêutico Dr., EMBRAPA-CNPDI, CP 741, CEP 13560-970, São Carlos-SP

⁵ Físico, MSc., EMBRAPA-CNPDI, CP 741, CEP 13560-970, São Carlos-SP

⁶ Engenheiro Eletrônico, MSc., IFSC-USP, 1465, CP 369, CEP 13560-970, São Carlos- SP

PA/05, CNPDIA, dez/96, p.2

A RMN de alta resolução em estado sólido também tem sido usada para a determinação dos teores de proteínas e carboidratos de produtos de origem vegetal. No entanto, não há um estudo detalhado da capacidade de quantificação da técnica e as possíveis fontes de erros (Rutar, 1989).

Neste trabalho são apresentados resultados parciais do uso de espectroscopia de RMN de C^{13} em sólidos, na análise de proteínas e carboidratos totais em farelos de soja e milho e de algumas misturas desses produtos, usando regressão de componentes principais (PCR).

Os espectros de RMN C^{13} de alta resolução em estado sólido foram obtidos em um espectrômetro "home made" de 2 Tesla, do IFSC-USP, com a técnica CPMASS, que consiste de alta rotação das amostras em ângulo mágico, desacoplamento heteronuclear e polarização cruzada e com aproximadamente 200 mg de amostra. O tempo de contato foi 1 milissegundo e de repetição, 1,5 segundos. A lisozima foi adquirida da Sigma e o xiloglucano foi purificado pelo Professor Marcos Buckeridge, do Instituto de Botânica de São Paulo. Os farelos foram preparados a partir de grãos de soja e milho, com a extração do óleo com tetracloreto de carbono. Para a calibração e quantificação da proteínas e carboidratos totais, usaram-se técnicas de análise multivariada (Greenfield, 1996), como a regressão dos componentes principais (PCR). O programa foi escrito com o software matemático MATLAB, usando-se a decomposição de valor singular e os espectros de lisozima e xiloglucano para a obtenção da matriz de calibração (Colnago et al, 1996).

Os espectros de RMN de C^{13} da lisozima, xiloglucano e farelos de soja e milho estão na figura 1A a D. Na RMN de C^{13} os sinais refletem o ambiente químico em que os átomos de carbono estão sujeitos nas moléculas (Tabela 1) e são expressos em partes por milhão (ppm) da frequência de ressonância. Dessa maneira, os carbonos dos polissacarídeos, que normalmente estão ligados a um ou dois átomos de oxigênio, apresentam absorção na região entre 50 e 105 partes por milhão (ppm) da frequência de ressonância. Esses sinais podem ser observados no espectro do xiloglucano puro (figura 1C). As proteínas contêm carbonos alifáticos, que absorvem de 10 a 60 ppm, carbonos aromáticos, que absorvem de 106 a 165 ppm e carboxilas, que absorvem entre 170 a 190 ppm. Esses sinais podem ser observados no espectro da lisozima (figura 1A).

Tabela 1. Grupos funcionais de polissacarídeos e proteínas e seus deslocamentos químicos.

Grupos funcionais e componente de origem	Deslocamento químico em ppm
Carbono alifático das proteínas	10 a 60
Carbono hidroxilado dos polissacarídeos	50 a 80
Carbono dihidroxilado dos polissacarídeos	100 a 105
Carbono aromático das proteínas	105 a 165
Carbono carboxílico das proteínas	170 a 190

Como se pode ver nessa tabela e figura 1, os sinais das proteínas têm pouca sobreposição com os dos polissacarídeos e são usados na quantificação desses constituintes.

PA/05, CNPDIA, dez/96, p.3

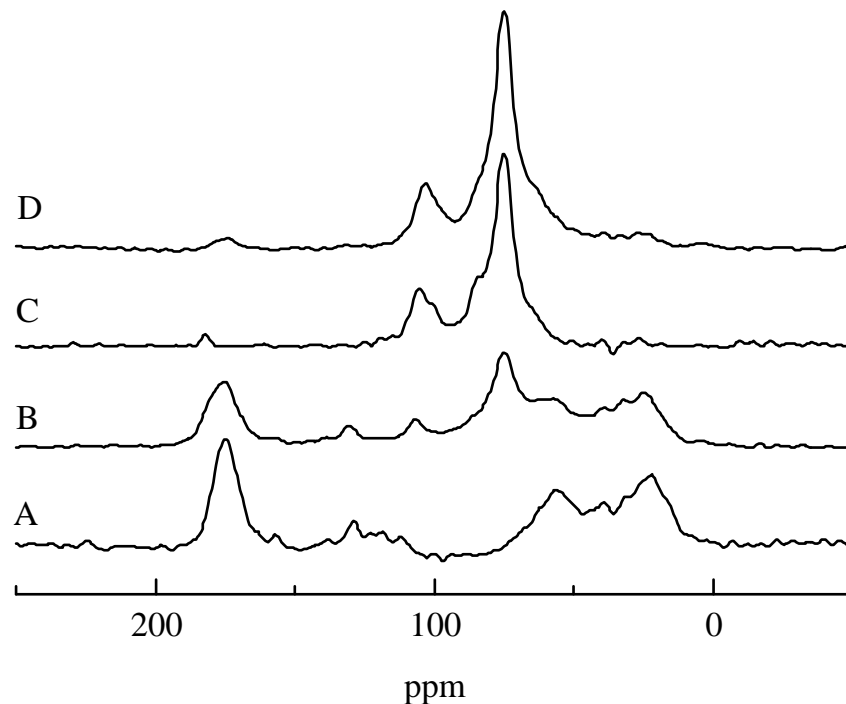


Figura 1. Espectros de RMN de ^{13}C de lisoizima (A), farelo de soja (B), xiloglucano (C) e farelo de milho(D).

Nos espectros dos farelos de milho (figura 1D) e soja (figura 1B), pode-se ver que o do milho mostra grande intensidade nos picos relativos aos carboidratos e pequena intensidade de sinal nas regiões relacionadas aos carbonos de proteínas, enquanto que o espectro da soja apresenta sinais em todas as regiões mencionadas. O farelo de milho contém cerca de 10% de proteínas e aproximadamente 85% de carboidratos, enquanto que o de soja em torno de 60% de proteínas e 35% de açúcares totais.

Para a quantificação desses constituintes a partir dos espectros de RMN, normalmente obtêm-se curvas de calibração entre as áreas de um ou mais sinais relativos a um determinado constituinte (por exemplo, proteína e carboidratos) e a sua concentração correspondente em amostras padrões. Com essas curvas de calibração, obtêm-se a concentração dos constituintes em amostra desconhecida a partir das áreas dos sinais do seu espectro.

Esses procedimentos são demorados, pois os cálculos das áreas não são triviais por envolverem o ajuste "fitting" dos sinais por funções do tipo lorentziana, gaussiana etc. Com a disponibilidade cada vez maior de recursos computacionais, as técnicas de regressão multivariada, como o PCR, podem quantificar os componentes de uma amostra de maneira automática. O PCR precisa apenas da inserção dos espectros de amostras padrões para a obtenção de uma matriz de calibração. Neste caso, foram usados os espectros da proteína (lisoizima, Figura 1A) e do polissacarídeo (xiloglucano, Figura 1C). Essa técnica dispensa a interpretação do espectro, o cálculo das áreas ou qualquer outra operação pelo usuário, que somente deve inserir os dados normalizados do espectro da amostra desconhecida para que o software calcule automaticamente as concentrações.

PA/05, CNPDIA, dez/96, p.4

As concentrações de proteínas e carboidratos calculadas a partir dos espectros de RMN, pelo programa de regressão multivariada, foram de 65% de proteínas e 33% de carboidratos para soja e 11% de proteínas e 86% de carboidratos para o farelo de milho.

Esses resultados demonstram a potencialidade da técnica de RMN em estado sólido como uma ferramenta muito útil para o estudo de materiais biológicos e alimentos, pois fornece informações sobre os carboidratos e proteínas e outros constituintes das amostras em único experimento, não destrói a amostra e pode ser usada na determinação dos constituintes em sementes intactas, ou seja, as sementes continuam viáveis após a análise. Essa técnica já está sendo usada para a determinação do teor de proteínas e carboidratos em alimentos "in natura" e industrializados, em plantas transgênicas e outros produtos de origem agropecuária, como fibras vegetais. Os resultados também demonstram a potencialidade e a simplicidade de se usar o PCR na quantificação de produtos químicos a partir de dados espectrais.

Referências bibliográficas

COLNAGO, L.A.; MARTIN-NETO, L.; BISCEGLI, C.I.; NASCIMENTO, O.R.; BONAGAMBA, T.J.; PANEPUCCI, H.; VIEIRA, E.M.; SEIDEL, P.R.; SPOSITO, G.; OPELLA, S.J. Aplicações da ressonância magnética nuclear (RMN) e ressonância paramagnética eletrônica (EPR). In: CRESTANA, S.; CRUVINEL, P.E.; MASCARENHAS, S.; BISCEGLI, C.I.; MARTIN-NETO, L.; COLNAGO, L.A., ed. **Instrumentação agropecuária: contribuições no limiar do novo século**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1996. Cap.1, p.15-50.

GREENFIELD, N.J. Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data. **Analytical Biochemistry**, New York, v.235, n.1, p.1-10, 1996.

RUTAR, V. NMR studies of intact seeds. In: PFEFFER, P.E.; GERASIMOWICZ, W.V. **Nuclear magnetic resonance in agriculture**. Boca Raton: CRC, 1989. Cap.4, p.101-112.