

AMINOÁCIDOS LIVRES EM CAMARÕES — VARIÇÕES DECORRIDAS DURANTE A DECOMPOSIÇÃO (*)

POR

MARIA ELISA WOHLERS DE ALMEIDA

Químico do Instituto Adolfo Lutz

O estudo dos aminoácidos tem sofrido nos últimos anos um grande desenvolvimento, graças à técnica cromatográfica, tanto em coluna como em papel de filtro.

São relativamente limitados os estudos realizados sobre aminoácidos em camarões e todos efetuados com o auxílio de métodos microbiológicos.

No decurso do presente estudo foi aplicada a cromatografia em papel de filtro para a pesquisa de aminoácidos livres em camarões e para a verificação de sua variação durante o período de decomposição.

PARTE EXPERIMENTAL

Os camarões usados na experiência foram fornecidos pelo Museu de Pesca de Santos e pertenciam à espécie *Penaeus (Xiphopenaeus) kroyeri* (camarão 7 barbas).

Os camarões recém-pescados foram transportados até o laboratório em água do mar, de maneira que pudemos iniciar as experiências com material vivo. Os camarões foram lavados ligeiramente em água destilada para a remoção de areia e água salgada e em seguida, divididos em 2 lotes.

O 1.º lote foi conservado na temperatura ambiente (17 a 27°C) e as amostras foram analisadas de 6 em 6 horas.

(*) Trabalho apresentado ao III Congresso Farmacêutico e Bioquímico Pan-americano realizado em São Paulo, Dezembro de 1954.

Entregue para publicação em 18-3-1955.

O 2.º lote foi conservado em refrigerador a 4°C e as amostras analisadas de 24 em 24 horas, sendo que neste lote o camarão foi estudado em 2 modalidades: integral e parte comestível. Consideramos parte comestível o corpo do camarão depois de retirados a cabeça, casca e apêndices.

MÉTODOS

Os aminoácidos livres foram extraídos segundo a técnica de AWAPARA com algumas modificações por nós introduzidas.

O processo de extração, em linhas gerais, é o seguinte: A amostra é triturada em um gral com areia (2 vezes o seu peso) e extraída com álcool etílico a 85%. Filtra-se e o filtrado é recolhido em balão volumétrico de capacidade necessária para se obter uma concentração de 10% do material. Uma alíquota do filtrado é tratada com 3 vezes o seu volume de clorofórmio. Com êsse tratamento, os aminoácidos passam para a camada superior aquosa, separada da mistura álcool-clorofórmio. Retira-se a camada aquosa e centrifuga-se. Êste extrato aquoso é usado para a cromatografia dos aminoácidos.

Efetuamos uma série de cromatografias em uma e duas dimensões, segundo a técnica original de CONSDEM e colab., usando papel de filtro Whatman n.º1.

Empregamos 0,02 e 0,04 ml do extrato aquoso para a cromatografia mono e bidimensional, respectivamente.

Os solventes empregados foram os seguintes:

Para a cromatografia em uma dimensão:

- 1.º — n-Butanol-ácido acético-água (4 + 1 + 5)
- 2.º — Fenol saturado de água (NH₃ a 3%)
- 3.º — Alcool isoamílico terc. em presença de vapores de dietilamina.

Para a cromatografia em duas dimensões:

- 1.º — n-Butanol-ácido acético-água (4 + 1 + 5)
- 2.º — Fenol saturado de água (NH₃ a 3%)

Os aminoácidos, revelados com ninidrina, foram localizados nos cromatogramas pela posição relativa de suas manchas, já que

o valor R_f absoluto depende de condições padrões. A identidade de todos os aminoácidos foi confirmada com o auxílio de testemunhos internos e externos.

Foram também empregues reações específicas para a identificação de alguns aminoácidos.

Reações específicas:

Arginina — Identificamos arginina por meio da reação de Sagakuchi segundo modificação de ACHER e CROCKER. Esta prova é de grande utilidade, pois além de específica pode ser efetuada no cromatograma depois de revelado com ninidrina.

Histidina — Usamos para a identificação da histidina o reativo de Pauly, preparado segundo BLOCK.

Prolina — A quantidade de prolina existente nas amostras mais recentes era de grandeza tal, que foi identificada pela coloração amarela com o reagente ninidrina. Já nas amostras com maior tempo de conservação, usamos uma solução de isatina a 0,2% em butanol normal contendo 4% de ácido acético conforme a técnica de ACHER, FROMAGEOT e JUTISH, sendo a prolina identificada pela sua coloração azul.

Tirosina — A mancha revelada pela ninidrina e correspondente à tirosina apresentou-se com intensidade muito fraca e quase confundida com uma mancha localizada acima. Assim, foi identificada com o reagente α -nitroso-6-naftol, segundo a técnica de ACHER e CROCKER. A presença de tirosina também foi confirmada pelo reagente de Pauly.

Leucinas, valina-metionina — Leucina e isoleucina formam uma única mancha com a maioria dos solventes, o mesmo se dando com valina e metionina. Para verificar a existência da isoleucina ao lado da leucina e também de metionina junto à valina, empregamos a técnica indicada por WORK. O solvente usado foi álcool amílico terciário-água, em presença de vapores de dietilamina, cromatografia descendente, por 4 dias.

RESULTADOS

Os resultados gerais dos aminoácidos livres encontrados estão anotados nas tabelas 1, 2 e 3.

Na tabela n.º 1 reunimos os aminoácidos encontrados nas amostras analisadas com 0 horas, isto é, imediatamente *post-mortem*.

TABELA N.º 1
AMINOÁCIDOS LIVRES EM CAMARÕES

	<i>Imediatamente post-mortem</i>	
	<i>Camarão integral</i>	<i>Parte comestível</i>
Lisina	+	tr
Histidina	+	tr
Asparagina	++	+
Arginina	++	+
Ac. aspártico	tr	—
Serina	+++	+++
Glicina	++++	+++
Treonina	tr	—
Ac. glutâmico	++	++
Alanina	+++	++
Prolina	+++	++++
Valina	+	tr
Fenilalanina	tr	—
Leucina	+	tr
Isoleucina	+	tr

tr = traços

tr → +++++: quantidades crescentes relacionadas ao tamanho e intensidade das manchas.

Na tabela n.º 2 reunimos os resultados obtidos com as amostras conservadas à temperatura ambiente e analisadas de 6 em 6 horas.

TABELA N.º 2

VARIAÇÃO DOS AMINOÁCIDOS DURANTE A DECOMPOSIÇÃO A TEMPERATURA AMBIENTE

Camarão integral						
Horas	0	6	12	18	24	30
Lisina.....	+	++	++	+++	++++	+++++
Histidina.....	+	++	++	++	+++	+++
Asparagina.....	++	++	++	++	++	++
Arginina.....	++	++	++	++	++	++
Ac. aspártico.....	tr	+	+	++	++	++
Serina.....	+++	+++	++	++	+	+
Glicina.....	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Treonina.....	tr	+	+	+	++	++
Ac. glutâmico.....	++	+++	++++	++++	++++	++++
Alanina.....	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Prolina.....	+++	+++	++	++	+	+
Ac. α - aminobutírico.	—	tr	+	+	++	++
Tirosina.....	—	tr	+	+	++	++
Valina.....	+	++	++	+++	++++	++++
Metionina.....	—	—	—	—	—	+
Fenilalanina.....	tr	+	+	++	++	+++
Leucina.....	+	++	+++	+++	++++	++++
Isoleucina.....	+	+	—	—	—	+++
Norleucina.....	—	—	—	—	—	+

Na tabela n.º 3 reunimos os resultados obtidos com as amostras de camarão integral e somente da parte comestível, conservadas em refrigerador a 4.º C e analisadas de 24 em 24 horas.

TABELA N.º 3
 VARIAÇÃO DOS AMINOÁCIDOS LIVRES DURANTE A
 DECOMPOSIÇÃO A 4.ºC.

HORAS	CAMARÃO INTEGRAL						PARTE COMESTÍVEL					
	0	24	48	72	96	120	0	24	48	72	96	120
Lisina.....	+	+	++	+++	+++	++++	tr	+	+	++	++	++
Histidina.....	+	+	++	++	+++	+++	tr	+	+	++	++	++
Asparagina.....	++	++	++	++	++	++	+	++	++	++	++	++
Arginina.....	++	++	++	++	++	++	+	+	++	++	++	++
Ac. aspártico.....	tr	+	+	+	++	++	-	+	+	+	+	++
Serina.....	+++	+++	+++	++	++	+	+++	+++	+++	++	++	++
Glicina.....	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++++	++++	++++	++++	++++
Treonina.....	tr	+	+	+	++	++	-	tr	+	+	++	++
Ac. glutâmico.....	++	+++	+++	+++	++++	++++	++	+++	+++	+++	++++	++++
Alanina.....	+++	+++	+++	+++	++++	++++	++	+++	+++	+++	++++	++++
Prolina.....	+++	+++	+++	++	++	+	++++	+++	++	++	+	+
Ac. α-aminobutírico.....	-	+	+	+	++	++	-	-	tr	+	+	++
Tirosina.....	-	+	+	++	++	++	-	-	tr	+	+	++
Valina.....	+	+	++	+++	+++	++++	tr	+	+	++	++	+++
Fenilalanina.....	tr	+	++	++	+++	+++	-	tr	+	++	++	+++
Leucina.....	+	++	++	+++	++++	++++	tr	+	+	++	+++	+++
Isoleucina.....	+						tr					

DISCUSSÃO

Nos camarões analisados imediatamente *post-mortem* identificamos lisina, histidina, asparagina, arginina, ácido aspártico, serina, glicina, treonina, ácido glutâmico, alanina, prolina, valina, fenilalanina, leucina e isoleucina. Na parte comestível (foram retirados cabeça, casca e apêndices do camarão, tendo sido conservado o tubo digestivo) encontramos os aminoácidos acima citados, menos ácido aspártico, treonina e fenilalanina.

Considerando as amostras conservadas em temperatura ambiente, observamos que lisina, histidina, valina, fenilalanina, leucina e isoleucina, que existem em muito pequena quantidade na amostra recente, poderíamos dizer na própria amostra viva, aumentam consideravelmente no decorrer da decomposição.

O aumento verificado com ácido glutâmico e alanina também é grande, porém êstes já existiam em quantidade apreciável na amostra recente, ao contrário dos aminoácidos acima citados (lisina, histidina, valina, fenilalanina, leucina e isoleucina) que, para poderem ser identificados nos cromatogramas, houve necessidade de se triplicar o volume da solução usada.

Quanto ao ácido aspártico e treonina, existentes no início em muito pequena quantidade, apresentam também pequeno aumento no decorrer da decomposição.

Ao contrário dêstes aminoácidos, cuja quantidade aumenta com a decomposição, encontramos prolina e serina que diminuem com o progredir da deterioração. O teor de prolina existente nas amostras recentes é de grandeza tal que obtemos com o revelador ninidrina uma mancha amarela bem forte, ao passo que nas amostras já em adiantado estado de decomposição, necessitamos empregar solução de isatina para poder identificar a prolina. Quanto à glicina, arginina e asparagina não observamos variação quantitativa apreciável durante o período de experiência, sendo que a primeira foi encontrada sempre em grande quantidade e as duas últimas em teor menor.

Quanto aos aminácidos, não encontrados na fase inicial da experiência e depois identificados no decorrer da decomposição, assinalamos tirosina e ácido α aminobutírico. Êstes aminoácidos aparecem em quantidade muito pequena na amostra analisada após 6 horas *post-mortem* e aumentam em pequena escala até o final da decomposição.

Encontramos, também, na fase final de deterioração, norleucina ao lado de leucina e isoleucina. Também foi identificada uma quantidade diminuta de metionina que conseguimos separar de uma grande quantidade de valina.

Assinalamos, ainda, em alguns cromatogramas, usando fenol como solvente, uma mancha logo acima de ácido aspártico. Não sabemos se o aparecimento de tal mancha é devido à presença de alguma substância positiva à ninidrina ou ao fato de o ácido aspártico se desdobrar em duas manchas distintas, fenômeno este já referido por DENT. Também com o ácido aspártico padrão usado na experiência, obtivemos idêntico desdobramento das manchas.

Na consulta bibliográfica ao nosso alcance, encontramos referência a aminoácidos em camarões em BAERNSTEIN e em HESS que dosam aminoácidos contendo enxôfre.

KUTSCHER e ACKERMAN, numa revisão da bioquímica de vertebrados e invertebrados, citam a presença de glicina, tirosina e leucina. Também POTTINGER refere o teor de arginina, histidina e lisina nestes crustáceos.

BEACH e col. determinam a porcentagem de 10 aminoácidos em camarões. Dentre os 10 aminoácidos determinados BEACH inclui cistina e triptofano, aminoácidos estes que não foram encontrados no presente estudo. Não localizamos, nos cromatogramas revelados com solução de ninidrina, a mancha correspondente a triptofano. Entretanto, deveríamos ter encontrado este aminoácido, pois dele deriva o indol, que é comumente encontrado nos camarões, servindo até como índice de sua decomposição.

Provavelmente o processo de extração usado ou decompõe o triptofano, ou não permite a sua extração. Nem mesmo trabalhando em concentrações maiores e empregando reagente mais sensível como p-dimetil-aminobenzaldeído, não foi identificado o triptofano. Também não encontramos, nos cromatogramas, manchas com fluorescência sob a luz ultravioleta, o que também é característico do triptofano.

As variações ocorridas durante a conservação de produtos da pesca têm sido objeto de muitas investigações. Entretanto, segundo vários autores, entre eles FIEGER e TARR, nenhuma prova completamente satisfatória foi ainda encontrada, não havendo, mesmo, muita concordância sobre o seu real valor, entre os próprios pesquisadores.

Embora a finalidade do presente trabalho não tenha sido a pesquisa de uma prova que indique o grau de deterioração de camarões, talvez os seus resultados forneçam indicações úteis a pesquisas futuras nesse setor.

A ausência de alguns aminoácidos no início da decomposição, o seu aparecimento no decorrer da deterioração ou ainda o grande aumento de outros aminoácidos como lisina, histidina, fenilalanina e valina, talvez permitam estabelecer-se um novo índice de deterioração.

Sendo a tirosina um aminoácido de identificação relativamente fácil, pois possui reações específicas, e considerando o fato de não a termos encontrado no camarão examinado imediatamente *post-mortem* mas só durante a decomposição, talvez seja viável o estabelecimento de uma prova de decomposição baseada na presença e doseamento da tirosina, dependendo de estudos ulteriores.

RESUMO

A cromatografia em papel de filtro foi usada para a pesquisa de aminoácidos livres em camarões.

Nos camarões analisados, imediatamente *post-mortem*, foram identificados os seguintes aminoácidos: lisina, histidina, asparagina, arginina, ácido aspártico, serina, glicina, treonina, ácido glutâmico, alanina, prolina, valina, fenilalanina, leucina e isoleucina. Na parte comestível (retirados cabeça, casca e apêndices e conservado o tubo digestivo), efetuada a análise também imediatamente *post-mortem*, encontramos os aminoácidos acima citados menos ácido aspártico, treonina e fenilalanina.

A quantidade de lisina, histidina, ácido glutâmico, alanina, valina, fenilalanina e leucina aumenta muito durante a deterioração, enquanto que a quantidade de prolina diminui consideravelmente.

No decorrer da decomposição identificamos, a mais, tirosina, ácido α -aminobutírico, metionina e norleucina.

São os seguintes os aminoácidos encontrados no presente estudo e não assinalados por outros autores: asparagina, ácido aspártico, ácido glutâmico, alanina, prolina, ácido α -aminobutírico, valina, isoleucina e norleucina.

SUMMARY

Paper chromatography has been applied to the research of free amino acids in shrimps.

The presence of lysine, histidine, asparagine, arginine, aspartic acid, serine, glycine, threonine, glutamic acid, alanine, proline, valine, phenylalanine, leucine and isoleucine has been observed in shrimps analysed immediately *post-mortem*.

These same amino acids, except aspartic acid, threonine and phenylalanine, were found in the edible portion of shrimps (head, shell and appendages were taken off, but the digestive tube was maintained).

The content of lysine, histidine, glutamic acid, alanine, valine, phenylalanine, leucine and isoleucine increases very much during the deterioration whereas proline decreases considerably.

In addition, during the spoilage, we identified tyrosine, α -aminobutyric acid, methionine and norleucine.

In the present paper, the amino acids not mentioned by other authors are the following: asparagine, aspartic acid, glutamic acid, alanine, proline, α -aminobutyric acid, valine, isoleucine and norleucine.

AGRADECIMENTO

Somos gratos ao Dr. Joaquim de Moraes, Diretor do Museu de Pesca de Santos, pela sua valiosa colaboração na obtenção dos camarões recém-pescados.

BIBLIOGRAFIA

- ACHER, R. e CROCKER, C. — 1952 — *Biochem. Biophys. Acta*: 9: 704-705.
ACHER, R., FROMAGEOT C., e JUTISH, M. — 1950 — *Biochim. et Biophys. Acta* 5: 81.
AWAPARA, J. — 1948 — *Arch. Biochem.* 19: 172-173.
BAERNSTEIN, H. D. — 1932 — *J. Biol. Chem.* 97: 669-674.
BEACH, E. F., MUNK, B. e ROBINSON, A. — 1943 — *J. Biol. Chem.* 148: 431-439.
BLOCK, R. — 1952 — *Paper Chromatography* — Academic Press, Inc. New York — pag. 64.
CONSDEN, R., GORDON, A. H., MARTIN, A. P. J. — 1955 — *Biochem.* 38: 224.
DENT, C. E. — 1948 — *Biochem. J.* 43: 169-180.
FIEGER, E. A. e FRILLOUX, J. J. — 1954 — *Food Technology* 8: 35-38.
HESS, W. C. — 1933 — *J. Biol. Chem.* 103: 449-453.
KUTSCHER, F. e ACKERMANN, D. — 1936 — *Annual Review of Biochemistry* 5: 453-462.
POTTINGER, S. R. e BALDWIN, W. H. — 1939 — *Proc. Sixth Pacific Sci. Congr.*, 453-459. Citado por BLOCK, R. J. e BOLLING, D. — 1943 — *In The amino acid composition of proteins and foods* — Springfield, III — Charles C. Thomas, pag. 73.
TARR, H. L. A. — 1954 — *Bacteriological Reviews* 18: 1-15.
WORK, E. — 1949 — *Biochim. et Biophys. Acta*, 3: 400-411.