

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

Determinação das poliaminas da
clara do ovo e sua participação
na reação de Maillard.

Marialice Pinto Coelho Silvestre
Farmacêutica-Bioquímica .

Orientador:

Prof. Dr. Jaime Amaya Farfan

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos
e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas para ob-
tenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

- 1979 -

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Aos meus pais, irmãos e ao Milton,
pelo grande apoio e incentivo que me
deram para a realização deste traba-
lho.

Registramos nossos agradecimentos penhorados:

Ao Prof. Dr. Jaime Amaya Farfan, pela paciente e dedicada orientação deste trabalho.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do seu Diretor, Prof. Dr. André Tosello.

Ao pessoal administrativo e técnico da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas, em especial ao Prof. Dr. Fumio Yokoya pela boa vontade e orientação na vida acadêmica.

Ao pessoal administrativo e técnico do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, em especial aos Profs. Drs. Ênio Cardillo Vieira e Tasso Moraes e Santos pela cessão dos laboratórios sob sua responsabilidade e pela orientação nas técnicas experimentais.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Basso da Escola Superior de Agronomia de Piracicaba da Universidade de São Paulo, pelas valiosas informações técnicas.

À Fazenda Nova Granja de Vespasiano, Minas Gerais, pela cessão dos ovos de galinha utilizados no presente trabalho.

ÍNDICE

	Página
RESUMO -----	i
SUMMARY-----	iii
INTRODUÇÃO-----	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA-----	3
Composição da clara do ovo de galinha-----	3
Carboidratos-----	3
Proteínas-----	
Conalbumina-----	3
Ovomucóide-----	7
Lisozima-----	7
Ovalbumina-----	7
As poliaminas naturais-----	12
Ocorrência-----	12
Biossíntese-----	14
Função biológica-----	17
Interação entre poliaminas e ácidos nucleicos---	17
Poliaminas e síntese dos ácidos nucleicos-----	18
Efeito das poliaminas na síntese de proteínas---	19
Efeito das poliaminas no metabolismo de	
carboidratos-----	20
Poliaminas como fatores de crescimento-----	20
Interação de proteínas com açúcares redutores:	
reação de Maillard-----	21
A química da reação de Maillard-----	21
Efeito da reação de Maillard, sob condições bran-	
das, na qualidade nutricional da proteína-----	22
MATERIAL E MÉTODOS-----	27
Material-----	27
Métodos-----	27

	Página
Extração das poliaminas-----	27
Reação das poliaminas extraídas da clara do ovo com o cloreto de dansilo (dansilação das poliaminas)-----	28
Cromatografia de camada fina e determinação fluorimétrica dos derivados dansilados das poliaminas-----	28
Testes de separação da amônia-----	29
Cromatografia em papel-----	29
Cromatografia em Bio-Gel-----	30
Acerto do pH-----	31
Acerto do tempo de reação-----	31
Acerto do volume de amostra para dansilar-----	31
Escolha do solvente para a cromatografia de camada fina-----	31
Preparo da reação de Maillard-----	32
Sistema albumina do ovo/glicose-----	32
Sistema poliamina pura/glicose-----	32
Determinação de proteína-----	35
RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	36
Quantificação das poliaminas-----	36
Participação das poliaminas na reação de Maillard---	38
Teor de proteína da fração albumina-----	47
CONCLUSÕES-----	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	50

RESUMO

A rápida diminuição do valor nutritivo da ovalbumina, durante o armazenamento com a glicose, aparentemente, não pode ser explicado pela simples perda de lisina ou pelas perdas da solubilidade e de gestibilidade da proteína através da reação de Maillard. Se, além dos grupos α e ϵ amino dos aminoácidos da proteína, estivessem presentes na clara do ovo outras aminas primárias que também pudessem participar da reação, seria interessante determinar o conteúdo de poliaminas da albumina do ovo e verificar como estes compostos poderiam ser afetados nos estágios iniciais da reação.

A albumina do ovo de galinha foi dialisada, liofilizada e armazenada com glicose (proteína/hexose 3:2 p/p) a 37°C e 68% de umidade relativa por períodos de 0, 5, 10, 20 e 30 dias, como nos trabalhos anteriores. Ao fim de cada período, as misturas foram dialisadas, liofilizadas, hidrolisadas em HCl 6N e as poliaminas foram extraídas em n-butanol. O solvente foi eliminado em evaporador rotativo, o resíduo foi redissolvido em HCl mM e dansilado, de acordo com a nossa modificação dos procedimentos padrões, para a determinação quantitativa das poliaminas após cromatografia de camada fina.

As principais poliaminas encontradas na albumina do ovo, fresca, dialisada, foram ($\mu\text{g/g}$ albumina seca) espermidina 27,1, espermina 13,9 e putrescina 11,6. O armazenamento da proteína com a glicose diminuiu as quantidades recuperáveis das três poliaminas para 13,7, 8,7 e 6,6 μg , respectivamente, ao fim de 5 dias e para 3,2, 1,4 e 2,1, ao fim de 30 dias. A putrescina (base livre), quando armazenada sob condições idênticas, mostrou maior velocidade de desaparecimento do que a observada para a putrescina presente na albumina do ovo, sugerindo,

assim, que a poliamina no estado combinado poderia ser menos reativa do que na forma livre.

Apesar das pequenas quantidades absolutas de poliaminas na albumina do ovo dialisada, foi observada ^{uma} relação mais próxima entre a perda total de poliaminas e a diminuição do valor nutritivo da proteína do que entre esta diminuição e a perda de lisina disponível, como mostrado por outros autores.

SUMMARY

The rapid loss of nutritive value of egg albumin during storage with glucose apparently cannot be explained by the simple loss of lysine or the loss of solubility and digestibility of the protein through the Maillard reaction. Since primary amines other than the α and ϵ -amino groups of the protein amino acids, if present in egg white, could also react, it was of interest to determine the polyamine content of egg albumin and how these compounds could be affected in the early stages of the reaction.

Hen egg albumin was dialyzed, lyophilized and stored with glucose (protein/hexose 3:2 w/w) at 37°C and 68% RH for periods of 0, 5, 10, 20 and 30 days as done in previous experiments. At the end of each period, the mixtures were dialyzed, lyophilized, hydrolyzed in 6N HCl and the polyamines extracted in n-butanol. The solvent was eliminated in a rotary evaporator, the residue redissolved in mM HCl and dansylated by our own modification of standard procedures for the quantitative determination of polyamines after thin-layer chromatography.

The main polyamines found in the dialyzed, fresh egg albumin were ($\mu\text{g/g}$ dry albumin) spermidine 27.1, spermine 13.9 and putrescine 11.6. Storing the protein with glucose lowered the recoverable amounts of the three polyamines to 13.7, 8.7 and 6.6 μg respectively at the end of five days, and to 3.2, 1.4 and 2.1 at the end of thirty days. Putrescine (free base), when stored with glucose under identical conditions, showed a higher rate of disappearance to that observed in the egg albumin; thereby suggesting that the polyamine in the bound state could be less reactive than in the free form.

Despite the small absolute amounts of polyamines in the dialyzed egg albumin, a closer relationship was observed between the total loss of polyamines and the loss of nutritive value than between the latter and the loss of available lysine as shown by others authors.

INTRODUÇÃO

A pesquisa sobre as poliaminas expande-se rapidamente e numerosas observações indicam que estes compostos, com toda a probabilidade, exercem funções essenciais no metabolismo celular, embora o mecanismo de suas ações não esteja completamente esclarecido.

Nosso interesse no estudo das poliaminas está indiretamente relacionado com a perda do valor nutritivo das proteínas durante a reação de Maillard, mesmo quando realizada em condições brandas. Para efeito do presente trabalho, consideramos como condições brandas temperaturas inferiores a 45°C e tempos não superiores a dois meses.

Segundo Tanaka et al. (1974), o valor biológico da ovalbumina pode diminuir até 50% em apenas 10 dias de armazenamento com a glicose, à temperatura de 37°C e 68% de umidade relativa. Entretanto, Amaya-F. (1974) mostrou que a perda de lisina, nestas condições, é muito pequena para justificar a grande queda do valor nutritivo, sugerindo que, talvez, existam na clara do ovo outros compostos aminados capazes de reagir com a glicose e cuja perda tenha efeito negativo no valor biológico da clara do ovo. Esta hipótese foi consistente com o acúmulo de compostos glicosilamino, nas fezes de ratos, de origem claramente não aminoacídica com pesos moleculares entre 800 e 1300 daltons.

Em outra série de experiências com ratos, Sgarbieri et al. (1973) suplementaram, com aminoácidos essenciais, a ovalbumina reagida em condições idênticas mas o valor nutricional da mesma não atingiu o original.

Essas observações sugeriram o estudo de componentes aminados não proteicos ligados fracamente à proteína, tais como as poliaminas, que poderiam reagir com a glicose, irreversivelmente.

velmente, tornando-se biologicamente indisponíveis no estágio inicial da reação.

Os objetivos deste trabalho foram verificar se as poliaminas (espermina, espermidina e putrescina) estão presentes na clara do ovo, dosá-las, testar a sua reatividade com a glicose, nas condições brandas da reação de Maillard e ver se existe alguma relação entre a possível perda de poliaminas, durante a reação, com a diminuição do valor nutritivo já observada na ovalbumina Maillard preparada em condições idênticas.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Considerações gerais

Composição da clara do ovo de galinha

As quantidades de alguns nutrientes e a energia da clara do ovo são apresentadas na tabela 1 (Stadelman e Cotterill, 1973).

Carboidratos

O ovo contém quantidades relativamente pequenas de carboidratos sendo que, aproximadamente 75% está presente na clara. Os carboidratos do ovo podem ser encontrados na forma livre (glicose) ou em combinações com proteínas e gorduras (manose e galactose). Na gema, os carboidratos combinados estão presentes nas fosfoproteínas, fosfolípidos e cerebrosídeos, enquanto que na clara fazem parte das glicoproteínas. A tabela 2 mostra a proporção de carboidratos livres e combinados da clara (Romanoff e Romanoff, 1963).

Proteínas

O teor proteico da clara do ovo em base úmida é de 9,7-10,6%. A ovalbumina, conalbumina, ovomucoide e a lisozi-
ma são as principais proteínas da clara e suas característi-
cas, bem como as de outras proteínas, podem ser vistas na tabe-
la 3 (Stadelman et al., 1973).

Conalbumina

É uma glicoproteína facilmente obtida por precipi-
tação com sulfato de amônio ou separada da ovalbumina agitan-

TABELA 1

Composição Química da Clara do Ovo de Galinha *

Componentes	Clara Crua
Água (%)	87,6
Energia (Cal)	16,83
Proteína (g)	3,6
Gordura - Lípides Totais (g)	traços
Carboidrato Total (g)	0,264
Cinzas (g)	0,231
Cálcio (mg)	2,97
Fósforo (mg)	4,95
Ferro (mg)	0,033
Sódio (mg)	48,18
Potássio (mg)	45,87
Magnésio (mg)	2,97
Diamina (mg)	traços
Riboflavina (mg)	0,089
Niacina (mg)	0,033

Fonte: Stadelman e Cotterill (1973)

* Estes dados referem-se à clara do ovo pesando 33 g.

TABELA 2

Distribuição dos Carboidratos no Ovo

Forma	Quantidade de Carboidrato (%)	
	Na clara	No ovo integral
Carboidratos Livres (glicose)	0,4	0,6
Carboidratos Combinados	0,5	0,4
Total	0,9	1,0

Fonte: Romanoff e Romanoff (1963).

TABELA 3

Proteínas na Clara do Ovo

Proteína	Quantidade relativa na clara (%)	Ponto Isoelétrico	Peso Molecular	Características
Ovalbumina	54	4,6	45.000	Fosfoglucoproteína
Conalbumina	13	6,6	80.000	Liga Metais, especialmente Ferro
Ovomucóide	11	3,9-4,3	28.000	Inibe Tripsina
Lisozima (G ₁ Globulina)	3,5	10,7	14.600	Lisa algumas bactérias
G ₂ (Globulina)	4,0?	5,5	30.000-45.000	-
G ₃ (Globulina)	4,0?	5,8	?	-
Ovomucina	1,5	?	?	Sialoproteína
Flavoproteína	0,8	4,1	35.000	Liga Riboflavina
Ovoglicoproteína	0,5?	3,9	24.000	Sialoproteína
Ovomacroglobulina	0,5	3,5-4,7	760.000-900.000	?
Ovoinibidora	0,1	5,2	44.000	Inibe várias proteases
Avidina	0,05	9,5	53.000	Liga Biotina

Fonte: Stadelman e Cotterill (1973).

do-se a solução da proteína até que a ovalbumina coagule (Stadelman et al., 1973). A conalbumina é capaz de ligar ions metálicos di e trivalentes (Fe^{+++} , Al^{+++} , Cu^{++} e Zn^{++}) formando complexos resistentes à desnaturação térmica e ao ataque proteolítico.

Ovomucóide

É uma glicoproteína termoresistente e pode ser separada por precipitação com acetona após terem sido precipitadas as outras proteínas da clara com ácido tricloroacético em pH 3,5. É um inibidor de tripsina. Através da cromatografia em coluna esta proteína pode ser fracionada em 3 formas de ovomucóide contendo diferentes teores de ácido siálico (Stadelman et al., 1973). A ovomucóide de galinha contém 1,0 a 1,5% de D-galactose; 4,3 a 4,7% de D-manose; 12,5 a 15,4% de 2-amino-2 desoxi-D-glucose e 0,4 a 4% de ácido siálico (Montgomery, 1970).

Lisozima

A globulina G_1 é a lisozima, uma enzima da clara que é capaz de hidrolizar as ligações β (1-4) entre o ácido N-acetilneuramínico e a N-acetilglucosamina da parede celular de bactérias (Stadelman et al., 1973). A enzima possui 129 resíduos de aminoácidos e 4 ligações dissulfídicas. Uma característica desta proteína, de sequência e estrutura totalmente conhecidas, é a de possuir um resíduo de lisina na extremidade N-terminal da cadeia.

Ovalbumina

É a proteína predominante na clara, e é classificada como fosfoglicoproteína, uma vez que carboidratos e grupos fosfatos estão ligados covalentemente à cadeia polipe-

tídica (Stadelman et al., 1973). A ovalbumina pode ser obtida por fracionamento com sulfato de amônio ou sulfato de sódio e por cromatografia em coluna de carboximetil celulose. Existem duas formas de ovalbumina, R e S, que diferem nas velocidades com que são desnaturadas pelo calor em pH 3. A forma mais estável, S-ovalbumina, é formada a partir da R-ovalbumina durante o armazenamento dos ovos. O mecanismo envolvido nesta conversão ainda é desconhecido (Marshall e Neuberger, 1972).

O peso molecular da ovalbumina é de 45000, o qual representa uma média dos valores obtidos dos dados de pressão osmótica e sedimentação (Gottschalk e Graham, 1966). Através de estudos eletroforéticos, foi observado que a ovalbumina possui 3 componentes designados A₁, A₂ e A₃, que diferem nos seus conteúdos de fósforo. O componente A₁ contém 2 grupos fosfatos por molécula, A₂ contém apenas 1 e A₃ não possui fósforo (Marshall et al., 1972). O ponto de ligação dos resíduos de fósforo é conhecido. Flavin (1954) isolou fosfoserina de um hidrolizado ácido parcial da proteína e as sequências peptídicas ao redor de ambos os resíduos de serina foram apresentadas por Milstein (1968) como sendo:

- (1) Ala.Gli.Arg.Glu.Val.Gli.Ser (P) Ala.Glu.Ala.Gli.Asp.Val.
Ala.Ala.Ser.(Val,Glx₂,Ser,Phe)Arg
- (2) Asp.Lis.Leu.Pro.Gli.Phe.Gli.Asp.Ser (P) Ile.Glx.Ala.Glx.
Cis.Gli (Thr,Ser,Val).(Asp,His,Val)

onde Ser (P) representa os resíduos de serina fosfato e Cis pode ser cistina ou cisteína.

A ovalbumina pode ser convertida numa proteína cristalina denominada "plakalbumin", pela ação da enzima subtilo-peptidase A (subtilisina) que ocorre no meio de cultura de uma linhagem do Bacillus subtilis (Gottschalk et al., 1966). A reação enzimática ocorre em pelo menos duas etapas, e ligações peptídicas são rompidas e três peptídeos são liberados. A primeira etapa envolve a quebra de uma ligação peptídica e

o C-terminal passa a ser um resíduo de alanina. Subsequentemente, 3 peptídeos são liberados: Glu.Ala.Gli.Val.Asp.Ala.Ala., Ala.Ala e Glu.Ala.Gli.Val.Asp. O fósforo na "plakalbumin" está distribuído entre os componentes P₁, P₂ e P₃ da mesma maneira como nos componentes A₁, A₂ e A₃ da ovalbumina (Marshall et al., 1972).

A composição em aminoácidos da ovalbumina é apresentada na tabela 4 (Marshall et al., 1972). Estes dados foram tirados de publicações de vários pesquisadores que usaram métodos microbiológicos ou cromatográficos para analisar o hidrolisado proteico. O grupamento amino do aminoácido N-terminal está acetilado, e a sequência de aminoácidos nesta região da proteína é N-acetil.Gli.Ser.Gli.Ile.Ala. O resíduo C-terminal foi identificado como sendo prolina e a sequência terminal é ... Val.Ser.Pro.

Existem divergências nos dados apresentados por diversos pesquisadores com relação ao número de grupamentos sulfidrilas e pontes dissulfídicas na molécula da ovalbumina (Marshall et al., 1972). Parece provável que 6 ou 7 resíduos de cist(e)ina estão presentes na proteína, sendo que destes, 4 ou 5 ocorrem como cisteína.

A unidade de carboidrato da ovalbumina consiste, provavelmente, de 2% de manose e 1,2% de glucosamina, ou uma média de 5 e 3 resíduos respectivamente (Marshall et al., 1972). Todos os três resíduos de glucosamina são N-acetilados. O ácido aspártico está diretamente ligado à unidade de carboidrato e uma das sequências possíveis dos resíduos de açúcares é apresentada a seguir (Montgomery, 1972):

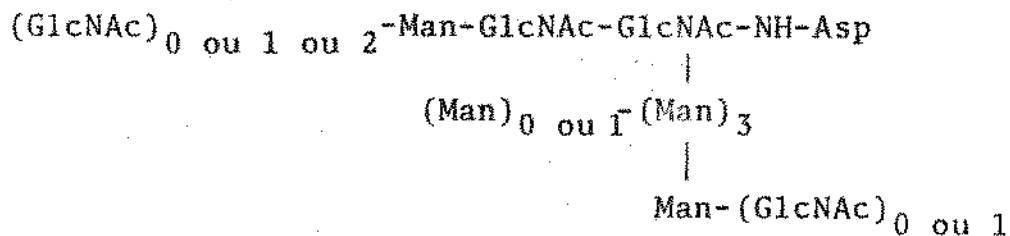


TABELA 4

Composição da Albumina do Ovo de Galinha

Substância	Resíduos (expressos em números inteiros) por Mol de Albumina de Galinha			
	1	2	3	4
Alanina	35	37	34	35
Glicina	19	19	19	19
Valina	28	33	30	32
Leucina	32	33	32	31
Isoleucina	25	25	25	24
Prolina	14	15	16	15
Fenilalanina	21	20	20	19
Tirosina	9	10	10	10
Triptofano	3	3		3
Serina	36	27	37	38
Treonina	16	14	15	15
Cistina/2	7	k	6	6
Metionina	16	16	13	15
Arginina	15	15	19	15
Histidina	7	7	8	7
Lisina	20	21	19	20
Ácido Aspártico	32	32	32	32
Ácido Glutâmico	52	50	51	52

Fonte: Marshall e Neuberger (1972).

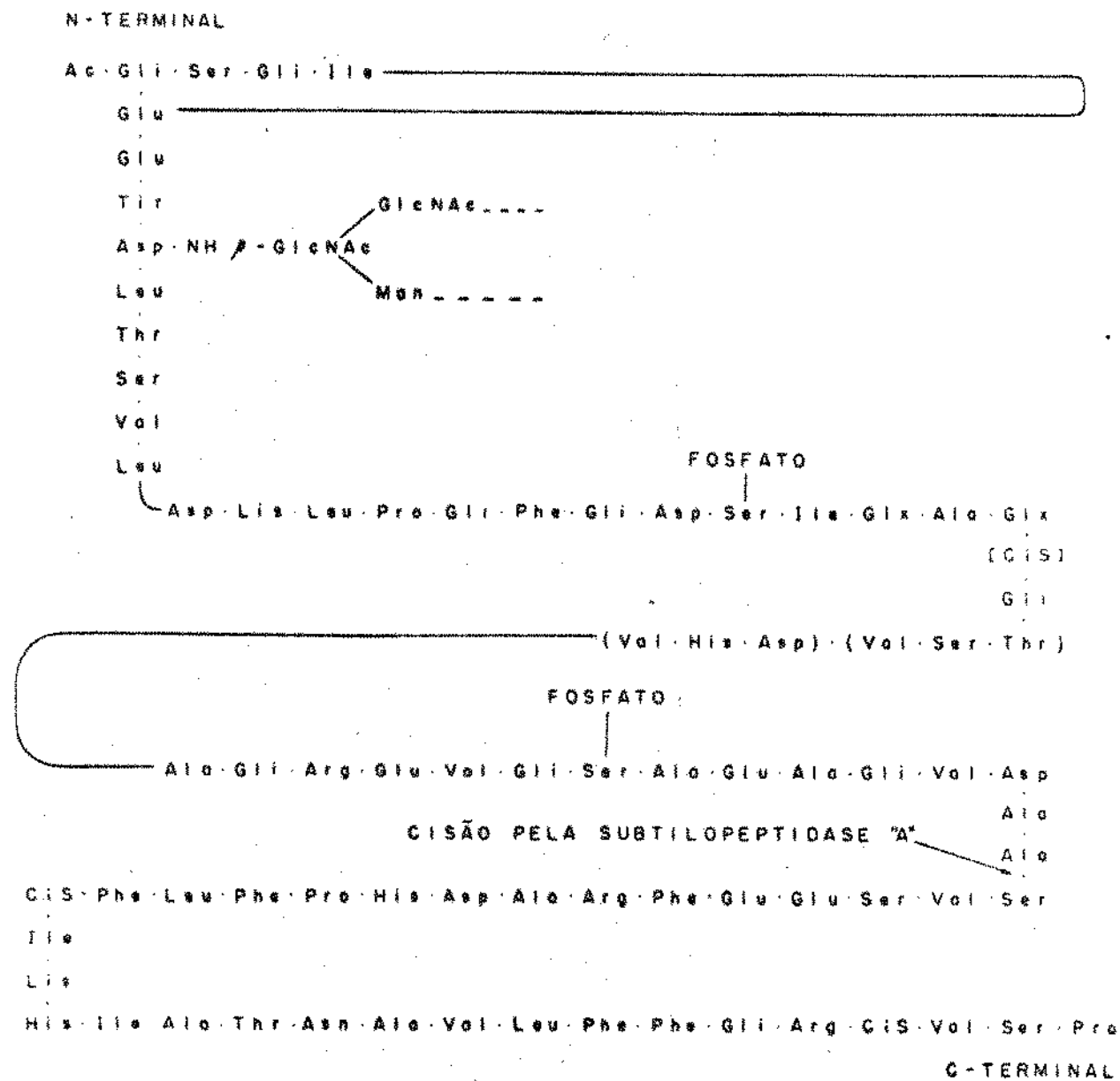


FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DA MOLÉCULA DA OVALBUMINA. CIS: RESÍDUOS DE CISTEÍNA. [CIS]: CISTEÍNA OU CISTINA/2.

FONTE: MARSHAL E NEUBERGER, 1.972

onde GlcNAc representa a N-acetilglucosamina e Man a manose. Uma representação da molécula da ovalbumina pode ser vista na figura 1 (Marshall et al., 1972).

As poliaminas naturais

Ocorrência

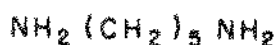
Embora a presença das poliaminas em material biológico tenha sido publicada há 300 anos atrás, suas funções bioquímicas e biológicas só passaram a ter interesse nos últimos dez anos. Um fato já estabelecido é que as poliaminas estão universalmente distribuídas em todos os materiais biológicos, incluindo organismos animais, plantas, microorganismos e vírus (Raina e Jänne, 1975). Até o presente, porém, não encontramos qualquer publicação que acuse a presença e indique os níveis de poliaminas nas proteínas do ovo.

Nos tecidos animais a espermidina e a espermina são as principais poliaminas enquanto que a putrescina está presente em pequenas quantidades. A cadaverina, produto da descarboxilação da lisina, é tipicamente encontrada nos tecidos animais em decomposição e também ocasionalmente em tecidos animais vivos. Dois novos derivados das poliaminas, a putreanina e o ácido espérmico, provavelmente metabólitos da espermidina e espermina, respectivamente, foram recentemente isolados do sistema nervoso central de mamíferos (Raina et al., 1975).

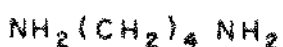
As estruturas das referidas poliaminas ou derivados são apresentadas a seguir.

Nas plantas, as poliaminas podem ser encontradas livres ou como constituintes de muitos alcalóides (Tabor e Tabor, 1964). Moruzzi e Calderera (1964) mostraram que as poliaminas estão presentes em quantidades apreciáveis nos ger-

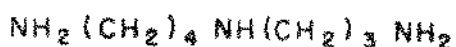
mens de cereais. Putrescina, cadaverina, espermidina e espermina foram isoladas da soja e identificadas por cromatografia de camada fina, eletroforese em papel e ressonância nuclear magnética (Wang, 1972; Wang e Selke, 1973). Smith (1970) publicou a distribuição de putrescina, espermina e espermidina em vários vegetais superiores.



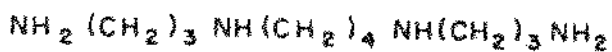
CADAVÉRINA



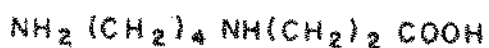
PUTRESCINA



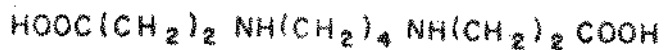
ESPERMIDINA



ESPERMINA



PUTREANINA



ÁCIDO ESPÉRMICO

ESTRUTURA DAS POLIAMINAS E DE ALGUNS
DERIVADOS ENCONTRADOS EM TECIDOS ANIMAIS.

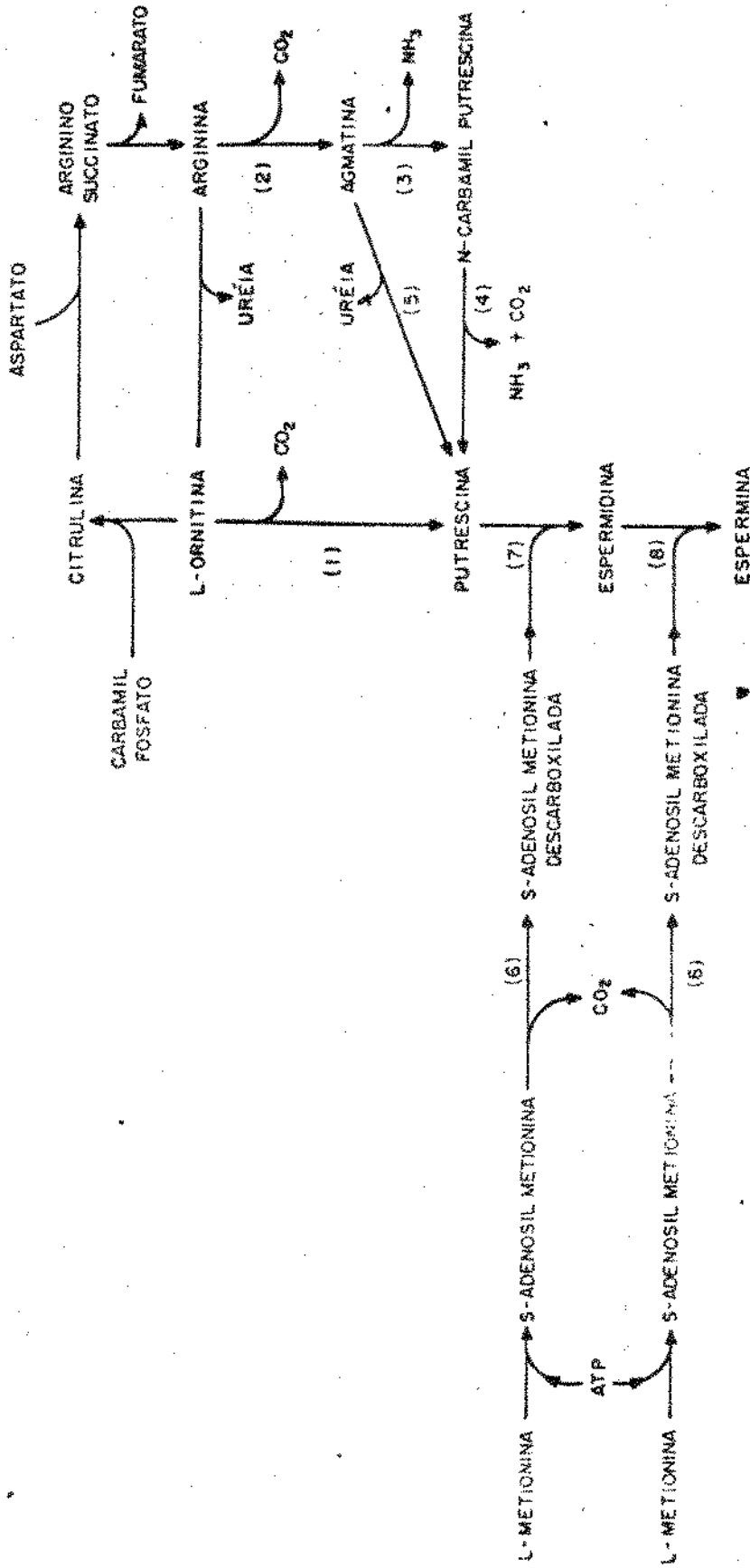
A espermidina e a putrescina são as poliaminas que ocorrem mais frequentemente nas bactérias, sendo que as gram-negativas contêm concentrações mais elevadas do que as gram-positivas (Bachrach, 1973). A termina e a caldina, duas poliaminas recentemente descobertas, foram isoladas dos microorganismos termófilos, Thermus thermophilus HB8 (Oshima, 1975) e Caldariella acidophila (De Rose et al., 1976), respectivamente. As poliaminas também estão presentes nos vírus de plantas (Johnson e Markham, 1962), nos colifagos T (Ames et al., 1958) e mais recentemente foram extraídas do herpes simplex vírus (Gibson e Roizman, 1971), do vírus da influenza e do vírus da doença de Newcastle (Bachrach et al., 1974).

Biossíntese

Nos tecidos animais, a putrescina é formada a partir da descarboxilação da L-ornitina (Raina et al., 1975), e nas bactérias, a partir da arginina que é descarboxilada originando a agmatina que, por sua vez, é hidrolisada para formar a putrescina. Apenas na bactéria E.coli foi mostrada a conversão da ornitina em putrescina (Morris e Pardee, 1966). Smith (1970) mostrou que a síntese de putrescina nos vegetais superiores segue caminho semelhante ao das bactérias, entretanto, a agmatina é primeiramente hidrolisada a N-carbamilputrescina que, posteriormente, é convertida em putrescina.

Ao contrário da putrescina, a formação da espermidina e da espermina segue a mesma rota tanto nos organismos animais, como nos vegetais e bactérias. O grupamento propilamina, derivado da L-metionina, é transferido para a putrescina e para a espermidina, nas sínteses da espermidina e espermina, respectivamente (Raina et al., 1975).

A figura 2 mostra os caminhos seguidos na biossíntese das poliaminas, bem como as enzimas que participam destas reações.



- (1) - L-ORNITINA DESCARBOXILASE
- (2) - ARGININA DESCARBOXILASE
- (3) - AGMATINA IMINOHIDROLASE
- (4) - N-CARBAMIL PUTRESCINA AMIDOHIDROLASE
- (5) - AGMATINA UREOHIDROLASE
- (6) - S-ADENOSIL-L-METIONINA DESCARBOXILASE
- (7) - ESPERMIDINA SINTETASE
- (8) - ESPERMINA SINTETASE

FIGURA 2 - BIOSÍNTESE DAS POLIAMINAS. AS PLANTAS, AS BACTÉRIAS E OS ORGANISMOS ANIMAIS DIFEREM APENAS NA FORMA EM QUE A PUTRESCINA É BIOSINTETISADA.

Basso e Smith (1974) mostraram que a deficiência de minerais (K^+ e Mg^{++}) resulta no acúmulo de putrescina nas folhas de vários vegetais superiores e apresentaram dois mecanismos para explicar este fato: pelo primeiro, a deficiência de K^+ e de Mg^{++} induz um aumento na atividade das enzimas envolvidas na síntese da putrescina a partir da arginina com a formação intermediária de agmatina e N-carbamil putrescina (figura 2). Pelo segundo, a S-adenosil-L-metionina sintetase, que catalisa a síntese da S-adenosil-L-metionina e a S-adenosil-L-metionina descarboxilase, enzimas envolvidas na síntese da espermina e espermidina a partir da putrescina, são estimuladas por cations mono (NH_4^+ , K^+ ou Rb^+) e divalentes (Mg^{++}). Portanto, qualquer redução na atividade destas enzimas, causada pela deficiência de K^+ ou de Mg^{++} , resultará em acúmulo de putrescina. No mesmo trabalho eles sugeriram que o teor de putrescina poderia servir como guia para a determinação do nível de minerais em legumes, uma vez que o acúmulo desta amina pode ser detectado antes que os sintomas de deficiência apareçam.

Trabalhando com folhas de Sesamum indicum, Crocomo e Basso (1974) observaram que a putrescina é formada, preferencialmente, a partir da citrulina, tendo a N-carbamilputrescina como intermediário; e, à medida que o nível de potássio decresce, os teores dos aminoácidos ornitina, citrulina e arginina, e das aminas putrescina, agmatina e N-carbamil putrescina aumentam, enquanto que a velocidade de síntese proteica diminui. O aumento nas concentrações da arginina e citrulina relacionado com a deficiência de potássio, devido a maior degradação ou menor síntese proteica, poderia, por si só, promover o acúmulo de putrescina por ação das massas. Entretanto, eles sugeriram também que as enzimas envolvidas na síntese da putrescina são induzidas pelo aumento de seus substratos.

Função biológica

Um dos problemas mais complexos para os que estudam a bioquímica das poliaminas está relacionado com o significado fisiológico destes compostos nos organismos vivos. Felizmente, número crescente de bioquímicos e biólogos vem mostrando interesse neste campo e tem contribuído, significativamente, para o conhecimento da biologia das poliaminas.

Interação entre poliaminas e ácidos nucleicos

Várias observações associam as poliaminas à síntese de macromoléculas. Sendo bases fortes, espermidina e espermina têm uma alta afinidade por compostos aniônicos e se ligam, fortemente, aos ácidos nucleicos e partículas que os contêm. Em geral, esta associação resulta numa elevada estabilidade frente a diversos agentes. Por exemplo, a interação entre as poliaminas e DNA aumenta a estabilidade da dupla hélice frente à desnaturação térmica (Tabor, 1962). Análises de Raio-X das estruturas cristalinas dos sais das poliaminas sugerem que na interação com a molécula de DNA, a espermidina e a espermina podem formar uma ponte entre os dois filamentos de DNA com os grupamentos imino e amino protonados fazendo ligações eletrostáticas com os grupos fosfatos do DNA. Este modelo nos ajuda a entender o efeito estabilizador das poliaminas, embora outros modelos de interação não estejam excluídos (Raina et al., 1975). Parece que as poliaminas não alteram a conformação do DNA, mas fazem com que o RNA se arranje numa estrutura mais compacta, possivelmente através de "loops" ou convoluções helicoidais, tornando-o menos susceptível à digestão pela ribonuclease (Stevens, 1970). Por outro lado, as concentrações de Mg^{++} e de outros ions divalentes usados no funcionamento e estabilidade de sistemas de ácidos nucleicos "in vitro", não são comparáveis aos níveis destes ions no interior da célula, o que nos leva a pensar que a intervenção

das poliaminas no funcionamento dos ácidos nucleicos "in vivo" seja de grande importância.

Poliaminas e síntese dos ácidos nucleicos

É bem provável que exista uma correlação positiva entre a biossíntese e acúmulo de poliaminas e ácidos nucleicos, particularmente o RNA, e que as poliaminas sejam capazes de afetar a velocidade de síntese de macromoléculas "in vitro" (Raina et al., 1975). As observações de elevadas concentrações de poliaminas em tecidos de embriões de galinha (Raina, 1963) e de ratos recém-nascidos (Jänne et al., 1964) sugerem que as poliaminas possam exercer papel significativo na fisiologia celular, especialmente em tecidos que crescem rapidamente. Usando, como modelo, fígado de rato em regeneração após hepatectomia parcial, para estudar o metabolismo de poliaminas e RNA, Raina et al. (1966) mostraram uma estimulação inicial da síntese da espermidina e um acúmulo paralelo de RNA.

A sequência dos eventos no fígado em regeneração é a seguinte: um aumento na atividade da ornitina descarboxilase resulta no acúmulo de putrescina que, por sua vez, estimula a S-adenosil-L-metionina descarboxilase levando ao acúmulo de espermidina.

O paralelismo nas velocidades de acúmulo e biossíntese das poliaminas e dos ácidos ribonucleicos tem sido mostrado em outros sistemas incluindo E.coli sob diferentes condições de crescimento e tecidos de ratos em desenvolvimento (Raina et al., 1975).

Publicações de vários laboratórios têm demonstrado que as poliaminas aumentam a síntese de RNA em núcleo e nucléolo isolados, e estimulam a atividade de RNA polimerases dependentes do DNA, de animais e bactérias (Bachrach, 1973; Stevens, 1970). Parece que as poliaminas alteram a estrutura se

cundária do RNA promovendo, assim, a remoção do RNA recém-transcrito do complexo DNA-enzima ou evitando uma ligação não específica do RNA a este complexo (Stevens, 1970). A espermidina e a espermina estimulam a síntese de RNA quando presentes em baixas concentrações, e funcionam como inibidores a elevadas concentrações, provavelmente devido à precipitação do DNA matriz (Raina et al., 1975). Muito pouco se sabe a respeito do efeito das poliaminas nas reações catalisadas por DNA polimerases dependentes do DNA. Já foram observados casos de estimulação e também de inibição pelas poliaminas (Bachrach, 1973).

A espermidina e a espermina aumentam a resistência do RNA à ação da ribonuclease porque se ligam aos grupamentos fosfatos adjacentes do polinucleotídeo protegendo, assim, as ligações internucleotídicas (Stevens, 1970), e/ou porque alteram a conformação da molécula do RNA.

Como é bem sabido, os tecidos neoplásicos também apresentam algumas das características dos tecidos em fase de grande desenvolvimento e, portanto, podem possuir altas concentrações de poliaminas (Raina et al., 1975). Alguns trabalhos, por exemplo, mostram que elevadas quantidades de poliaminas se acumulam no soro, plasma e urina de pacientes com vários tipos de câncer (Marton et al., 1973; Denton et al., 1973; Russell e Russell, 1975). Altos níveis de poliaminas foram também encontrados no fluido cérebro-espinhal de pacientes com tumores cerebrais (Marton et al., 1974).

Efeito das poliaminas na síntese de proteínas

As poliaminas são capazes de estimular várias fases da síntese de polipeptídeos incluindo a aminoacilação do t-RNA e a ligação do m-RNA e do aminoacil t-RNA aos ribossomos, e podem substituir parcialmente os ions Mg^{++} nestas reações (Raina et al., 1975). Em altas concentrações, as poliaminas inibem a síntese de polipeptídeos, provavelmente devido

à agregação ou precipitação dos ribossomas. A estabilização, bem como a interação com o t-RNA e os ribossomas são importantes aspectos da ação das poliaminas na síntese proteica "in vitro". Embora uma quantidade crítica de Mg^{++} seja necessária para a manutenção da integridade estrutural e funcional dos ribossomas, grande parte da necessidade essencial para cations di ou multivalentes parece ser preenchida pelas poliaminas "in vivo". Outra semelhança entre as poliaminas e o Mg^{++} está na facilidade com que os dois podem compartilhar uma função comum como ocorre na associação dos ribossomas com as membranas do retículo endoplasmático. Tanto a espermina como os ions Mg^{++} são capazes de promover a associação de ribossomas isolados com as membranas do retículo endoplasmático, como foi mostrado em fígado de rato por Khawaja e Raina (1970).

Efeito das poliaminas no metabolismo de carboidratos

A conversão da glicose a dióxido de carbono, pelas células do tecido adiposo de rato, pode ser estimulada pelas poliaminas. Este efeito foi atribuído à aceleração do transporte de glicose, aparentemente devido à interação das poliaminas com a membrana celular (Bachrach, 1973). Além disso, as poliaminas podem afetar o metabolismo de carboidratos através da estimulação da atividade de várias enzimas. A fosfoenolpiruvato carboxilase da Salmonella typhimurium, por exemplo, pode ser ativada por compostos básicos, incluindo a espermidina, através da ligação do polication a regiões hidrofóbicas da enzima, alterando, assim, sua configuração.

Poliaminas como fatores de crescimento

Herbst e Snell (1949) foram os primeiros a demonstrar a atividade das poliaminas como fatores de crescimento para o Haemophilus parainfluenzae. Desde então, foram encontrados vários microorganismos que crescem mais rapidamente na

presença das poliaminas, ou que mostram uma necessidade absoluta para estes compostos. O mecanismo da ação das poliaminas em promover o crescimento ainda não está muito bem conhecido. Em alguns organismos, as poliaminas e os sais, provavelmente, exercem a mesma função e facilitam o crescimento através da estabilização das membranas das bactérias (Bachrach, 1973). Uma outra alternativa para explicar a estimulação do crescimento pelas poliaminas vem de recentes observações de que estes compostos são requeridos para a divisão celular bacteriana (Inouye e Pardee, 1970).

Interação de proteínas com açúcares redutores: Reação de Maillard

De acordo com o "Merck Index", a reação de Maillard pode ser definida como sendo a "reação de açúcares redutores com o grupamento amino dos α -aminoácidos, peptídeos e proteínas, levando à evolução de CO_2 e desenvolvimento de intensa coloração marrom. A reação é complexa e envolve a formação de numerosos compostos; entre os que já foram identificados estão os derivados do furfural, os N-glicosídeos e as redutonas".

A química da reação de Maillard

As várias revisões bibliográficas a respeito da química da reação de Maillard pouco acrescentaram à excelente revisão de Hodge (1953), a qual será a única a que faremos referência. A fase inicial envolve a reação entre um grupamento amino primário (aminoácido, proteína, etc.) e um açúcar redutor como a glicose, e subsequente eliminação de uma molécula de água para formar a glicosilamina N-substituída. A isomerização da dupla ligação pode originar 1,2-Eneaminol e uma deso

xiaminocetose através do rearranjo de Amadori (figura 3).

Na fase intermediária (figura 4), a fração carboidrato é desidratada por dois caminhos. Nos sistemas aquosos ácidos ou neutros são formados os furfurais, enquanto que no estado seco ou em solventes não aquosos os açúcares são desidratados para formar as redutonas. Neste estágio ocorre também uma fragmentação do carboidrato originando vários produtos como glicolaldeído, gliceraldeído, piruvaldeído, etc.. O mecanismo para a fissão parece ser o reverso da condensação aldólica (desaldolização). Outra reação que pode ser observada no estágio intermediário é a degradação de Strecker, onde os α -aminoácidos são descarboxilados, quando aquecidos na presença de certos compostos policarbonílicos, originando um aldeído contendo um átomo de carbono a menos. Tudo indica que cerca de 80% de CO_2 liberado durante a reação de Maillard, é proveniente da degradação de Strecker.

Na terceira e última fase (figura 4), os compostos intermediários se polimerizam para dar origem a produtos insaturados, fluorescentes, marrons, denominados melanoidinas. Entre as principais reações envolvidas estão a condensação aldólica, a polimerização aldeído-amina e a formação de compostos nitrogenados heterocíclicos como os pirróis, os imidazóis, as piridinas e as pirazinas.

Efeito da reação de Maillard, sob condições brandas, na qualidade nutricional da proteína

Neste trabalho denominaremos proteína Maillard qualquer proteína reagida com a glicose.

A reação de Maillard produz alterações na cor, no sabor e no valor nutritivo dos alimentos, durante o armazenamento e processamento, relacionadas com mudanças físico-químicas e nutricionais de seus constituintes proteicos (Tanaka et al., 1975; Sgarbieri et al., 1973)

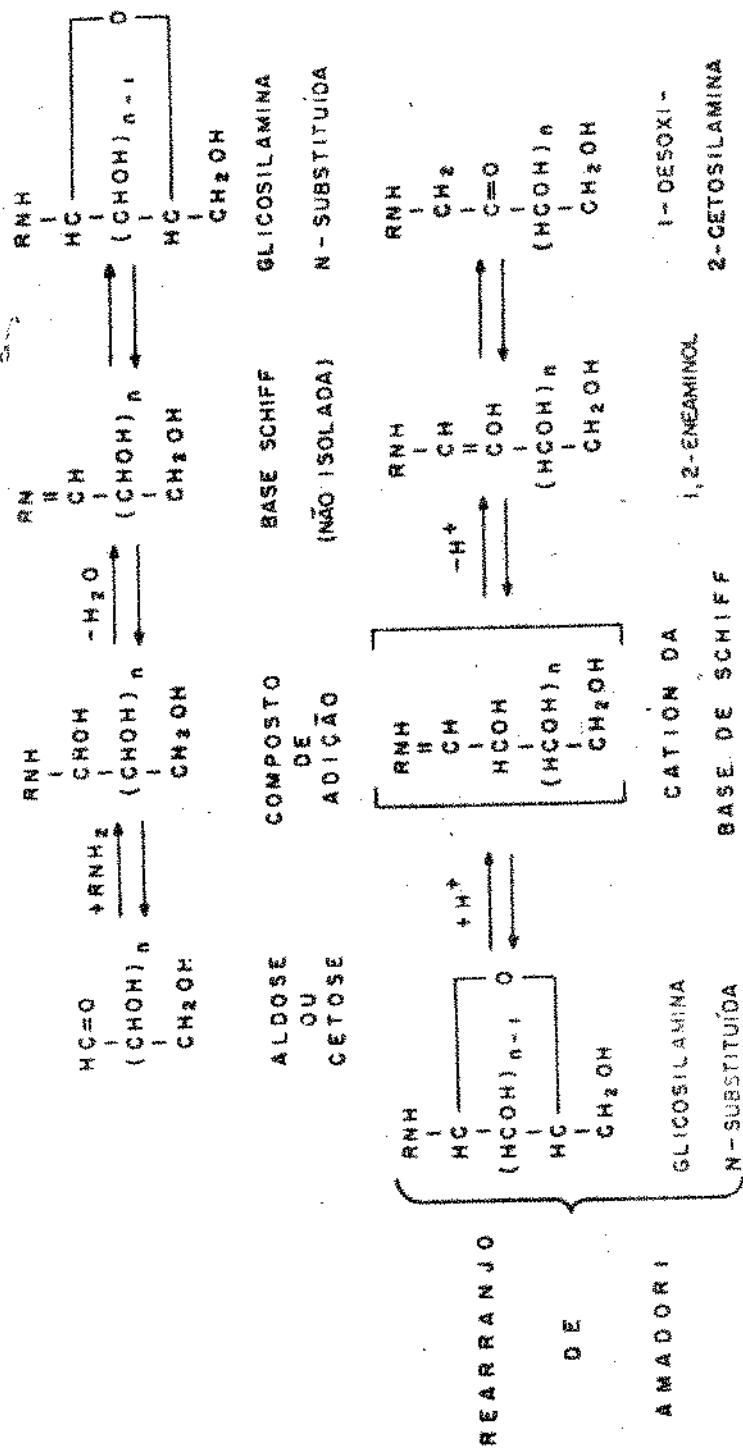


FIGURA 3 - FASE INICIAL DA REAÇÃO DE MAILLARD. SE O COMPOSTO CETO (AMADORI) NÃO FOR FORMADO, NÃO OCORRERÁ O "BROWNING" MAILLARD.

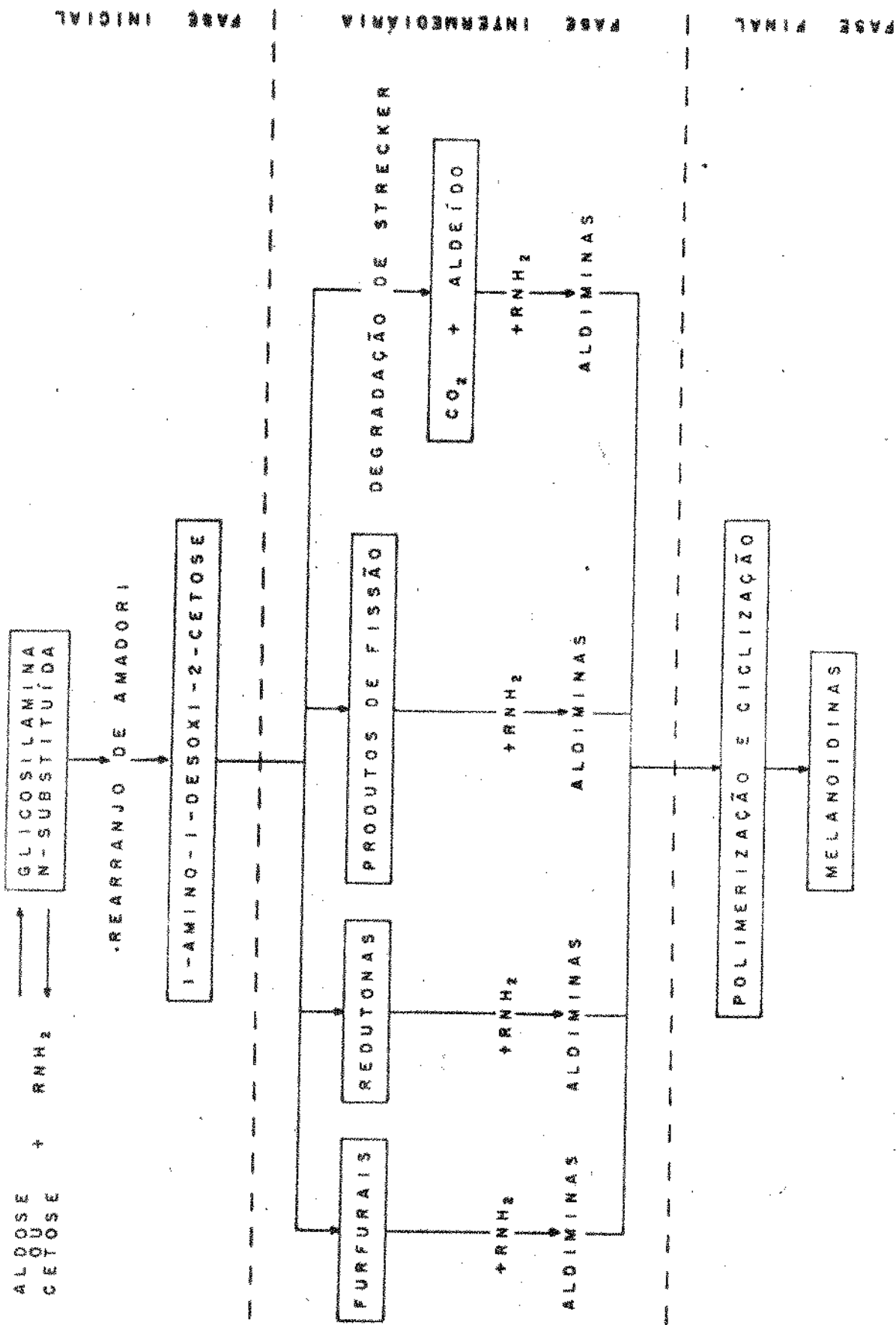


FIGURA 4 - ESQUEMA SIMPLIFICADO MOSTRANDO OS TRÊS ESTÁGIOS DA REAÇÃO DE MAILLARD

A grande queda do valor nutritivo de proteínas processadas na presença de carboidratos tem sido atribuída a algum ou a todos os seguintes fatores: a) decréscimo da digestibilidade da proteína; b) destruição ou diminuição da disponibilidade biológica de aminoácidos essenciais; c) produção de substâncias tóxicas ou inibidores metabólicos (Tanaka et al., 1974; Tanaka et al., 1977).

Empregando métodos biológicos e bioquímicos, Tanaka et al. (1974) mostraram que a qualidade da ovalbumina decresce rapidamente com o decorrer da reação. Após apenas dez dias de armazenamento com a glicose a 37°C, o valor biológico (VB) da ovalbumina caiu para 50%. O PER, medida da qualidade proteica em ratos em crescimento, apresentou decréscimo mais marcante que o VB que é um ensaio feito com animais adultos. Isto parece indicar que a reação de Maillard exerce na proteína efeito mais crítico durante o crescimento dos ratos, período em que os animais apresentam uma maior dependência proteica para o seu desenvolvimento. No mesmo trabalho, eles observaram que a proteína Maillard apresenta baixa digestibilidade e absorvabilidade e concluíram que embora possa não existir um fator tóxico, no sentido intrínseco da palavra, a digestão animal de proteínas Maillard parece induzir uma sobrecarga fisiológica com a liberação de um excesso de enzimas digestivas (nitrogênio endógeno), e isto poderia ser considerado como fator que intensifica a perda do valor nutritivo "in vivo".

Tanaka et al. (1977) observaram que até os primeiros 10 dias de reação da ovalbumina com a glicose a 37°C, os aminoácidos que apresentaram as maiores perdas foram lisina, seguida da arginina, serina e treonina e, finalmente, a isoleucina e leucina. O fato de que a lisina seja o aminoácido mais destruído pode ser explicado, provavelmente, pela sua dupla reatividade, sendo através do grupamento ϵ -amino quando o aminoácido se achar no interior, e através dos grupamentos ϵ e α -amino quando o resíduo se achar na posição N-terminal da

cadeia como acontece no caso da lisozima. Através da correlação entre o PER da ovalbumina Maillard e o tempo de armazenamento com a glicose, eles mostraram, também, que existe uma queda substancial na qualidade nutricional da proteína mesmo por períodos inferiores a 10 dias. Além disto, alterações observadas nas atividades de determinadas enzimas (fosfatase alcalina, transaminases e maltase) e nos pesos relativos de alguns órgãos (rins e fígado) em ratos alimentados com ovalbumina Maillard por 3 meses, parecem indicar a existência de distúrbio fisiológico, mas não se pode afirmar que isto se deve ao acúmulo de compostos tóxicos.

Em vista de que os dados até hoje publicados não explicam satisfatoriamente a perda tão drástica do valor nutritivo da proteína Maillard obtida nas condições anteriormente descritas, e tendo em conta que a simples perda de aminoácidos essenciais (Amaya-F et al., 1976) também não parece justificar a queda tão grande do valor nutritivo da albumina do ovo Maillard, foi objetivo desta tese dosar as poliaminas existentes na clara (albumina) do ovo de galinha e verificar se elas tem alguma participação na reação de Maillard mesmo estando associadas à fração proteica não dialisável.

MATERIAL E MÉTODOS

Material.

Ovos de galinha com 47 semanas fornecidos pela Fazenda Nova Granja (Vespasiano, MG, Brasil), raça G.307 (procedência Granja Guanabara S.A., Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Putrescina (base livre), espermina e espermidina (sais de hidrocloreto) e cloreto de Dansilo (1-Dimetilaminonaftaleno-5-sulfonilcloreto) foram comprados da Sigma Chemical Company. Placas para cromatografia de camada fina (250 µg) precobertas com sílica gel 60 foram compradas da Merck (Quimitra, Comércio e Indústria Química S.A.).

Métodos

O volume total de clara, obtido de 12 ovos, após a separação das gemas, foi submetido a uma diálise contra água destilada, em câmara fria (4°C) por 36 horas. Após a centrifugação do dialisado (10.000 rpm), o sobrenadante (albuminas) foi liofilizado. Exatamente 200 mg do pó, assim obtido, foram hidrolisadas com 15 ml de HCl 6N a 110°C sob atmosfera de nitrogênio durante 16h.

Extração das poliaminas

O pH do hidrolisado (15 ml) foi acertado para 12-13 com solução de hidróxido de sódio (500g/1000ml) e, após adição de uma quantidade saturante de uma mistura salina (62,5g de Na₂SO₄ e 9g de Na₃PO₄), as poliaminas foram extraídas com 10 ml de n-butanol segundo o método descrito por Russell et al. (1975), para a extração das poliaminas do soro de pacientes cancerosos. A fase final em HCl 0,1 mol/l foi evaporada em evaporador rotativo (Buchi HB-140) e reconstituída em 10 ml de HCl 10⁻³N.

Reação das poliaminas extraídas da clara do ovo com o cloreto de Dansilo (dansilação das poliaminas)

Alíquotas de 100 µl da solução das poliaminas em HCl 10^{-3} N foram tomadas para a dansilação, segundo o método descrito por Fleisher e Russell (1975) para as poliaminas urinárias, exceto que o pH da reação foi acertado para 9,0-10,0, com solução saturada de Na_2CO_3 , e o solvente usado para a extração dos derivados dansilados das poliaminas, após 8 horas de reação, foi o tolueno. Após centrifugação a 10000 rpm por 10 minutos, 0,8 ml do sobrenadante (tolueno) foram evaporados em banho-maria a 50°C , sob atmosfera de nitrogênio, e o resíduo foi reconstituído para 80 µl com tolueno.

Cromatografia de camada fina e determinação fluorimétrica dos derivados dansilados das poliaminas

Alíquotas de microlitros do extrato toluênico foram aplicadas às placas de sílica gel 60 ativadas a 110°C por 1 hora. A separação dos derivados dansilados das poliaminas foi feita por desenvolvimento ascendente em ciclohexano/etilacetato (3:2, V/V), uma mistura de solventes usada por Dion e Herbst (1970), seguindo-se imediatamente uma pulverização das placas com trietanolamina/isopropanol (1:4, V/V) para aumentar e estabilizar a fluorescência. As placas foram, então, secadas a vácuo por 3 horas, no escuro e à temperatura ambiente. Após equilíbrio à pressão atmosférica por 30 minutos, as manchas foram marcadas sob luz ultravioleta e as áreas correspondentes das placas foram cuidadosamente raspadas e coletadas em tubos de centrífuga de 10 ml. Os derivados dansilados foram extraídos da sílica por agitação com 5 ml de tolueno/ácido acético (99:1, V/V), uma modificação da mistura de solventes usada por Seiler e Askar (1971) para a extração do derivado dansilado da putrescina. Após centrifugação a 15000 rpm por 10 minutos, a fluorescência de porções de 3 ml dos so

brenadantes foi medida no espectrofluorímetro Aminco Bowman, (American Instrument Company, Silver Spring, Maryland), usando-se comprimentos de onda de 365 a 500 nm para a ativação e emissão, respectivamente.

As soluções dos padrões das poliaminas foram preparadas de maneira a conter 1 $\mu\text{mol/ml}$ em $\text{HCl } 10^{-3}\text{N}$. Alíquotas de microlitros foram tomadas para a dansilação e subsequente cromatografia, como descrito anteriormente.

Testes de separação da amônia

O derivado dansilado da amônia (Dans-NH_2), produto secundário da reação de dansilação de aminas (Seiler, 1970) a pareceu em todos os cromatogramas feitos, como uma grande mancha amarela e rastos fluorescentes que dificultavam a separação dos derivados dansilados das poliaminas extraídas da clara do ovo. Mesmo após evaporar a amostra na presença de excesso de bicarbonato de sódio, como Fleisher et al. (1975), os rastos fluorescentes continuaram presentes. Dois métodos foram, então, testados para a eliminação da amônia ou do seu derivado dansilado:

Cromatografia em papel

Alíquotas de 0,5 ml da solução das poliaminas da clara do ovo em $\text{HCl } 10^{-3}\text{N}$ foram aplicadas em papel Whatman nº 1, 20x20cm, em linha, usando uma micro-seringa de 100 μl . A cromatografia foi feita por desenvolvimento ascendente em n-Butanol/metil etilcetona/amônia/água (5:3:1:1). O papel foi deixado secar à temperatura ambiente e, então, uma tira longitudinal de 2cm de largura foi cortada e nela foi feita uma pulverização com solução de ninidrina a 0,2% (P/V) em etanol. A tira foi levada à estufa a 110°C até desenvolvimento da coloração (15 minutos). A faixa do papel correspondente à coloração púrpura (Hammond e Herbst, 1968) foi cortada, picada, e

os pequenos pedaços de papel foram colocados em tubos de centrífuga de 10 ml, juntamente com 5 ml de HCl 10^{-3} N, por 1 hora. Após centrifugação a 15000 rpm por 10 minutos, alíquotas de microlitros do sobrenadante foram tomadas para a dansilação e cromatografia em camada fina como descrito anteriormente.

Cromatografia em Bio-Gel

A dansilação das poliaminas da clara do ovo foifei ta, como descrito anteriormente, tomando-se 2,0 ml da solução em HCl 10^{-3} N. Uma alíquota do extrato toluênico foi evaporada em banho-maria a 50° C, sob atmosfera de nitrogênio, e re constituída em um volume conhecido de etanol a 80% (V/V).

A suspensão do gel (Bio-Gel P-4, Bio-Rad Laborato ries; 100-200 mesh) foi colocada na coluna cromatográfica (1,0 x 50cm) e a velocidade do fluxo foi acertada para 0,5 ml/minuto. A solução etanólica dos derivados dansilados das poliaminas foi adicionada à coluna e frações de 2 ml dos eluatos foram coletadas em tubos pelo coletor automático de frações (LKB Bromma 7000 ultrorac). Alíquotas das frações foram tomadas para a cromatografia em camada fina, como descrito anteriormente.

Através da observação dos cromatogramas, ficou claro que não foi possível eliminar a amônia por meio dos métodos empregados. Finalmente, ajustando os três fatores, pH, volume de amostra para dansilar e tempo de reação, foi possível obter cromatogramas limpos, isentos dos rastros fluorescentes da amônia, e com as manchas correspondentes aos derivados dansilados das poliaminas bem nítidas e separadas. A mancha amarela da amônia continuou presente, porém mais clara e mais afastada da putrescina.

Acerto do pH

Como o pH elevado favorece a formação de Dans-NH₂ (Seiler, 1970), o pH inicial da reação de dansilação das poliaminas, que era de 12,0-13,0, com a adição de uma solução saturada de Na₂CO₃, foi acertado para 9,0-10,0 adicionando - se aos poucos a mesma solução de Na₂CO₃.

Acerto do tempo de reação

A princípio, a reação de dansilação das poliaminas durava 16 horas, mas como tempo prolongado de reação aumenta a possibilidade de formação de produtos secundários (Seiler, 1970), a reação passou a ser feita em 8 horas.

Acerto do volume de amostra para dansilar

Alíquotas de 5 µl, 10 µl, 20 µl, 50 µl, 100 µl, 150 µl e 200 µl da solução das poliaminas da clara do ovo em HCl 10⁻³N foram tomadas para a reação de dansilação e posterior cromatografia em camada fina. Foi observado que a um pH de 9,0-10,0 e com 8 horas de reação, a amostra de 100 µl é a que forneceu melhor cromatograma, livre da interferência da a mônia.

Escolha do solvente para a cromatografia de camada fina

Inicialmente, o solvente empregado na cromatografia dos derivados dansilados das poliaminas foi clorofórmio/trietilamina (100:20, V/V), uma mistura usada por Fleisher et al. (1975) para a cromatografia das poliaminas da urina humana. Entretanto, este solvente foi ineficiente na separação das poliaminas da clara do ovo. Passamos, então, a empregar ciclohexano/etilacetato (3:2, V/V), que foi usado por Dion (1970) para a separação cromatográfica das poliaminas de ovos

de D.melanogaster e obtivemos, assim, resultados positivos após resolver o problema da amônia como descrito anteriormente.

Preparo da reação de Maillard

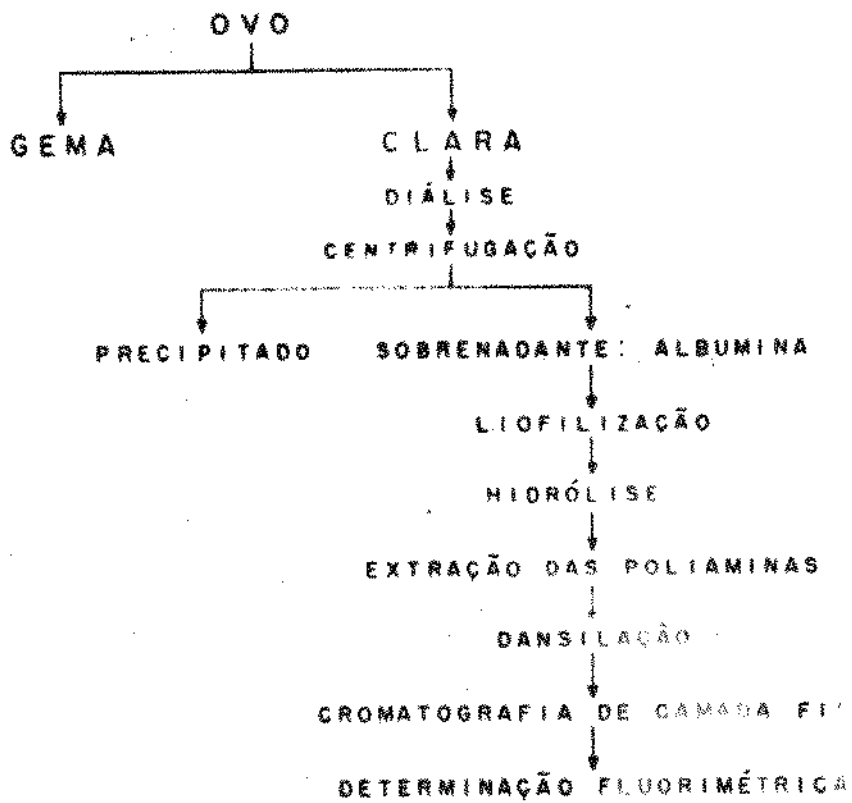
Sistema albumina do ovo/glicose

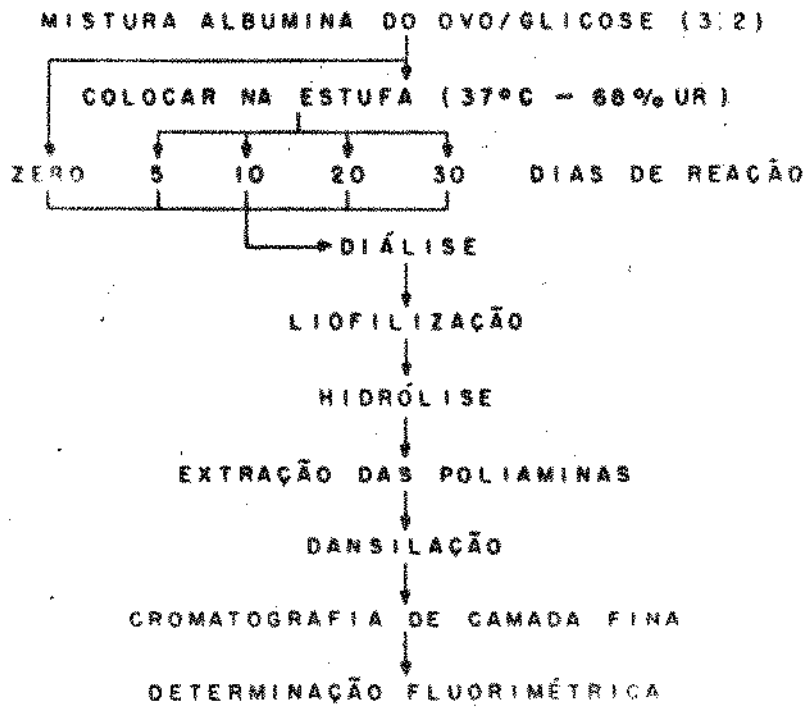
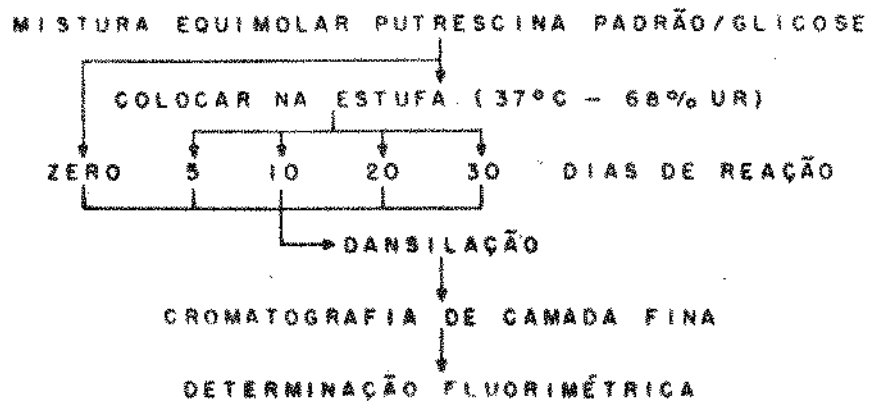
Uma mistura em pó de 3 partes de albumina do ovo e 2 partes de D-glicose (Tanaka et al., 1974) foi preparada e colocada por 5, 10, 20 e 30 dias na estufa a 37°C, em dessecador bem vedado e com uma umidade relativa constante de 68% obtida com uma solução de ácido sulfúrico a 39% (P/P). A porção da mistura correspondente ao tempo zero de reação foi guardada em congelador (-20°C) até ser usada. Ao fim de cada tempo, a mistura foi dialisada contra água destilada, em câmara fria (4°C) por 36 horas. Após a liofilização do dialisado, uma quantidade do pó correspondente a 200 mg de albumina foi hidrolisada com 15 ml de HCl 6N a 110°C, sob atmosfera de nitrogênio, por 16 horas, e as poliaminas foram extraídas, dansiladas e determinadas fluorimetricamente como descrito anteriormente.

Sistema poliamina pura/glicose

Uma mistura equimolar de putrescina padrão e D-glicose foi deixada reagir, como descrito para o sistema albumina do ovo/glicose, por zero, 5, 10, 20 e 30 dias. Após cada tempo de reação, a mistura foi dissolvida em volume conhecido de HCl 10⁻³N, e alíquotas desta solução foram tomadas para a dansilação e determinação fluorimétrica da putrescina, como descrito anteriormente.

A seguir, é apresentado o fluxograma dos métodos empregados na determinação fluorimétrica e testes da reatividade das poliaminas na reação de Maillard:

DETERMINAÇÃO DAS POLIAMINAS DA CLARA DO OVO

TESTE DA REATIVIDADE DAS POLIAMINAS NA REAÇÃO DE MAILLARDSISTEMA ALBUMINA DO OVO/GLICOSESISTEMA POLIAMINA PURA/GLICOSE

Determinação de proteína

Para a determinação de proteína na fração correspondente às albuminas liofilizadas extraídas da clara do ovo, foi usado o método de Kjeldahl (A.O.A.C., 1975), tomando o fator de conversão igual a 6,25:

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Até o presente, não é do nosso conhecimento a publicação de trabalho a respeito das poliaminas da clara do ovo. Portanto, a escolha da dansilação como método de determinação das poliaminas foi baseada nos seguintes itens:

- a) a reação é quantitativa e rápida;
- b) o excesso do reagente (cloreto de dansilo) é facilmente separado dos produtos da reação;
- c) os produtos da reação são altamente fluorescentes e podem ser detectados nos cromatogramas em concentrações extremamente baixas;
- d) a polaridade dos produtos da reação é relativamente baixa sendo, portanto, facilmente extraídos da fase aquosa por solventes orgânicos;
- e) a dansilação tem sido usada com êxito na determinação das poliaminas em vários tipos de materiais, incluindo cérebro e fígado de rato (Seiler et al., 1971), urina humana (Fleisher et al., 1975), ovos de D.melanogaster (Dion et al., 1970), e virus (Bachrach et al., 1974).

Quantificação das poliaminas

A figura 5 é o desenho de uma placa cromatográfica típica mostrando a resolução e clareza dos derivados dansilados das poliaminas encontrados na clara do ovo. Os valores de R_F são apresentados na tabela 5. Como pode ser visto, houve boa separação entre os derivados dansilados das poliaminas, como também, entre os derivados dansilados da amônia e putrescina, indicando assim que a reação de dansilação, nas condi-

TABELA 5

Valores de R_F dos Derivados Dansilados das Poliaminas da Clara do Ovo e da Amônia

Derivados Dansilados	Valores de R_F
Amônia	0,42
Putrescina	0,34
Espermidina	0,20
Espermina	0,18

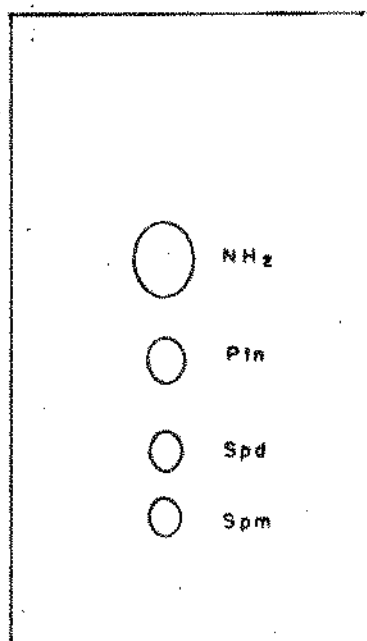


FIGURA 5 - DESENVOLVIMENTO CROMATOGRÁFICO DOS DERIVADOS DANSILADOS DA AMÔNIA (NH₂), PUTRESCINA (Pin), ESPERMIDINA (Spd) E ESPERMINA (Spm).

ções por nós empregadas, deu origem a derivados fluorescentes eficientemente separados por cromatografia de camada fina.

As curvas de calibração para as poliaminas são apresentadas na figura 6. Existe uma relação linear entre a fluorescência relativa e a concentração das poliaminas numa faixa de aproximadamente 2 e 12×10^{-11} moles de putrescina, espermidina e espermina dansiladas.

O resultado da determinação fluorimétrica das poliaminas da clara do ovo pode ser visto na tabela 6. Os valores médios e os desvios-padrão ($\mu\text{g/g}$ albumina seca) foram: putrescina, $11,62 \pm 0,27$; espermina, $13,93 \pm 0,71$; espermidina, $27,16 \pm 1,07$. A tabela 6 mostra, também, os níveis das poliaminas de outras fontes proteicas, obtidos na literatura (Wang, 1972 e Moruzzi et al., 1964). O teor de poliaminas da clara do ovo supera (praticamente é o dobro) apenas o da soja, sendo bem inferior ao dos cereais. Em todas as fontes citadas na tabela 6, o conteúdo de espermidina é o mais elevado, seguindo-se a espermina e, finalmente, a putrescina que é a poliamina presente em menor quantidade, exceto no trigo e soja onde se apresenta em níveis bem próximos ao da espermina, e na cevada onde está presente em quantidade um pouco maior que a espermina. Apesar do teor de poliaminas da clara do ovo ser baixo, o fato de que elas possam se associar com lípidos, ácidos nucleicos e outros componentes aniônicos das células (Raina et al., 1975), além de serem encontradas em altas concentrações nas células embrionárias durante o desenvolvimento do embrião de galinha (Caldarera et al., 1965), não podemos desprezar a sua importância biológica.

Participação das poliaminas na reação de Maillard

Quando a albumina do ovo foi armazenada no estado "seco" à temperatura de 37°C , ficou demonstrado que as polia-

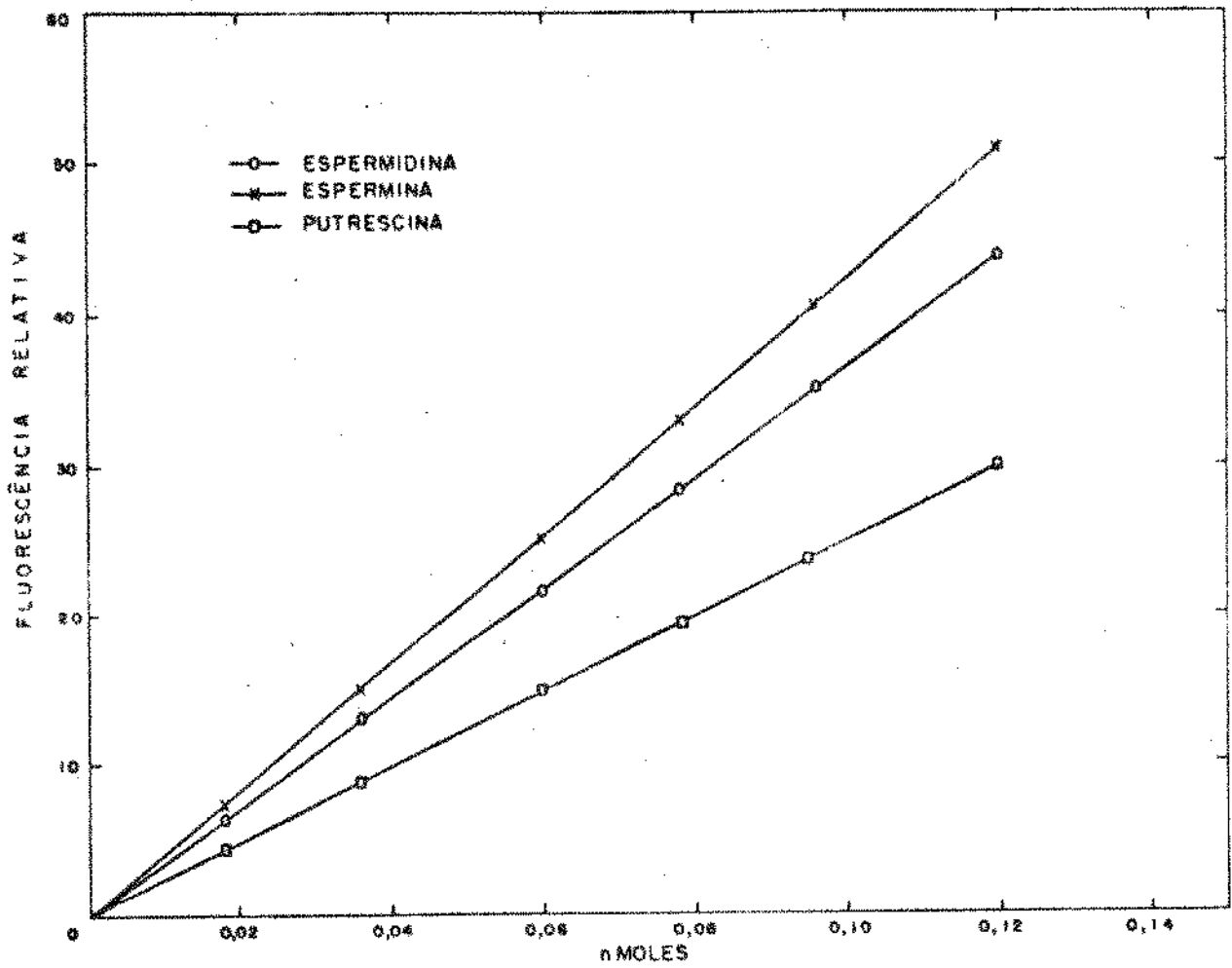


FIGURA 6 - CURVAS PADRÕES DA FLUORESCÊNCIA E CONCENTRAÇÃO DOS DERIVADOS DANSI-
LADOS DA PUTRESCINA, ESPERMIDINA E ESPERMINA.

TABELA 6

Conteúdo de Poliaminas da Clara do Ovo Comparado com o de Outras Fontes Proteicas

Material ^a	Poliaminas			Total
	Putrescina	Espermina	Espermidina	
Clara do Ovo	11,62 [±] 0,27 ^b	13,93 [±] 0,71	27,16 [±] 1,07	52,71 µg/g albumina seca
	89,38 [±] 2,07 ^c	107,17 [±] 5,46	208,92 [±] 8,23	405,45µg/g N total
Soja	6,6	5,7	16,4	28,7 µg/g farinha
Cevada	136	128	291	555 µg/g gêrmen fresco
Arroz	69	141	153	363 µg/g gêrmen fresco
Aveia	53	109	307	469 µg/g gêrmen fresco
Milho	12	90	124	226 µg/g gêrmen fresco
Trigo	43	41	254	338 µg/g gêrmen fresco
Sorgo	14	21	83	118 µg/g gêrmen fresco

^aOs valores para a soja são de Wang (1972), e para os cereais são de Moruzzi e Caldarera (1964).

^bOs dados das poliaminas da clara do ovo representam a média de seis (6) determinações fluorimétricas \pm desvio padrão.

^cO teor de proteína encontrado para a fração albumina foi 81,37 \pm 0,09%.

minas, a ela associadas, são capazes de reagir com a glicose livre. Assim, os aminoácidos (livres e proteicos) não são os únicos compostos biologicamente importantes a reagirem nas condições brandas da reação de Maillard.

A reatividade das poliaminas na reação de Maillard pode ser observada através dos dados da tabela 7. Houve uma grande queda na quantidade de poliaminas durante a reação de Maillard, mesmo nos primeiros 5 dias onde o valor encontrado para as poliaminas totais (29,13 µg/g albumina seca) representa apenas 57% do inicial (51,25 µg/g albumina seca). A espermidina apresenta um decréscimo mais marcante que a espermina e putrescina, indicando ser a poliamina de maior reatividade dentro do sistema aqui usado. Comparando estes dados com os apresentados por Tanaka et al. (1974) sobre os efeitos da reação de Maillard na qualidade da proteína (tabela 8), nota-se que a perda das poliaminas nesta reação acompanha as alterações do valor nutricional da ovalbumina Maillard, principalmente quando são levados em conta os valores do PER que caíram para 37%, 20% e 13% do valor inicial ($3,62 \pm 0,25$) nos primeiros 10, 20 e 30 dias de reação, respectivamente, enquanto que os níveis de poliaminas baixaram para 32%, 20% e 14% do valor inicial (51,25 µg/g albumina seca) no mesmo intervalo. A figura 7 é uma representação gráfica dos dados apresentados na tabela 7 e mostra, claramente, a queda do nível das poliaminas da clara do ovo até os primeiros 30 dias de reação com a glicose a 37°C.

A tabela 9 mostra os resultados da reação da putrescina padrão com a glicose. Como pode ser visto, o nível de putrescina caiu para 42%, 23%, 14% e 10% do valor inicial ($24,96 \pm 0,76$ µg/g albumina seca) nos primeiros 5, 10, 20 e 30 dias de reação, respectivamente, enquanto que a putrescina da clara do ovo baixou para 57%, 36%, 26% e 18% do valor inicial ($11,73 \pm 0,35$ µg/g albumina seca) no mesmo intervalo (tabela 7). Através da observação da figura 8, onde estão re-

TABELA 7

Perda das Poliaminas Durante a Reação de Maillard. Sistema Albumina/Glicose (37°C)

Poliaminas	Recuperação (µg/g albumina seca) Com o Tempo de Reação ^a				Teste t ^b	
	0 Dias	5 Dias	10 Dias	20 Dias		30 Dias
Espermidina	26,30 [±] 1,13	13,75 [±] 0,57	7,25 [±] 0,32	4,38 [±] 0,17	3,18 [±] 0,12	0>>>5>>>10>>20<30
		(52) ^c	(28)	(17)	(13)	
Espermina	13,22 [±] 0,27	8,75 [±] 0,45	5,13 [±] 0,28	2,89 [±] 0,14	1,46 [±] 0,08	0>>>5>>>10>>20>30
		(63)	(39)	(22)	(11)	
Putrescina	11,73 [±] 0,35	6,63 [±] 0,21	4,25 [±] 0,13	3,00 [±] 0,09	2,13 [±] 0,06	0>>>5>>>10>>>20>>30
		(57)	(36)	(26)	(18)	
Total	51,25	29,13	16,63	10,27	6,97	
		(57)	(32)	(20)	(14)	

^aEstes dados representam a média de seis (6) determinações fluorimétricas⁺-desvio padrão.

^bTeste t de Student: (>) diferença significativa em $p < 0,05$. (>>) diferença significativa em $p < 0,01$. (>>>)diferenças significativas em $p < 0,001$. As diferenças não significativas são indicadas pelos sinais invertidos.

^cOs números entre parêntesis indicam as porcentagens de recuperação das poliaminas em relação ao valor inicial (100%).

TABELA 8

Variações do Valor Nutricional da Ovalbumina Durante o Armazenamento com a Glicose

Métodos	0 Dias	10 Dias	20 Dias	30 Dias	40 Dias
Índice EAA ^a	100	92,6	87,3	85,6	81,1
Índice Proteico	100	96,5	86,5	83,2	76,7
Índice Químico	100	91,7	83,4	77,0	68,5
Índice PDR	100	72,2	58,9	55,6	50,2
Lisina Disponível (g/16g N)	7,37	4,98	4,12	3,56	3,97
VB (%)	90,1 [±] 2,01	44,5 [±] 5,0	34,3 [±] 1,8	29,1 [±] 2,5	23,7 [±] 2,9
PER	3,62 [±] 0,25	1,32 [±] 0,29	0,72 [±] 0,16	0,47 [±] 0,15	0,193
Digestibilidade Real (%)	95,9 [±] 1,4	82,8 [±] 4,2	80,1 [±] 3,1	74,8 [±] 3,1	74,9 [±] 3,3

Fonte: Tanaka et al. (1974).

^aEAA: aminoácidos essenciais; PDR: resíduo de digestão com pepsina; PPD: digestibilidade com o sistema pepsina-pancreatina; VB: valor biológico; PER: coeficiente de eficiência proteica.

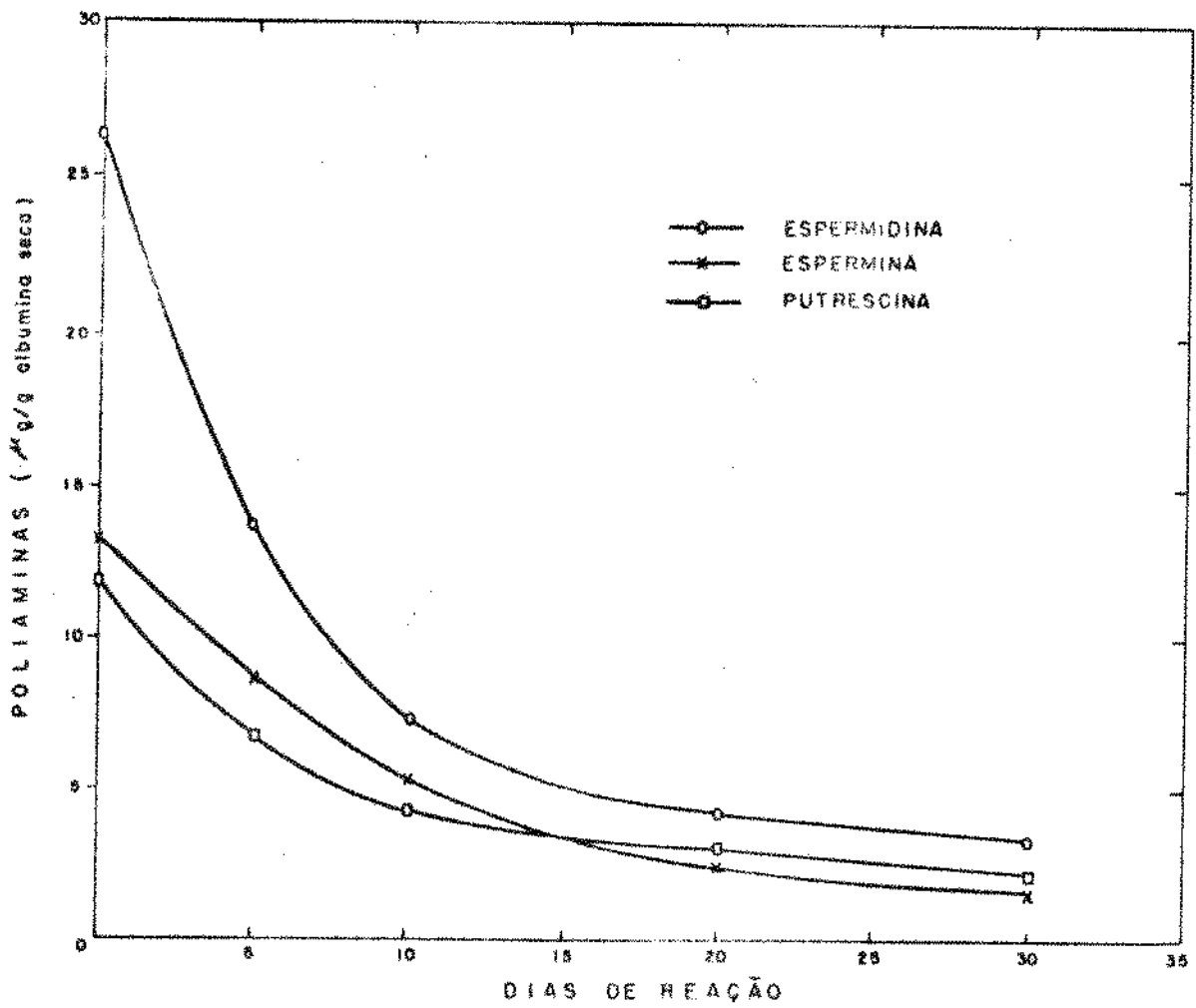


FIGURA 7 - PERDA DAS POLIAMINAS NA ALBUMINA DO OVO DURANTE A REAÇÃO DE MAILLARD A 37°C.

TABELA 9

Reação de Maillard de uma Poliamina Pura. Sistema Putrescina Padrão/Glicose (37°C)

Poliamina	Recuperação (µg/g albumina seca) Com o Tempo de Reação ^a				Teste t ^b	
	0 Dias	5 Dias	10 Dias	20 Dias 30 Dias		
Putrescina	24,96 [±] 0,76	10,48 [±] 0,31	5,74 [±] 0,18	3,49 [±] 0,11	2,50 [±] 0,08	0>>>5>>>10>>>20<<30
		(42) ^c	(23)	(14)	(10)	

^aEstes dados representam a média de seis (6) determinações fluorimétricas[±]desvio padrão.

^bTeste t de Student: (>) diferença significativa em $p < 0,05$. (>>) diferença significativa em $p < 0,01$. (>>>) diferença significativa em $p < 0,001$. As diferenças não significativas são indicadas pelos sinais invertidos.

^cOs números entre parêntesis indicam as porcentagens de recuperação das poliaminas em relação ao valor inicial (100%).

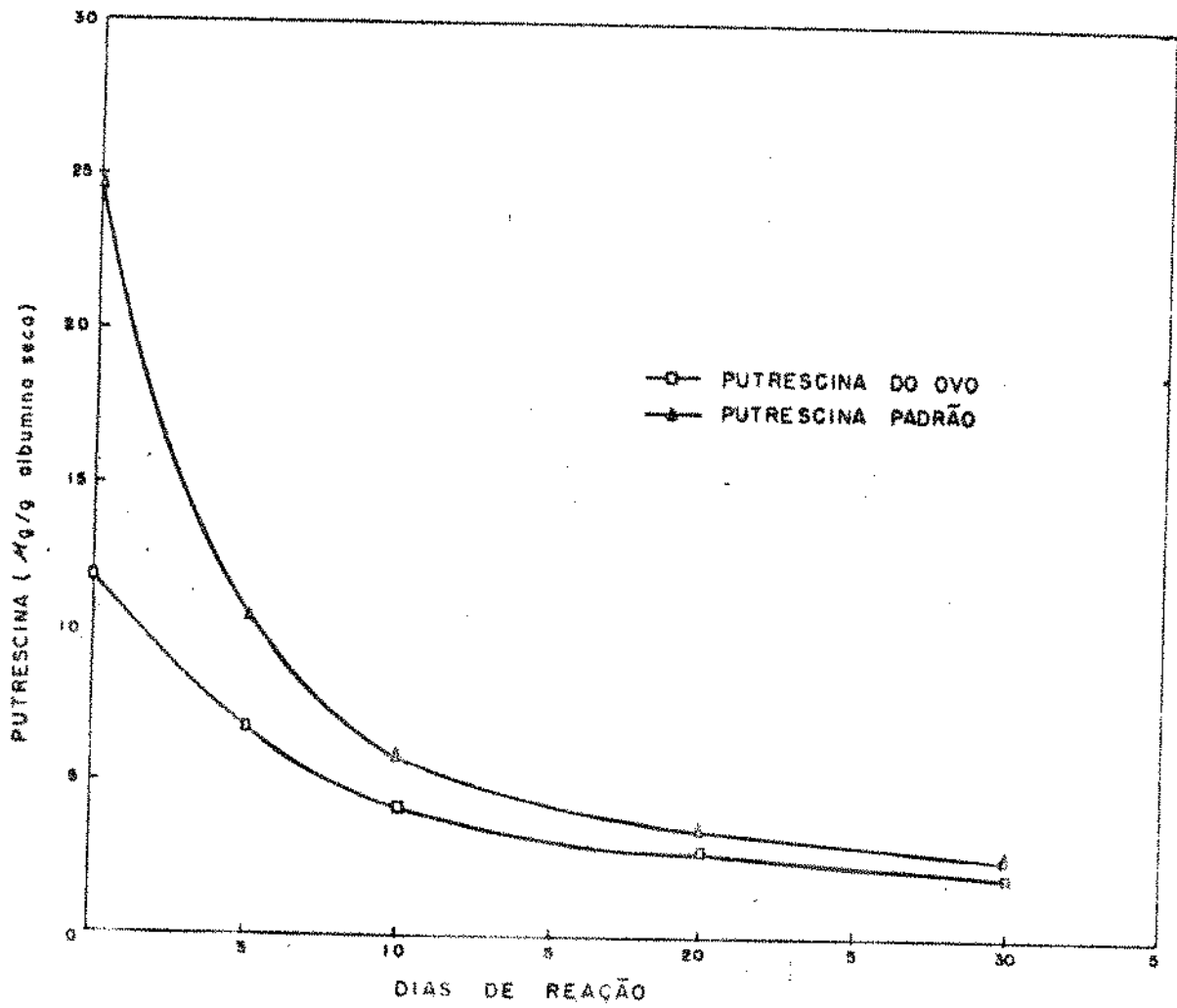


FIGURA 8 - PERDA DA PUTRESCINA DA CLARA DO OVO EM COMPARAÇÃO COM A PUTRESCINA PADRÃO DURANTE A REAÇÃO COM A GLICOSE.

presentados graficamente os dados das tabelas 2 e 3 para a putrescina, fica claro que a putrescina padrão apresenta um decréscimo mais acentuado que a putrescina da clara do ovo. Esta diferença no desaparecimento da putrescina livre e a associada a albumina, pode ser o resultado de reatividades diferentes com a glicose ou, então, trata-se da regeneração parcial da poliamina na clara do ovo durante a hidrólise ácida, como acontece com os compostos açúcar-aminoácido (Tanaka et al., 1974).

Teor de proteína da fração albumina

O teor de proteína correspondente à fração albumina da clara do ovo dialisada, determinado neste trabalho, foi de $81,37 \pm 0,09\%$, valor este coerente com o da albumina do ovo comercial. Expressa em base de nitrogênio total, a soma das poliamina atingiu o valor de $405,45 \mu\text{g/g}$ de nitrogênio (tabela 6), mostrando que elas se encontram na clara do ovo em quantidades da ordem de 50 a 100 vezes inferiores às dos aminoácidos mais escassos da proteína.

CONCLUSÕES

A aplicação de um método para a detecção de poliaminas na clara do ovo e o estudo da capacidade destes compostos reagirem com a glicose nos levaram às seguintes conclusões:

- 1- Foi confirmada a presença de putrescina, espermidina e espermina em associação com a clara do ovo de galinha em quantidades que variam entre 11 e 27 $\mu\text{g/g}$ albumina seca.
- 2- Verificou-se que as poliaminas associadas à clara do ovo, ou seja, aquelas que não foram eliminadas no processo de diálise, reagiram com relativa facilidade com a glicose (reação de Maillard) a 37°C no estado "seco", mesmo nos primeiros cinco dias de armazenamento.
- 3- Foi observada estreita relação entre a perda das poliaminas e a queda do valor nutritivo da proteína Maillard. Embora a perda da digestibilidade e de aminoácidos essenciais, publicada por Tanaka et al. (1974), guarde relação menos próxima com o decréscimo do valor nutritivo da proteína, os resultados de nossas experiências não são suficientes para afirmar que a perda das poliaminas seja fator decisivo na diminuição do valor nutritivo da clara do ovo Maillard.
- 4- A reação, com a glicose, das poliaminas associadas à clara do ovo foi comprovada usando-se um sistema de putrescina padrão. Encontrou-se menor reatividade aparente da putrescina no estado associado podendo esta diferença ser explica

da, talvez, pela regeneração parcial da poliamina durante a hidrólise ácida da proteína Maillard.

- 5- Foi necessário modificar, entre outras, as condições de pH (9,0-10,0) da reação de dansilação bem como a mistura de solventes (ciclohexanoetilacetato, 3:2) para o desenvolvimento cromatográfico, com a finalidade de se obter um sistema eficiente para a determinação das poliaminas da clara do ovo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMAYA-F., J. 1974. The Maillard reaction of proteins. Ph. D. dissertation. University of Rhode Island, Kingston, R. I. 02881.
- AMAYA-F., J., LEE, T.C. e CHICHESTER, C.O. 1967. Biological inactivation of proteins by the Maillard reaction. Effect of mild heat on the tertiary structure of insulin. *J.Agric. Food Chem.* 24: 465-467.
- AMES, B.N., DUBIN, D.T. e ROSENTHAL, S.M. 1958. Presence of polyamines in certain bacterial viruses. *Science*, New York 127:814-816.
- A.O.A.C. 1975. Official Methods of Analysis. Horwitz, W. ed., 12th ed., Washington, D.C.. 1094 p.
- BACHRACH, U. 1973. Function of naturally occurring polyamines. New York and London, Academic Press.
- BACHRACH, U., DON, S. e WIENER, H. 1974. Occurrence of polyamines in myxoviruses. *J. Gen. Virol.* 22:451-454.
- BASSO, L.C. e SMITH, T.A. 1974. Effect of mineral deficiency on amine formation in higher plants. *Phytochemistry* 13:875-883.
- CALDARERA, C.M., BARBIROLI, B. e MORUZZI, G. 1965. Polyamines and nucleic acids during development of the chick embryo. *Biochem. J.* 97:84-88.
- CROCOMO, O.J. e BASSO, L.C. 1974. Accumulation of putrescine and related amino acids in potassium deficient Sesamum. *Phytochemistry* 13:2659-2665.

- DENTON, M.D., GLAZER, H.S., ZELLNER, D. C. e SMITH, F. G. 1973. Gas-chromatographic measurement of urinary polyamines in cancer patients. Clin. Chem. 19:904-907.
- DE ROSE, M., DE ROSA, S. e GAMBACORTA, A. 1976. Occurrence and characterization of new polyamines in the extreme thermophile Caldariella acidophila. Biochem. Biophys. Res. Commun. 69:253-261.
- DION, A.S. e HERBST, E. J. 1970. Polyamine changes during development of Drosophila melanogaster. Ann. N. Y. Acad. Sci. 171:723-734.
- FLAVIN, M. 1954. The isolation and characterization of cysteic acid peptides in studies on ovalbumin synthesis. J. Biol. Chem. 211:375-390.
- FLEISHER, J. H. e RUSSELL, D.H. 1975. Estimation of urinary diamines and polyamines by thin-layer chromatography. J. Chromatogr. 110:335-340.
- GIBSON, W. e ROIZMAN, B. 1971. Compartmentalization of spermine and spermidine in the herpes simplex virion. Proc. Natl. Acad. Sc. USA 68:2818-2821.
- GOTTSCHALK, A. e GRAHAM, E.R. 1966. The basic structure of glycoproteins. Em: The proteins. Composition, structure and function. 2nd. ed., New York and London, Academic Press, Vol. 4. p.113-125.
- HAMMOND, J. E. e HERBST, E.J. 1968. Analysis of polyamines by thin-layer chromatography. Anal. Biochem. 22:474-484.

- HERBST, E.J. e SNELL, E.E. 1949. Putrescine and related compounds as growth factors for Hemophilus parainfluenzae 7901. J. Biol. Chem. 181:47-54.
- HODGE, J.E. 1953. Dehydrated foods. Chemistry of browning reactions in model systems. Agric. Food Chem. 1:928-943.
- INOUE, M. e PARDEE, A.B. 1970. Requirement of polyamines for bacterial division. J. Bacteriol. 101:770-776.
- JANNE, J., RAINA, A. e SIIMES, M. 1964. Spermidine and spermine in rat tissues at different ages. Acta Physiol. Scand. 62:352-358.
- JOHNSON, M.W. e MARKHAM, R. 1962. Nature of the polyamine in plant viruses. Virology 17:276-281.
- KHAWAJA, J.A. e RAINA, A. 1970. Effect of spermine on the attachment of free ribosomes to endoplasmic reticulum membranes "in vitro". Biochem. Biophys. Res. Commun. 41:512-518.
- MARSHALL, R.D. e NEUBERGER, A. 1972. Hen's egg albumin. Em: Glycoproteins. Their composition, structure and function. Amsterdam, London, New York, Elsevier Publishing Company, Vol. 5 B. p.732-761.
- MARTON, L.J., RUSSELL, D.H. e LEVY, C.C. 1973. Measurement of putrescine, spermidine, and spermine in physiological fluids by use of an amino acid analyzer. Clin. Chem. 19:923-926.
- MARTON, L.J., HEBY, O. e WILSON, C.B. 1974. Increased polyamine concentrations in the cerebro-spinal fluid of patients with brain tumors. Int. J. Cancer 14:731-737.

- MILSTEIN, C.P. 1968. An application of diagonal electrophoresis to the selective purification of serine phosphate peptides. Serine phosphate peptides from ovalbumin. *Biochem. J.* 110:127-134.
- MONTGOMERY, R. 1970. Glycoproteins. Em: The carbohydrates. Chemistry and biochemistry. 2nd ed., New York and London, Academic Press, Vol. 2 B. p. 628-657.
- MONTGOMERY, R. 1972. Heterogeneity of the carbohydrate groups of glycoproteins. Em: Glycoproteins. Their composition, structure and function. Amsterdam, London, New York, Elsevier Publishing Company, Vol. 5 A. p. 518-528.
- MORRIS, D. R. e PARDEE, A. B. 1966. Multiple pathways of putrescine biosynthesis in Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* 241: 3129-3135.
- MORUZZI, G. e CALDARERA, C.M. 1964. Occurrence of polyamines in the germs of cereals. *Arch. Biochim. Biophys.* 105:209-210.
- OSHIMA, T. 1975. Thermine: A new polyamine from an extreme thermophile. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 63:1093-1098.
- RAINA, A. 1963. Studies on the determination of spermidine and spermine and their metabolism in the developing chick embryo. *Acta Physiol. Scand.* 62: 352-358.
- RAINA, A., JANNE, J. e SIIMES, M. 1966. Stimulation of polyamine synthesis in relation to nucleic acids in regenerating rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* 123:197-201.

- RAINA, A. e JANNE, J. 1975. Physiology of the natural polyamines putrescine, spermidine and spermine. Rev. Art. Med. Biol. 53:121-147.
- ROMANOFF, A. L. e ROMANOFF, A. J. 1963. The Avian egg. 2nd ed., New York, Wiley.
- RUSSEL, D.H. e RUSSEL, S. D. 1975. Relative usefulness of measuring polyamines in serum, plasma, and urine as biochemical markers of cancer. Clin. Chem. 21:860-863.
- SEILER, N. 1970. Use of dansyl reaction in biochemical analysis. Em: Methods of biochemical analysis. New York, London, Sydney and Toronto, Interscience Publishers, Vol. 18. p. 259-337.
- SEILER, N. e ASKAR, A. 1971. A micro method for the quantitative estimation of putrescine in tissues. J. Chromatogr. 62:121-127.
- SGARBIERI, V. C., AMAYA - F., J., TANAKA, M. e CHICHESTER, C. O. 1973. Response of rats to amino acid supplementation of brown egg albumin. J. Nutr. 103:1731-1738.
- SMITH, T. A. 1970. Putrescine, spermidine and spermine in higher plants. Phytochemistry 9:1479-1486.
- STADELMAN, W. J. e COTTERILL, O. J. 1973. Egg science and technology. Westport, Connecticut, AVI Publishing Company.
- STEVENS, L. 1970. The biochemical role of naturally occurring polyamines in nucleic acid synthesis. Biol. Rev. 45:1-27.

- TABOR, H. 1962. The protective effect of spermine and other polyamines against heat denaturation of deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* 1:496-501.
- TABOR, H. e TABOR, C.W. 1964. Spermidine, spermine and related amines. *Pharmacol. Rev.* 16:245-300.
- TANAKA, M. AMAYA - F., J. LEE, T.C. e CHICHESTER, C.O. 1974. Effects of the browning reaction on the quality of protein. *Proc. IV Int. Congress Food Sci. And Technol.* 1:632-640.
- TANAKA, M., LEE, T.C. e CHICHESTER, C.O. 1975. Nutritional consequences of the Maillard reaction. The absorption of fructose-1-tryptophan in the large intestine of the rat. *J. Nutr.* 105:989-994.
- TANAKA, M., KIMIAGAR, M., LEE T.C. e CHICHESTER, C.O. 1977. Effect of Maillard browning on nutritional quality of protein. Em: Protein crosslinking - B. Nutritional and medical consequences. New York, Plenumm Publishing Corporation. p. 321-341.
- THE MERCK INDEX of CHEMICALS and DRUGS. 1960. 7th ed., Rathaway, N. J., Merck & Co.
- WANG, L. C. 1972. Polyamines in soybeans. *Plant Physiol.* 50:152-156.
- WANG, L.C. e SELKE, E. 1973. Soybean polyamines. Separation and characterization of cadaverine. *Plant Physiol.* 51:432-435.