

EDMAR CLEMENTE

**EFEITO DO LAURIL SULFATO DE SÓDIO NA SOLUBILIZAÇÃO DE  
PROTEÍNAS VISANDO A DETERMINAÇÃO DE TRIPTOFANO**

Tese apresentada ao Departamento de  
Ciência dos Alimentos da Escola Superior  
de Agricultura de Lavras como parte dos  
requisitos necessários para a obtenção do  
grau de Mestre em Ciências de Alimentos.

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS  
LAVRAS - MINAS GERAIS

1 9 8 6

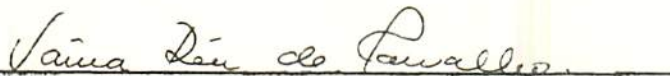


EFEITO DO LÁURIL SULFATO DE SÓDIO NA SOLUBILIZAÇÃO DE  
PROTEÍNAS VISANDO A DETERMINAÇÃO DE TRIPTOFANO

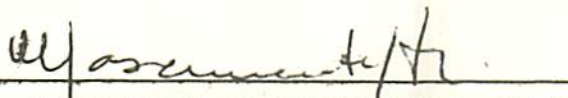
APROVADA:



PROF. DR. FÁBIO DE BORJA PORTELA  
ORIENTADOR



PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> VÂNIA DÉA DE CARVALHO



PROF. DR. PEREGRINO DO NASCTMENTO NETO

DEDICO

À minha esposa Lina Lúcia

Aos meus filhos Maria Carolina e Bruno

Aos meus pais Maria e Geraldo e

Minha irmã Edmea, pelo encorajamento e apoio, durante este trabalho.

## AGRADECIMENTOS

O autor deseja expressar seus agradecimentos:

À Escola Superior de Agricultura de Lavras (ESAL) através do Departamento de Ciência dos Alimentos, pela oportunidade concedida para a realização do curso de mestrado.

Ao Professor Fábio de Borja Portela pela incansável dedicação, estímulo e amizade na realização desta tese.

Aos Professores Maria Isabel Fernandes Chitarra e Adimilson Bosco Chitarra pelo incentivo e apoio.

Aos Professores e Técnicos do Departamento de Ciência dos Alimentos pela amizade e seu pronto atendimento às mais diversas solicitações.

Ao Professor Ruben Delly Veiga pelas valiosas sugestões na elaboração da análise estatística.

À Sementes Agrocere S.A. pelo fornecimento de sementes.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pelo suporte financeiro indispensável.

À Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão-FAEPE, pela ajuda financeira quando da impressão da tese.

À Sra. Selma Evangelista Haddad Ferreira pelo paciente trabalho de datilografia.

Aos colegas pelo repartir mútuo das alegrias e aflições.

A todos que, direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

## BIOGRAFIA

EDMAR CLEMENTE, filho de Geraldo Clemente e Maria Bernardina Clemente, nasceu no dia 29 de janeiro de 1951, em Lavras, Minas Gerais.

Concluiu o curso de 1º e 2º grau no Colégio Nossa Senhora Aparecida. Prestou vestibular na Universidade Federal de Juiz de Fora no ano de 1971, sendo aprovado em 1º lugar, graduando-se em Química em julho de 1978.

Durante o curso de graduação atuou como Professor de Química do 2º grau nos colégios: Instituto Estadual de Educação, Instituto Grambery, Colégio Euclides da Cunha, Colégio Cristo Redentor, Curso Integrado Euclides da Cunha (CIEC) e Curso de Aperfeiçoamento aos Vestibulares (CAVE), todos em Juiz de Fora-MG; Colégio Souza Ramos e Pré-Vestibular Colégio Souza Ramos em Bicas-MG.

Foi monitor do Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora-MG., de 1975 até 1977.

Foi professor colaborador do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Juiz de Fora, exercendo também a função de representante do Departamento no Colegiado do Curso de Ciências de agosto de 1978 até julho de 1979.

Foi professor Assistente do Departamento de Química das Faculdades Integradas da Região de Alfenas, autorizado pelo Conselho Estadual de Educação de acordo com o Parecer nº 418/81 publicado no Minas Gerais em 04 de agosto de 1981, no período de agosto de 1980 até fevereiro de 1983.

Em agosto de 1983, ingressou no curso de mestrado em Ciência dos Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos da Escola Superior de Agricultura de Lavras - Lavras - Minas Gerais, concluindo-o em outubro de 1985.

Aprovado em novembro de 1984, no concurso para Pesquisador II do Centro Nacional de Pesquisa de Defensivos Agrícolas - EMBRAPA - Campinas - SP.





3.2.5. Quantificação do triptofano .....	19
3.2.5.1. Obtenção do hidrolisado límpido ...	19
3.2.5.2. Determinação do triptofano .....	19
3.3. Delineamento experimental .....	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	34
4.1. Teor de proteína da variedade de milho AG-401 e da variedade de sorgo AG-1011 .....	34
4.2. Teor de triptofano da variedade de milho AG-401 ...	34
4.3. Teor de triptofano na variedade de sorgo AG-1011 ...	50
4.4. Teor de triptofano na caseína .....	64
5. CONCLUSÕES .....	77
6. RESUMO .....	79
7. SUMMARY .....	81
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	83
APÊNDICE .....	91

## LISTA DE QUADROS

QUADRO		Página
1	Delineamento experimental do milho AG-401 .....	22
2	Delineamento experimental do sorgo AG-1011 .....	26
3	Delineamento experimental da caseína Hammarsten..	30
4	Teor de proteína da variedade de milho AG-401 e da variedade de sorgo AG-1011 .....	34
5	Lisina e triptofano contidos no endosperma desengordurado do milho opaco 2 e opaco 2 modificado..	35
6	Teor de triptofano em várias amostras de milho ..	35
7	Teor de triptofano e de proteína no milho AG-401.	50
8	Valores de triptofano expressos com percentagem na base da matéria natural e na base da matéria seca .....	52
9	Teor de triptofano e de proteína no sorgo AG-1011	63

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA		Página
1	Curva de calibração de DL-triptofano, 20-160 $\mu$ g. Volume final 5 ml .....	14
2	Preparação do milho .....	15
3	Preparação do sorgo .....	18
4	Curva de absorção do triptofano (conc. 0,16 mg/ml).	21
5 a 16	Teor de triptofano em $\mu$ g/ml no hidrolizado de milho AG-401 .....	37
17	Tempo de hidrólise nos tratamentos: NaOH 0,10 N , NaOH 0,15 N a 75 $^{\circ}$ C e LSNa 4,5% .....	51
18 a 26	Teor de triptofano em $\mu$ g/ml no hidrolizado de sorgo AG-1011 .....	54
27 a 38	Teor de triptofano em $\mu$ g/ml no hidrolizado de caseína Hammarsten .....	65

## 1. INTRODUÇÃO

A produção mundial de alimentos não tem conseguido acompanhar o crescimento da população, principalmente nos países não desenvolvidos, onde as técnicas de produção de alimentos e principalmente a adoção de políticas insuficientes de armazenamento e distribuição, são ainda rudimentares e ineficientes, causando, principalmente na população jovem, a qual tem maiores requerimentos nutricionais, sérios problemas, levando a uma má formação orgânica e deficiência no desenvolvimento intelectual.

Nos últimos anos, a necessidade de ampliar o número de opções de alimentos e aumentar a produção de grãos para o consumo humano e animal, tem sido preocupação constante de pesquisadores ligados à área de Melhoramento Genético, não só o aumento de produção como também melhorar os níveis de proteínas nestes grãos.

As proteínas são definidas como polímeros macromoleculares, cuja unidade básica são os aminoácidos e sua molécula contém carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio e geralmente enxofre. Algumas contêm outros elementos adicionais, tais como o fósforo, ferro, zinco e cobre. A hidrólise química ou enzimática de proteínas purificadas comprova facilmente a estrutura aminoacídica destes compostos.

O estudo das proteínas, teve sua intensificação no início do século XX, com a descoberta de que elas se apresentam sob diferentes aminogramas nos alimentos e que a capacidade de promover o crescimento e manter o equilíbrio de nitrogênio do organismo não depende dos aminoácidos presentes nas proteínas. Dessas observações surgiu o termo valor biológico.

O valor biológico da proteína foi relacionado com a composição de seus aminoácidos, sendo este estudo iniciado por Hopkins, um pesquisador da Universidade de Cambridge.

Os aminoácidos foram então classificados em 3 grupos: o primeiro grupo corresponde aos aminoácidos essenciais; que devem ser veiculados pela dieta, pois o organismo não consegue sintetizá-los, ou a velocidade de síntese é insuficiente para suprir as necessidades orgânicas. O segundo grupo corresponde ao dos aminoácidos semi-essenciais, que, apesar de não serem essenciais, estão relacionados quimicamente a aminoácidos essenciais e na falta destes conseguem substituí-los, assim, a tirosina é intimamente relacionada com a fenilalanina, diferenciando-se desta pelo fato de um hidrogênio ser substituído por uma hidroxila; a cistina e a cisteína estão relacionadas quimicamente com a metionina, sendo esses três aminoácidos, os únicos de origem protéica que contêm enxofre em sua molécula. O grupo dos aminoácidos não essenciais é o terceiro grupo, e se constitui daqueles que o organismo pode prover a partir de cadeias hidrocarbonadas e grupos  $\text{NH}_2$ , não sendo portanto, do ponto de vista nutricional, um grupo que cause preocupações.

A determinação dos aminoácidos nos alimentos é de difícil execução; na determinação do triptofano, um aminoácido essencial temos alguns problemas, pois as etapas hidrolíticas ácidas afetam de forma crucial este aminoácido. As hidrólises enzimáticas são limitadas pelas condições da proteína, e esta técnica requer um longo período para a hidrólise, o que a coloca em desvantagem com outros métodos. A hidrólise alcalina oferece a vantagem de rapidez na sua execução; diversas variações existem quanto à esta técnica e o aprimoramento da mesma é de grande importância nos trabalhos de melhoramento genético. Pesquisadores que trabalham com melhoramento genético de cereais visando a qualidade nutricional das proteínas, terão mais uma técnica de determinação deste aminoácido essencial. Com este trabalho propõem-se um novo processo de solubilização, através de modificações da etapa hidrolítica de SESSA et alii (31), visando a determinação do triptofano, com mais rapidez, eficiência, sensibilidade e livre de interferência.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Extração e hidrólise

A hidrólise de proteínas ou polipeptídeos representa uma importante etapa na determinação dos aminoácidos presentes nas mesmas.

Os atuais métodos químicos para a determinação quantitativa de triptofano em alimentos de origem vegetal ou animal requerem uma hidrólise inicial do material e posterior quantificação do aminoácido. Os agentes hidrolisantes causam problemas como no caso de hidrólise ácida, na qual há destruição de alguns aminoácidos como a serina, a treonina e especialmente, o triptofano, LIU & CHANG (20).

A hidrólise enzimática é limitada pelas condições da proteína, isto é, se no estado ativo ou desnaturado. As enzimas proteolíticas têm sido usadas, mas apresentam sérias limitações visto que uma dada enzima não hidrolisa todas as proteínas. Este tipo de hidrólise foi melhorada com o uso de pronase, de acordo com SESSA et alii (31). Entretanto, esta técnica requer um período de até 24 horas o que constitui uma desvantagem em comparação com outros pro



cessos hidrolíticos, principalmente quando se deseja técnicas rápidas.

Em vista das desvantagens apresentadas pela hidrólise enzimática e ácida, a hidrólise alcalina oferece a vantagem de rapidez na sua execução. Diversas variações existem quanto à esta técnica e o melhoramento da mesma, tornando-a mais rápida para a determinação do triptofano é de grande interesse para a nutrição.

Desta maneira o estudo das condições de solubilização e hidrólise das proteínas de modo a tornar a determinação de aminoácidos mais rápida e/ou mais exata, será sempre de grande utilidade considerando-se a possibilidade de identificação de proteínas de alto valor biológico.

MILLER (25), desenvolveu um processo hidrolítico usando hidróxido de bário como agente hidrolisante. Porém este processo apresentou uma recuperação de apenas 80% para o milho e de 84% para o trigo, tornando-o de pouca utilidade. SLUMP & SCHRENDER (33) apesar de introduzirem em seu método uma coluna de Sephadex G-25 tornando-o caro e mais demorado, melhoram algumas etapas da hidrólise de MILLER (25). LOMBARD & LANG (21) apresentam um processo hidrolítico com solução de hidróxido de sódio, o qual apresenta etapas longas de operação, sendo que o tempo é um fator importante em termos analíticos. Uma outra variação é mostrada por VILLEGAS & MERTZ (44) apresentando hidrólise enzimática com a papaína utilizando tubo de ensaio, permitindo um grande número de análises por dia cujos resultados são usados na triagem de amostras no programa de melhoramento do valor biológico da proteína deste cereal no Internacional Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT). Entretanto a

obtenção da enzima torna difícil esta marcha analítica. A técnica de LIU & CHANG (20) tem um alto custo operacional, entretanto mostra um aspecto pouco utilizado por aqueles que têm trabalhado com a análise de triptofano em alimentos. Estes autores mostraram a conveniência do uso de detergente na solubilização de proteínas e esta é uma vantagem até aqui pouco utilizada. No entanto esta técnica requer o uso de colunas de troca iônica, limitando o seu uso em larga escala.

DANNO et alii (6) usaram o dodecilbenzosulfonato de sódio na solubilização de proteínas do trigo tendo conseguido solublizar até 78% do total de compostos nitrogenados.

WILLIAMS & BEVENUE (46) mostraram que potreínas de milho e de arroz tem sido extraídas com detergentes e que esta técnica permite o subsequente uso do sobrenadante em determinações químicas.

VILLEGAS & MERTZ (44) não utilizaram o detergente na etapa de solubilização e hidrólise, fizeram a utilização de hidróxido de sódio no ataque hidrolítico. Os trabalhos já conhecidos de DANNO et alii (6), LIU & CHANG (20), VAN SOEST (42), mostram a necessidade de um melhor estudo da solubilização de proteínas, visando facilitar a análise de triptofano.

VAN SOEST (43) utilizou o detergente laurilsulfato de sódio a 3% melhorando a etapa de extração de sua conhecida marcha analítica. Esta substância tem vantagem sobre outros detergentes pelo fato de ser facilmente encontrada. Em função da ampla adoção do método de VAN SOEST (42) tornou-se uma substância padrão na análise

se de alimento, tão comum quanto o ácido clorídrico e hidróxido de sódio. Conseqüentemente surge a necessidade de estudar o processo de extração de proteínas utilizando o lauril sulfato de sódio com vista à determinação do triptofano e outros aminoácidos.

## 2.2. Quantificação do triptofano

A determinação quantitativa do triptofano é usualmente feita por numerosos e diferentes métodos dentre os quais o procedimento colorimétrico de SPIES & CHAMBERS (36, 37); os procedimentos espectrofotométricos de GOODWIN & MORTON (10) e de BARMAN & KOSHLAND (5).

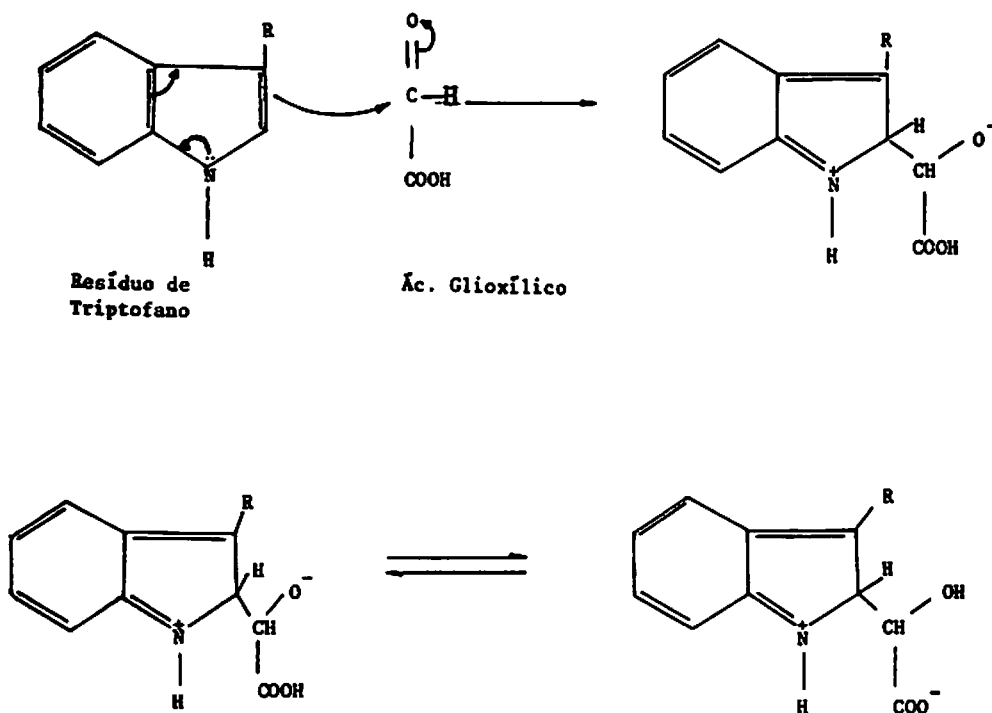
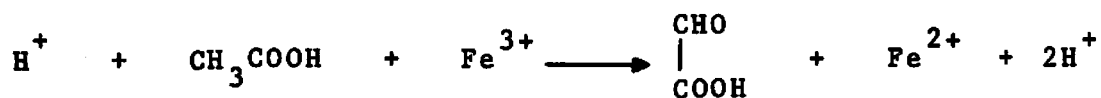
É interessante observar que o triptofano constitui cerca de 1% dos resíduos de aminoácidos na maioria das proteínas, descrito por SMITH (34).

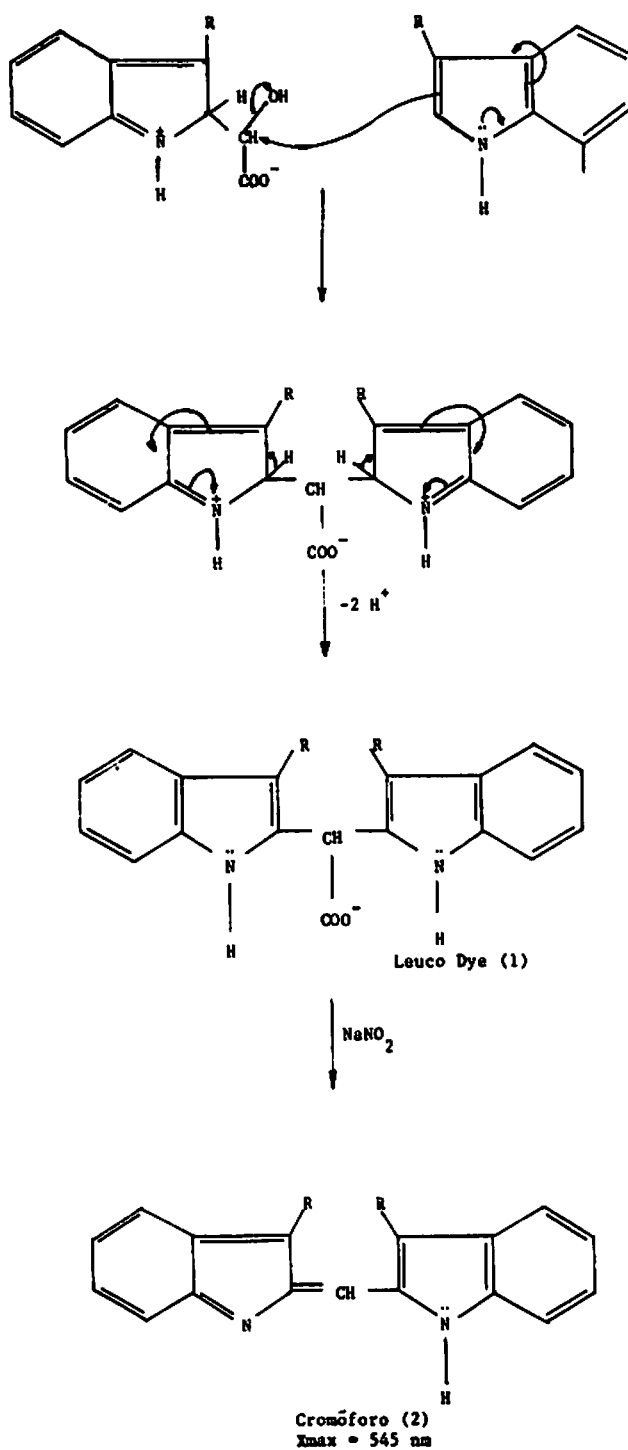
HERNANDEZ & BATES (13) mostraram uma relação entre triptofano e lisina de 1:4 em amostras de endosperma de milho. Assim além do conhecimento do teor de triptofano, a observação de HERNANDEZ & BATES (13) está sendo usada como índice para triagem na seleção de variedade deste cereal em vista a pouca exatidão e da morosidade na determinação de lisina total. Desta maneira somente aquelas amostras com uma alta percentagem de triptofano seriam submetidas a determinação de lisina total.

VILLEGAS & MERTZ (44) trabalham com uma técnica baseada na reação de Hopkins-Cole bastante simplificada, útil para determi

nações de número elevado de amostras, como atualmente realizadas no CIMMYT para a determinação do triptofano. O uso desta reação associada a uma melhor técnica de solubilização e hidrólise será útil nos trabalhos de melhoramento genético.

A reação de Hopkins-Cole (14) de acordo com OPIENSKA-BLAUTH et alii (28) se processa na presença de íon férrico em meio acético, com formação do ácido glioxílico. Este reage com o resíduo de triptofano da hidrólise proteica formando um cromóforo que absorve em 545 nm. O mecanismo proposto para explicar a formação do cromóforo é o seguinte:

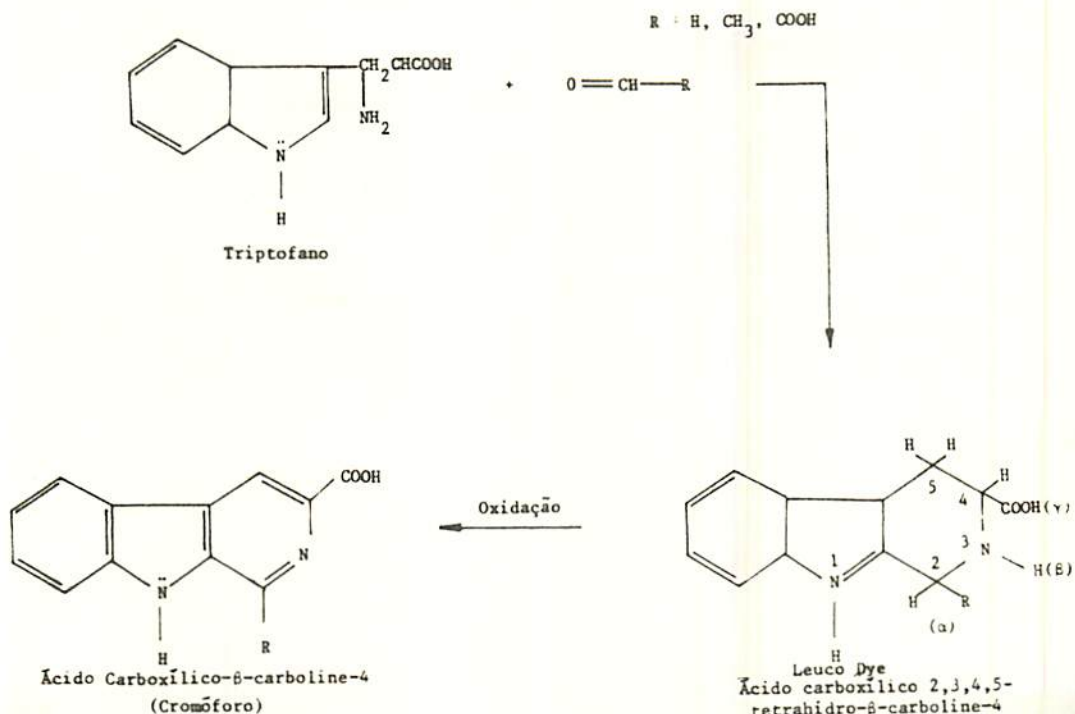




A reação de Hopkins-Cole (14) tem sido amplamente estudada e as equações acima mostradas constituem um possível mecanismo para explicar a formação do cromóforo que absorve em 545 nm. Este composto sendo formado de duas moléculas de resíduos de triptofano e uma de ácido glioxílico. O leuco corante inicialmente formado é oxida-

do a um cromóforo estável pelo nitrito de sódio ou outro agente oxidante. É interessante observar que este cromóforo estável, parece-se com o cromóforo da reação de ninhidrina com aminoácidos (Purpura de Ruheman) que absorve luz no visível conforme FRIEDMAN & SIEGEL (9); NEUZIL et alii (27).

É importante observar que aldeídos como o metanal, etanal e também o ácido glioxílico formam derivados "tetrahydro carboline" com a molécula integral do triptofano. Esta reação ocorre envolvendo o grupo amínico do triptofano e portanto não deve reagir com o resíduo deste aminoácido a não ser que o triptofano seja N-terminal. A presença do derivado "tetrahydro carboline" foi demonstrada por HARVEY et alii (12), bem como por JACOBS & CRAIG (16). A estrutura do composto cromóforo resultante da oxidação ainda não foi devidamente estabelecida. Porém admite-se o seguinte mecanismo para a reação:



VILLEGAS & MERTZ (44) e SESSA et alii (31) não fazem nenhuma observação quanto à formação de outros aldeídos a não ser o ácido glioxílico.

SESSA et alii (31) também usaram a reação de Hopkins-Cole para determinar triptofano. É provável que o estudo da solubilização das proteínas modificando-se a solução alcalina pela incorporação de detergente melhore a referida técnica. Dados do efeito da incorporação desta substância nas soluções para determinação deste aminoácido, não são conhecidas na literatura numa técnica simples e acessível. Uma técnica incorporando a marcha analítica de SESSA et alii (31) acrescida de aquecimento em banho-maria em diferentes temperaturas com variação do tempo, e a subsequente dosagem do aminoácido, será de utilidade nos processos de melhoramento genético de cereais. Portanto é de grande importância o estudo da viabilidade de diminuição do tempo de extração e posterior quantificação do aminoácido referido.

As modificações que se propôs neste experimento poderão fornecer melhoramentos da técnica desenvolvida por SESSA et alii (31) de pouco custo e de fácil adaptação às mais simples condições laboratoriais.

Outras técnicas de determinação do triptofano são conhecidas com as de BAKRI & CARLSON (4), HOWE et alii (15), LIU & CHANG (20), KNOX et alii (18), SPIES & CHAMBERS (36), LOMBARD & LANG (21), ANDERSON & CLYDESDALE (2), GRUEN & NICHOLLS (11), MATSUBARA & SASAKI (24), PENKE et alii (29), DE VRIES et alii (7), etc. As referidas técnicas apresentam sofisticação quanto a aparelhos eletrônicos, etapas hidrolíticas de grande operosidade, algumas che-

gam a afetar a estrutura do aminoácido. Sendo técnicas executadas em laboratórios de maior complexidade.

A reação de Hopkins-Cole pela sua simplicidade é quemais se presta às nossas condições de trabalho. Assim estudaremos o efeito da solubilização das proteínas de alimentos vegetais e seu efeito na quantificação do triptofano pela modificação da extração hidrolítica da técnica de SESSA et aliî (31).



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado nos laboratórios do Departamento de Ciência dos Alimentos da Escola Superior de Agricultura de Lavras (ESAL) - Lavras, MG.

#### 3.1. Material

As variedades analisadas foram: milho AGROCERES - AG - 401 e sorgo AGROCERES AG-1011, fornecidas pela Sementes AGROCERES S.A.

Os reagentes utilizados neste estudo foram DL-triptofano, éter de petróleo, hidróxido de sódio, cloreto férrico hexaidratado, lauril sulfato de sódio, ácido sulfúrico conc., ácido acético glacial, e caseína Hammarsten, todos de grau analítico, e antiespumante L-500 fornecido pela DREW.

As soluções utilizadas foram:

Lauril sulfato de sódio em concentrações de 1,5%, 3,0%, 4,5%. Na sua preparação foram adicionadas algumas gotas de antiespumante L-500.

Hidróxido de sódio em concentrações 0,05N, 0,10N e 0,15N.

Ácido acético glacial contendo 56 mg de  $\text{Fe}^{+++}$ /litro (2,7g de  $\text{Fe Cl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , foi dissolvido em 5 ml de água destilada, tomou-se 0,5 ml desta solução, transferiu-se para balão volumétrico de 1.000 ml e completou-se o volume com ácido acético glacial).

### 3.2. Métodos

#### 3.2.1. Preparação das amostras

##### 3.2.1.1. Milho

O milho foi preparado segundo o diagrama mostrado na figura 2. A moagem foi feita utilizando um micromoinho Wiley, dotado de uma peneira de malha ( $\emptyset = 0,6$  mm), sendo em seguida dessecado por 1 hora em estufa a  $60^\circ\text{C}$ . Na delipidação foi utilizado o extrator SOXHLET.

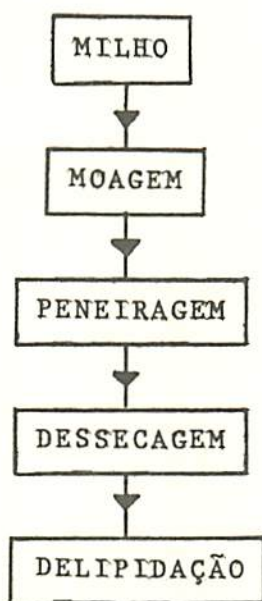


FIGURA 1 - Preparação do milho.

## 3.2.1.2. Sorgo

O sorgo foi preparado segundo o diagrama mostrado na Figura 3, o descorticação do sorgo foi feito utilizando um equipamento de teste de beneficiamento de arroz, (Testador de Arroz-- modelo MT-84 - Máquinas SUZUKI S/A, Santa Cruz do Rio Pardo-São Paulo). Sendo esta operação necessária para evitar o efeito dos fenólicos como resalta NEUCERE et alii (26) e FLIEDEL & KOBREHEL (8).

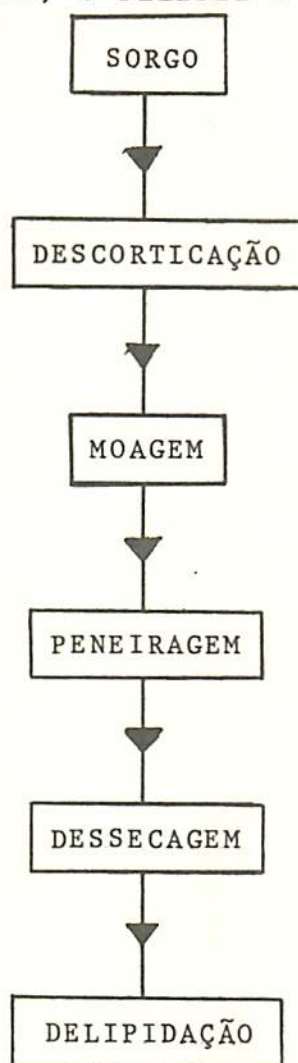


FIGURA 2 - Preparação do sorgo.

### 3.2.1.3. Caseína

Caseína HAMMARSTEN de grau analítico, não sendo necessária nenhuma preparação prévia, foi pesada determinada quantidade e procedeu-se à hidrólise e quantificação do triptofano.

### 3.2.2. Determinação de proteína

Na determinação da fração proteica utilizou-se o método de micro-Kjeldahl segundo AOAC(3), de modo a permitir a quantificação da tomada de ensaio, para obtenção do hidrolisado.

O controle feito por DANNO et alii (6) da percentagem do nitrogênio solubilizado será feito por micro-Kjeldahl de acordo com LOTT et alii (22). Este controle será necessário para certificação da percentagem da extração dos compostos nitrogenados.

### 3.2.3. Obtenção hidrolisado

#### 3.2.3.1. Procedimento para obtenção do hidrolisado

Pesou-se 1,00000 g de amostra preparada conforme o diagrama das Figuras 1, 2, e procedeu-se conforme o descrito nos Quadros 1, 2 e 3.

Foram colocadas as amostras pesadas em triplicatas em frascos cônicos de 125 ml, em seguida 10 ml de NaOH nas concentrações já referidas, ou quando utilizando o lauril sulfato de sódio o volu

me adicionado era 5 ml de cada solução. Posteriormente os frascos foram tampados e levados ao banho-maria nas temperaturas requeridas pelo tratamento, por um período de tempo de 30, 60 e 90 minutos sendo os mesmos agitados de quando em vez.

Após o banho-maria o conteúdo dos frascos foram transferidos para tubos de centrífuga e centrifugados a 3.500 rpm por um período de 15 minutos.

Este procedimento foi realizado para o milho e para o sorgo. Para a caseína não houve necessidade da etapa de centrifugação.

#### 3.2.4. Curva de calibração

Usando-se uma solução estoque de DL-triptofano de concentração 50 mg/100 ml, preparou-se soluções de trabalho, de acordo com seguinte procedimento: Pipetou-se 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16 ml da solução estoque e diluiu-se para 50 ml (balão volumétrico). As soluções de trabalho terão 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160 microgramas por mililitro.

A curva de calibração (Figura 3) propriamente dita foi preparada tomando-se 1 ml de cada uma das soluções de trabalho; adicionando 3 ml de ácido acético contendo 56 mg  $Fe^{+++}$ /litro e 1 ml de ácido sulfúrico concentrado; volume final 5 ml. Após 15 minutos na ausência de luz, foram feitas as determinações espectrofotométricas. Dos dados de leituras obtidos foi feita regressão linear segundo SERFER (30).

## PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE TRABALHO

Solução de trabalho	Volume da solução de trabalho (ml)	Concentração de triptofano em ( $\mu\text{g/ml}$ ) nas soluções de trabalho	Solução Estoque	
			Volume pipetado (ml)	Triptofano (mg)
A	50	20	2	1000
B	50	40	4	2000
C	50	60	6	3000
D	50	80	8	4000
E	50	100	10	5000
F	50	120	12	6000
G	50	140	14	7000
I	50	160	16	8000

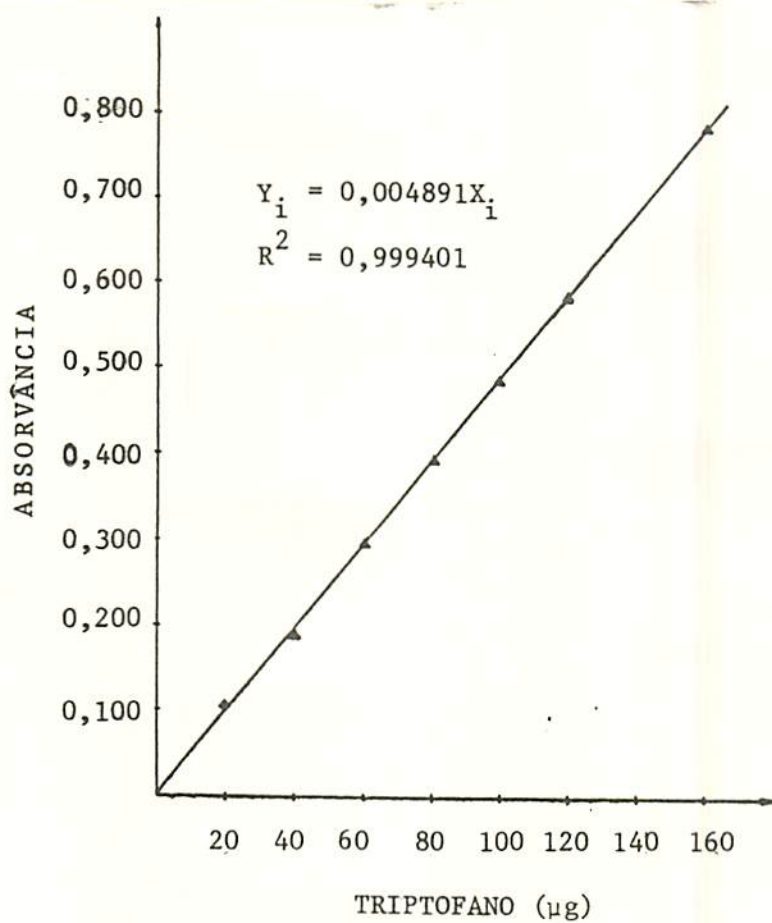


FIGURA 3 - Curva de calibração de DL-triptofano, 20-160 $\mu\text{g}$ , em volume final 5 ml. ( $\Delta$  dados observados).

### 3.2.5. Quantificação do triptofano

Foi utilizado para determinação da absorvância um espectrofotômetro "Linear Absorbance Spectrophotometer Junior II A Coleman Modelo E/A"<sup>20</sup>.

#### 3.2.5.1. Obtenção do hidrolisado límpido

Após hidrólise a solução foi centrifugada à 3500-4000 rpm por 15 minutos usando-se centrífuga de baixa rotação modelo 204 - NR PANEM - São Paulo, SP.

Em seguida transferiu-se o sobrenadante para tubos de ensaio.

#### 3.2.5.2. Determinação do triptofano

Para a obtenção do composto corado procedeu-se da seguinte forma:

Do hidrolisado límpido obtido, tomou-se 1 ml para determinação do triptofano pelo método colorimétrico de OPIENSKA-BLAUTH et alii (28) modificado quanto à adição de ácido sulfúrico concentrado que atua como agente oxidante. A 1 ml do hidrolisado adicionou-se 3 ml de solução de ácido acético com íons férricos, agitando-se o tubo de ensaio, em seguida adicionou-se 1 ml de ácido sulfúrico concentrado com agitação vigorosa e deixou-se na ausência de luz por 15 minutos. A absorvância foi medida no comprimento de onda de 565 nm, definido previamente após uma varredura, na faixa de 385 nm à

700 nm com variação de 5 em 5 nm utilizou-se três soluções padrão de triptofano de concentração 0,08 mg/ml, 0,16 mg/ml e 0,24 mg/ml, os espectros obtidos apresentaram comportamento idêntico ao apresentado por SPIES & CHAMBERS (37). Na Figura 4, podemos observar o espectro obtido com a solução padrão de triptofano de concentração 0,16 mg/ml, sendo a absorbância máxima obtida à 565 nm.

### 3.3. Delimitação experimental

Foi realizado tanto no milho, sorgo como na caseína, tratamento com lauril sulfato de sódio (LSNa) em concentrações de 0%, 1,5%, 3,0%, 4,5%, sendo estas concentrações testadas com níveis de Hidróxido de Sódio 0,05N, 0,10N e 0,15N nas temperaturas 25°C, 50°C, 75°C e 98°C. Por um período de tempo de 30, 60, 90 minutos, como mostram os quadros nºs 1, 2 e 3 a seguir (milho quadro nº 1, sorgo quadro nº 2, caseína quadro nº 3).

As análises foram feitas em triplicatas. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado. Foram feitas as análises de variância pelo Programa AVBRPOL de LIMA & SILVEIRA (19) junto ao Centro de Processamento de Dados da Escola Superior de Agricultura de Lavras - MG. (Apêndice Quadros 4, 5, 6).



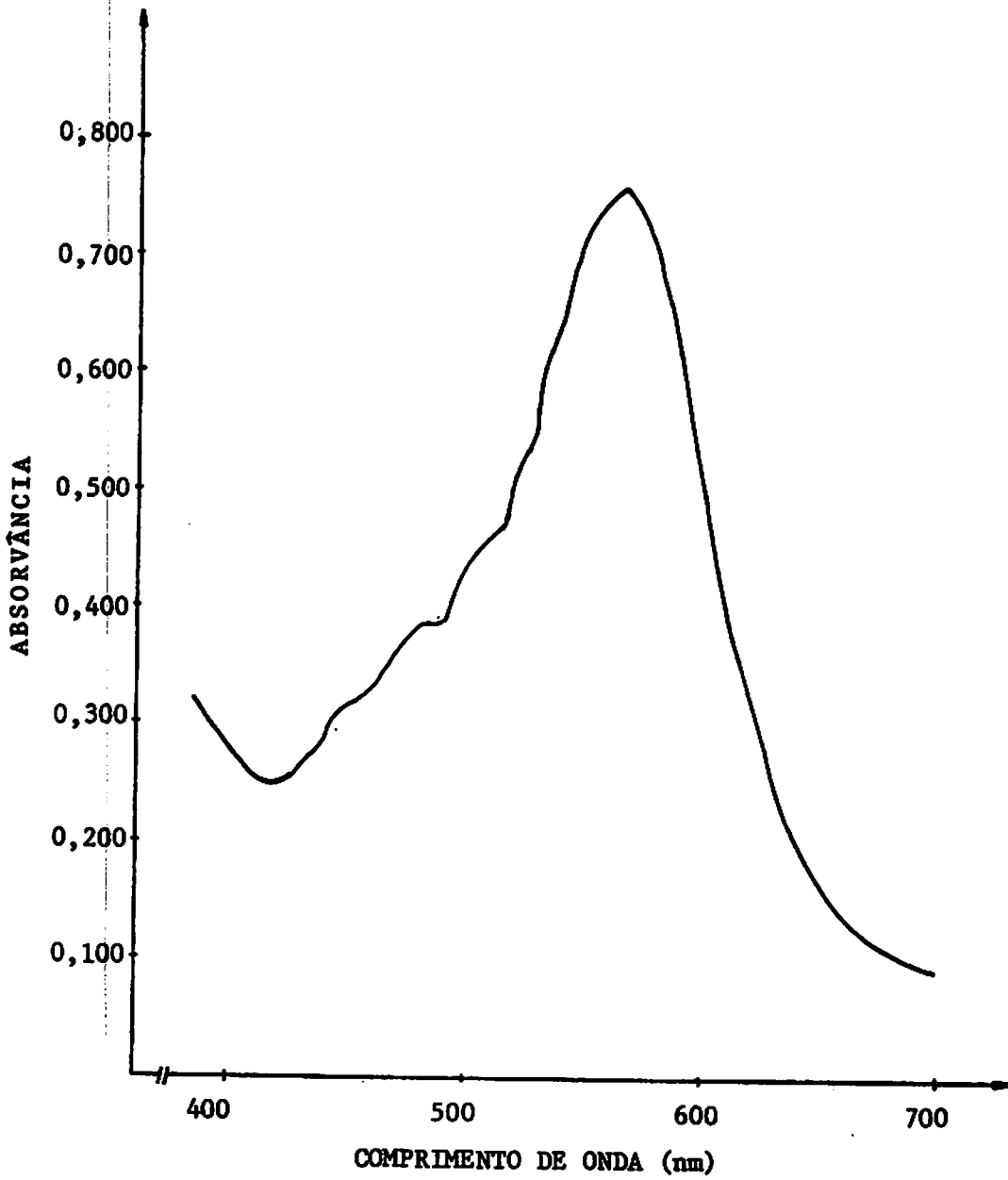


FIGURA 4 - Curva de absorção do triptofano (conc. 0,16 mg/ml).

QUADRO 1 - Delineamento experimental do milho AG-401.

Conc. de LSNa (%)	Conc. de NaOH (N)	Temp. (°C)	Tempo (Min)	Hidrolisado		
				I	II	III
0	0,05	25	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
		50	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
		75	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
		98	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
	0,10	25	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
		50	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
		75	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
		98	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
0,15	25	30	-	-	-	
		60	-	-	-	
		90	-	-	-	
	50	30	-	-	-	
		60	-	-	-	
		90	-	-	-	
	75	30	-	-	-	
		60	-	-	-	
		90	-	-	-	
	98	30	-	-	-	
		60	-	-	-	
		90	-	-	-	

Continuação.

Conc. de LSNa (%)	Conc. de NaOH (N)	Temp. (°C)	Tempo (Min)	Hidrolisado			
				I	II	III	
1,5	0,05	25	30	-	-	-	
			60	-	-	-	
			90	-	-	-	
		50	30	-	-	-	
			60	-	-	-	
			90	-	-	-	
		75	30	-	-	-	
			60	-	-	-	
			90	-	-	-	
	98	30	-	-	-		
		60	-	-	-		
		90	-	-	-		
	0,10	25	25	30	-	-	-
				60	-	-	-
				90	-	-	-
		50	30	-	-	-	
			60	-	-	-	
			90	-	-	-	
		75	30	-	-	-	
			60	-	-	-	
			90	-	-	-	
	98	30	-	-	-		
		60	-	-	-		
		90	-	-	-		
	0,15	25	25	30	-	-	-
				60	-	-	-
				90	-	-	-
50		30	-	-	-		
		60	-	-	-		
		90	-	-	-		
75		30	-	-	-		
		60	-	-	-		
		90	-	-	-		
98	30	-	-	-			
	60	-	-	-			
	90	-	-	-			

Continuação.

Conc. de LSNa (%)	Conc. de NaOH (N)	Temp. (°C)	Tempo (Min)	Hidrolisado		
				I	II	III
3,0	0,05	25	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
		50	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
		75	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
		98	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
	0,10	25	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
		50	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
		75	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
		98	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
0,15	25	30	-	-	-	
		60	-	-	-	
		90	-	-	-	
	50	30	-	-	-	
		60	-	-	-	
		90	-	-	-	
	75	30	-	-	-	
		60	-	-	-	
		90	-	-	-	
	98	30	-	-	-	
		60	-	-	-	
		90	-	-	-	

## Continuação.

Conc. de LSNa (%)	Conc. de NaOH (N)	Temp. (°C)	Tempo (Min)	Hidrolisado			
				I	II	III	
4,5	0,05	25	30	-	-	-	
			60	-	-	-	
			90	-	-	-	
		50	30	-	-	-	
			60	-	-	-	
			90	-	-	-	
		75	30	-	-	-	
			60	-	-	-	
			90	-	-	-	
		98	30	-	-	-	
			60	-	-	-	
			90	-	-	-	
	0,10	25	25	30	-	-	-
				60	-	-	-
				90	-	-	-
		50	30	-	-	-	
			60	-	-	-	
			90	-	-	-	
		75	30	-	-	-	
			60	-	-	-	
			90	-	-	-	
		98	30	-	-	-	
			60	-	-	-	
			90	-	-	-	
0,15	25	25	30	-	-	-	
			60	-	-	-	
			90	-	-	-	
	50	30	-	-	-		
		60	-	-	-		
		90	-	-	-		
	75	30	-	-	-		
		60	-	-	-		
		90	-	-	-		
	98	30	-	-	-		
		60	-	-	-		
		90	-	-	-		

QUADRO 2 - Delineamento experimental do sorgo AG-1011.

Conc. de LSNa (%)	Conc. de NaOH (N)	Temp. (°C)	Tempo (Min)	Hidrolisado		
				I	II	III
0	0,05	25	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
		50	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
		75	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
		98	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
	0,10	25	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
		50	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
		75	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
		98	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
0,15	25	30	-	-	-	
		60	-	-	-	
		90	-	-	-	
	50	30	-	-	-	
		60	-	-	-	
		90	-	-	-	
	75	30	-	-	-	
		60	-	-	-	
		90	-	-	-	
	98	30	-	-	-	
		60	-	-	-	
		90	-	-	-	

## Continuação.

Conc. de LSNa (%)	Conc. de NaOH (N)	Temp. (°C)	Tempo (Min)	Hidrolisado		
				I	II	III
1,5	0,05	25	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
		50	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
		75	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
		98	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
	0,10	25	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
		50	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
		75	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
		98	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
0,15	25	30	-	-	-	
		60	-	-	-	
		90	-	-	-	
	50	30	-	-	-	
		60	-	-	-	
		90	-	-	-	
	75	30	-	-	-	
		60	-	-	-	
		90	-	-	-	
	98	30	-	-	-	
		60	-	-	-	
		90	-	-	-	

## Continuação

Conc. de LSNa (%)	Conc. de NaOH (N)	Temp. (°C)	Tempo (Min)	Hidrolisado		
				I	II	III
3,0	0,05	25	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
		50	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
		75	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
		98	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
	0,10	25	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
		50	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
		75	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
		98	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
0,15	25	30	-	-	-	
		60	-	-	-	
		90	-	-	-	
	50	30	-	-	-	
		60	-	-	-	
		90	-	-	-	
	75	30	-	-	-	
		60	-	-	-	
		90	-	-	-	
	98	30	-	-	-	
		60	-	-	-	
		90	-	-	-	



## Continuação.

Conc. de LSNa (%)	Conc. de NaOH (N)	Temp. (°C)	Tempo (Min)	Hidrolisado		
				I	II	III
4,5	0,05	25	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
		50	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
		75	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
	98	30	-	-	-	
		60	-	-	-	
		90	-	-	-	
	0,10	25	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
		50	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
		75	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
	98	30	-	-	-	
		60	-	-	-	
		90	-	-	-	
0,15	25	30	-	-	-	
		60	-	-	-	
		90	-	-	-	
	50	30	-	-	-	
		60	-	-	-	
		90	-	-	-	
	75	30	-	-	-	
		60	-	-	-	
		90	-	-	-	
98	30	-	-	-		
	60	-	-	-		
	90	-	-	-		

Quadro 3 - Delineamento experimental da caseína Hammarsten.

Conc. de LSNa (%)	Conc. de NaOH (N)	Temp. (°C)	Tempo (Min)	Hidrolisado			
				I	II	III	
0	0,05	25	30	-	-	-	
			60	-	-	-	
			90	-	-	-	
		50	30	-	-	-	
			60	-	-	-	
			90	-	-	-	
		75	30	-	-	-	
			60	-	-	-	
			90	-	-	-	
	98	30	-	-	-		
		60	-	-	-		
		90	-	-	-		
	0,10	25	25	30	-	-	-
				60	-	-	-
				90	-	-	-
		50	30	-	-	-	
			60	-	-	-	
			90	-	-	-	
75		30	-	-	-		
		60	-	-	-		
		90	-	-	-		
98	30	-	-	-			
	60	-	-	-			
	90	-	-	-			
0,15	25	25	30	-	-	-	
			60	-	-	-	
			90	-	-	-	
	50	30	-	-	-		
		60	-	-	-		
		90	-	-	-		
	75	30	-	-	-		
		60	-	-	-		
		90	-	-	-		
98	30	-	-	-			
	60	-	-	-			
	90	-	-	-			

## Continuação.

Conc. de LSNa (%)	Conc. de NaOH (N)	Temp. (°C)	Tempo (Min)	Hidrolisado		
				I	II	III
1,5	0,05	25	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
		50	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
		75	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
		98	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
	0,10	25	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
		50	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
		75	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
		98	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
0,15	25	30	-	-	-	
		60	-	-	-	
		90	-	-	-	
	50	30	-	-	-	
		60	-	-	-	
		90	-	-	-	
	75	30	-	-	-	
		60	-	-	-	
		90	-	-	-	
	98	30	-	-	-	
		60	-	-	-	
		90	-	-	-	

## Continuação.

Conc. de LSNa (%)	Conc. de NaOH (N)	Temp. (°C)	Tempo (Min)	Hidrolisado			
				I	II	III	
3,0	0,05	25	30	-	-	-	
			60	-	-	-	
			90	-	-	-	
		50	30	-	-	-	
			60	-	-	-	
			90	-	-	-	
		75	30	-	-	-	
			60	-	-	-	
			90	-	-	-	
		98	30	-	-	-	
			60	-	-	-	
			90	-	-	-	
	0,10	25	25	30	-	-	-
				60	-	-	-
				90	-	-	-
		50	30	-	-	-	
			60	-	-	-	
			90	-	-	-	
		75	30	-	-	-	
			60	-	-	-	
			90	-	-	-	
		98	30	-	-	-	
			60	-	-	-	
			90	-	-	-	
0,15	25	25	30	-	-	-	
			60	-	-	-	
			90	-	-	-	
	50	30	-	-	-		
		60	-	-	-		
		90	-	-	-		
	75	30	-	-	-		
		60	-	-	-		
		90	-	-	-		
	98	30	-	-	-		
		60	-	-	-		
		90	-	-	-		

Continuação.

Conc. de LSNa (%)	Conc. de NaOH (N)	Temp. (°C)	Tempo (Min)	Hidrolisado		
				I	II	III
4,5	0,05	25	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
		50	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
		75	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
		98	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
	0,10	25	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
		50	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
		75	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
		98	30	-	-	-
			60	-	-	-
			90	-	-	-
0,15	25	30	-	-	-	
		60	-	-	-	
		90	-	-	-	
	50	30	-	-	-	
		60	-	-	-	
		90	-	-	-	
	75	30	-	-	-	
		60	-	-	-	
		90	-	-	-	
	98	30	-	-	-	
		60	-	-	-	
		90	-	-	-	

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

##### 4.1. Teor de proteína da variedade de milho AG-401 e da variedade de sorgo AG-1011

O teor médio de proteína (N x 6,25) obtido para a variedade de milho AG-401 e de sorgo AG-1011 estão no Quadro 4.

QUADRO 4 - Teor de proteína do milho AG-401 e do sorgo AG-1011.

Variedade	Teor Médio de Proteína (%N x 6,25)*
Milho AG-401 dessecado e desengordurado	9,54
Sorgo AG-1011 descorticado, dessecado e desengordurado	9,65

\* Sendo esta determinação necessária para estimar a tomada de ensaio.

##### 4.2. Teor de triptofano da variedade de milho AG-401

Os resultados dos teores de triptofano no hidrolisado de milho AG-401, com relação a todos os tratamentos estão no Quadro 1 no apêndice.

VILLEGAS (44) relata a variação do teor de triptofano de uma cultivar para outra. No Quadro 5 podem ser vistas as variações de triptofano de acordo com a cultivar.

QUADRO 5 - Lisina e triptofano contido no endosperma desengordurado do milho opaco 2 e opaco 2 modificado.

	Milho comum	Milho opaco 2 (endosperma macio) (4856)	Milho opaco 2 modificado (endosperma duro) (4855)
Lisina (%)	2,00	3,80	3,40
Triptofano (%)	0,40	1,00	0,85
Proteína (%N x 6,25)	9,20	8,00	9,93

FONTE: VILLEGAS (37).

TAFURI et alii (39) em seu trabalho de avaliação de triptofano em grãos de milho demonstra teores diferentes do aminoácido em relação a cultivares distintas. (Quadro 6).

QUADRO 6 - Teor de triptofano em várias amostras de milho.

Amostras*	Triptofano nos grãos (%)
Entrelaçado N	0,046 ± 0,004
Entrelaçado N	0,046 ± 0,002
Agrocerec N <sup>o</sup> 1 0	0,091 ± 0,016
Agrocerec N <sup>o</sup> 2 0	0,085 ± 0,007
Agrocerec N <sup>o</sup> 3 0	0,081 ± 0,013

\* N = Milho Normal; 0 = Milho Opaco 2.

A quantificação do triptofano foi realizada em função da curva padrão de DL-triptofano, que foi preparada utilizando soluções padrão. O desenvolvimento do composto corado segundo o método de OPIENSKA-BLAUTH et alii (28).

A análise de variância, como mostra o Quadro 4 do apêndice com um valor abaixo de 10%, dá uma visão da eficácia do método empregado na solubilização e quantificação do triptofano. Apresentando uma recuperação de 91%.

Entre os tratamentos utilizados pode-se observar a influência do lauril sulfato de sódio na etapa de solubilização, representado nos gráficos a seguir: Figura 5 até Figura 16, para o hidrolisado de milho AG-401, dessecado e desengordurado.



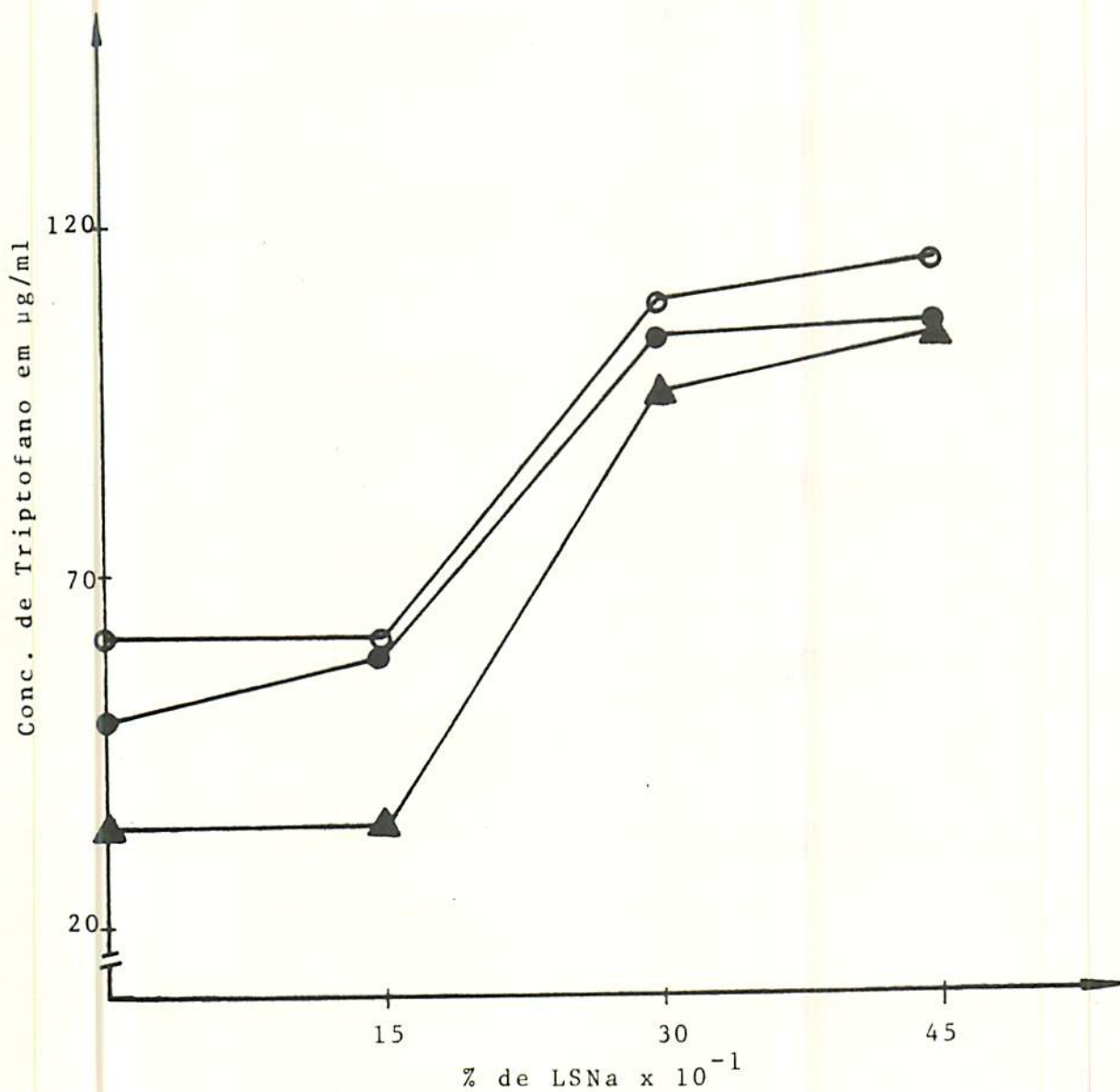


FIGURA 5 - Teor de triptofano em  $\mu\text{g/ml}$  no hidrolisado de milho AG-401 segundo as condições:

- ▲— NaOH 0,05 N, temperatura 25°C, tempo 30 minutos.
- NaOH 0,10 N, temperatura 25°C, tempo 30 minutos.
- NaOH 0,15 N, temperatura 25°C, tempo 30 minutos.

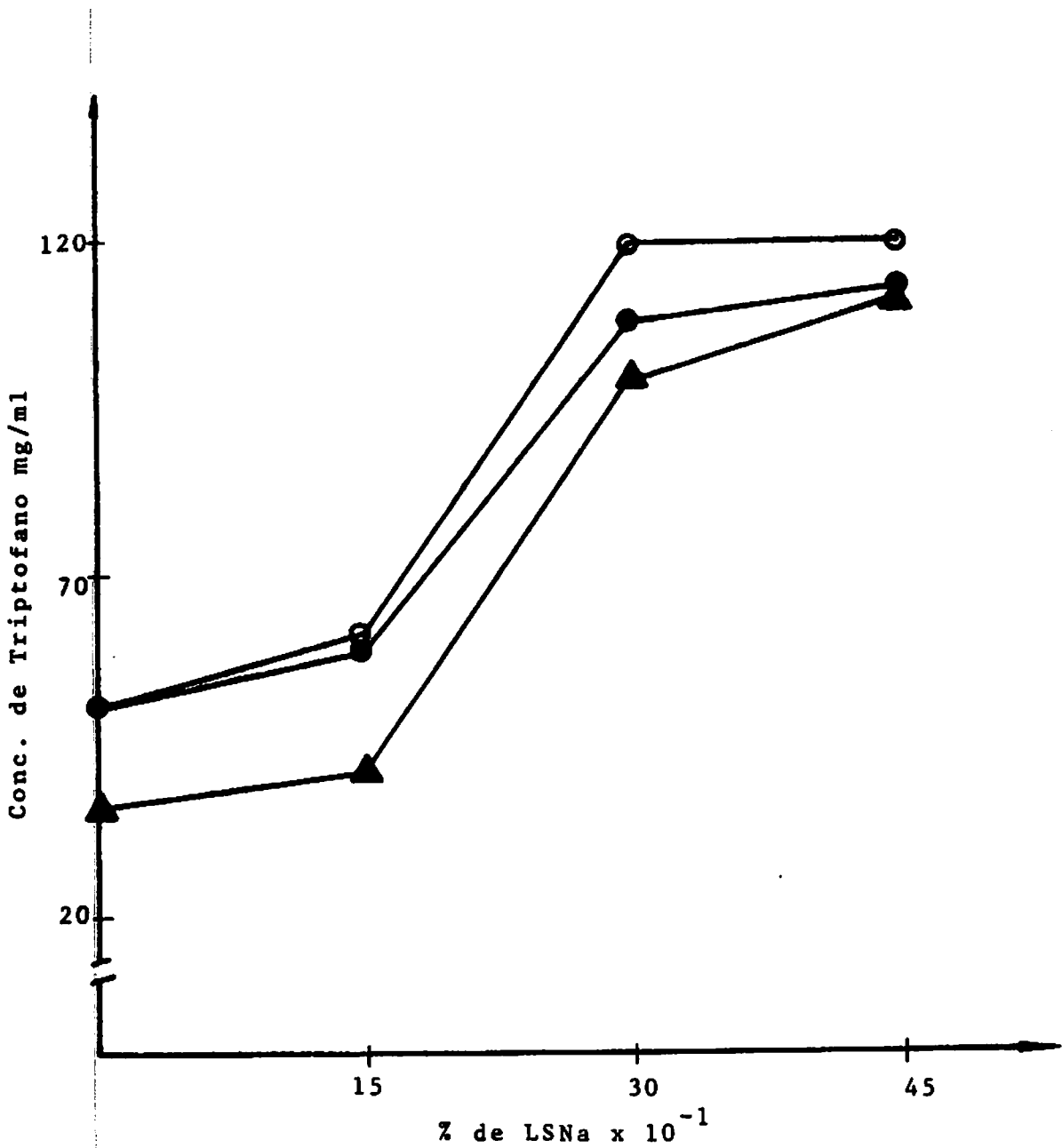


FIGURA 6 - Teor de triptofano em  $\mu\text{g/ml}$  do hidrolisado de milho AG-401 segundo as condições:

- ▲— NaOH 0,05 N, temperatura 25°C, tempo 60 minutos.
- NaOH 0,10 N, temperatura 25°C, tempo 60 minutos.
- NaOH 0,15 N, temperatura 25°C, tempo 60 minutos.

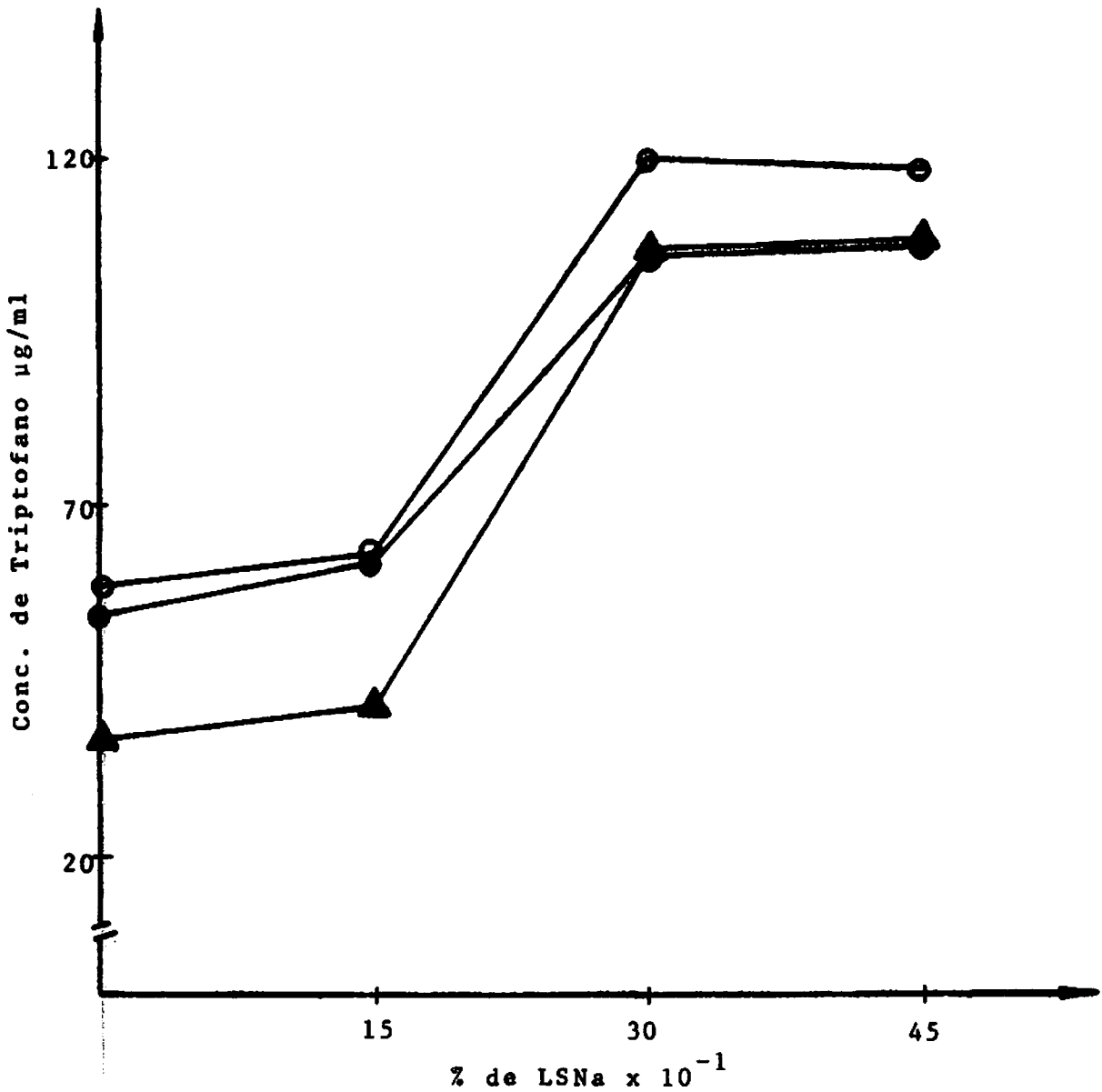


FIGURA 7 - Teor de triptofano em µg/ml no hidrolisado de milho AG-401 segundo as condições:

- ▲— NaOH 0,05 N, temperatura 25°C, tempo 90 minutos.
- NaOH 0,10 N, temperatura 25°C, tempo 90 minutos.
- NaOH 0,10 N, temperatura 25°C, tempo 90 minutos.

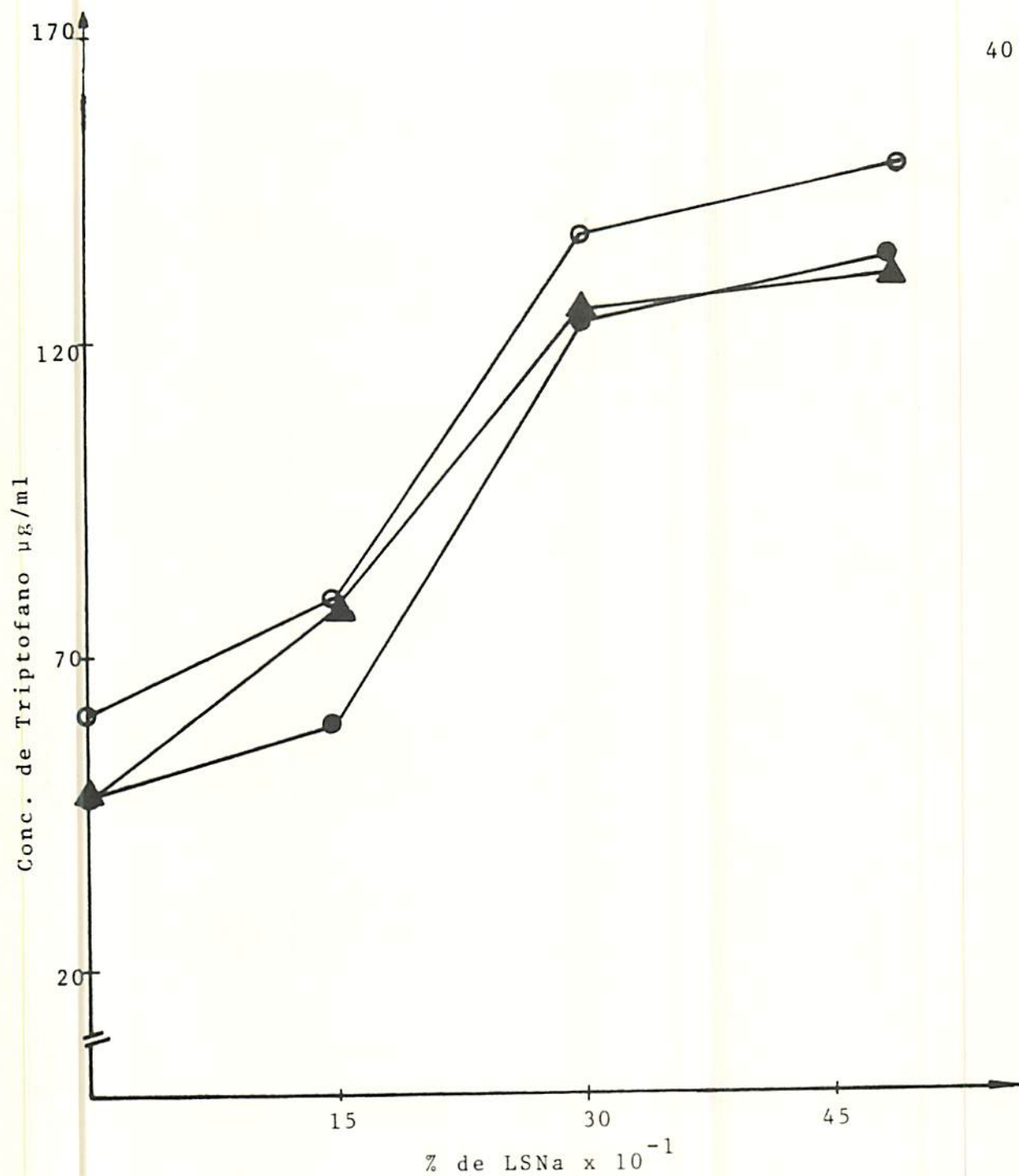


FIGURA 8 - Teor de triptofano em µg/ml no hidrolisado de milho AG-401 segundo as condições:

- ▲▲ NaOH 0,05 N, temperatura 50°C, tempo 30 minutos.
- NaOH 0,10 N, temperatura 50°C, tempo 30 minutos.
- NaOH 0,15 N, temperatura 50°C, tempo 30 minutos.

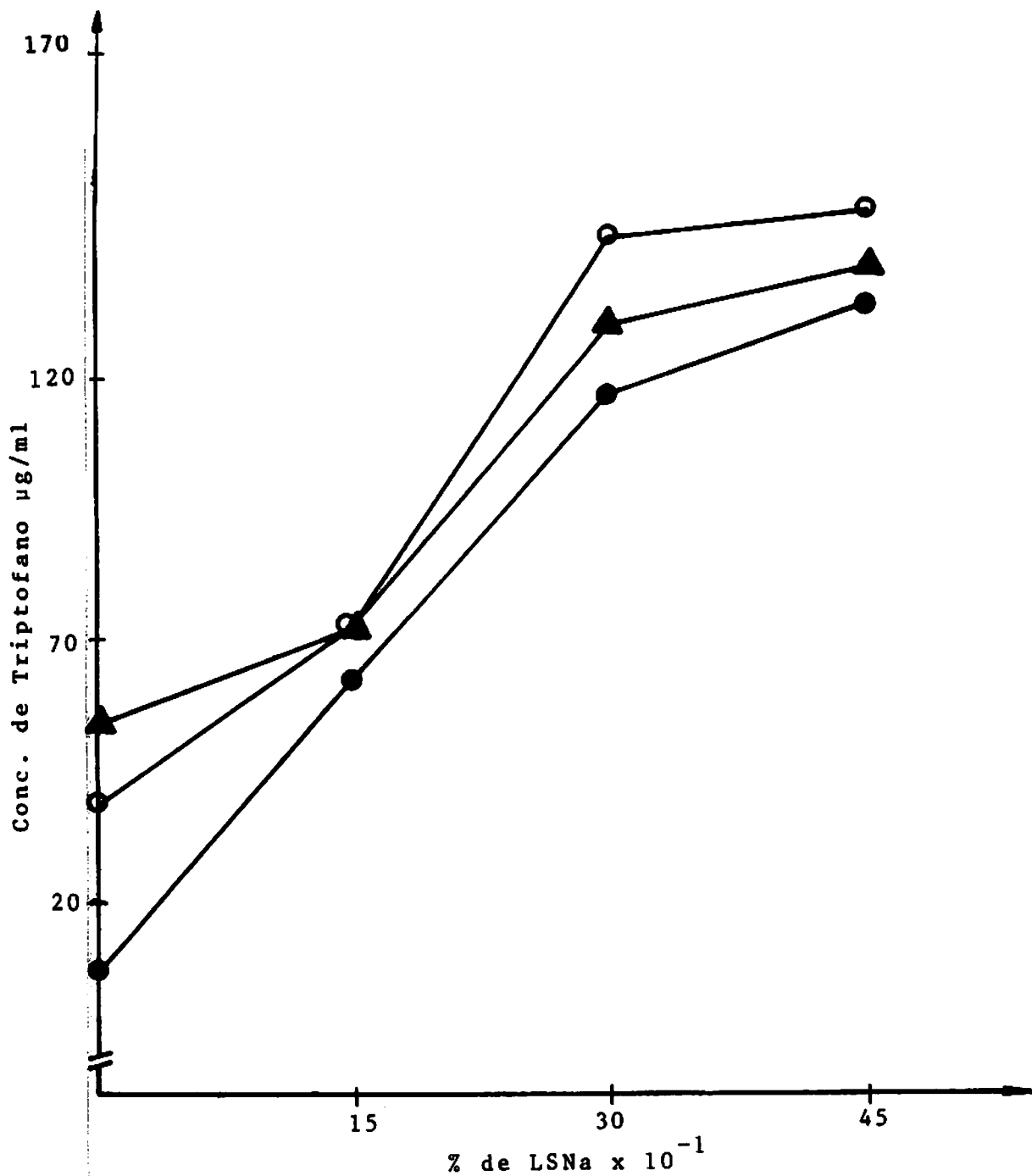


FIGURA 9 - Teor de triptofano em  $\mu\text{g/ml}$  no hidrolisado de milho AG-4Q1 segundo as condições:

- ▲— NaOH 0,05 N, temperatura 50°C, tempo 60 minutos.
- NaOH 0,10 N, temperatura 50°C, tempo 60 minutos.
- NaOH 0,15 N, temperatura 50°C, tempo 60 minutos.

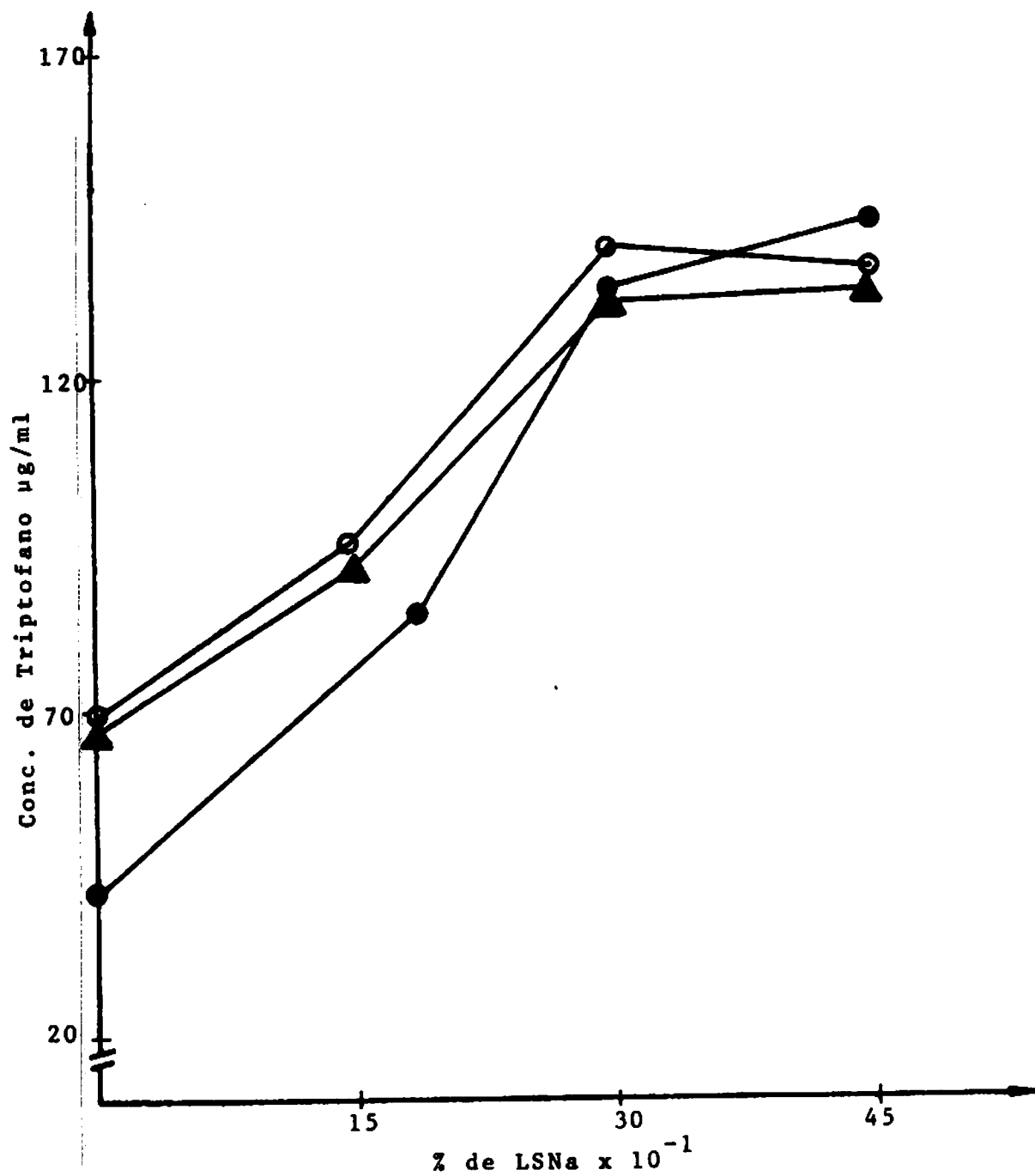


FIGURA 10 - Teor de triptofano em µg/ml no hidrolisado de milho AG-

401 segundo as condições:

- ▲—▲— NaOH 0,05 N, temperatura 50°C, tempo 90 minutos.
- NaOH 0,10 N, temperatura 50°C, tempo 90 minutos.
- NaOH 0,15 N, temperatura 50°C, tempo 90 minutos.

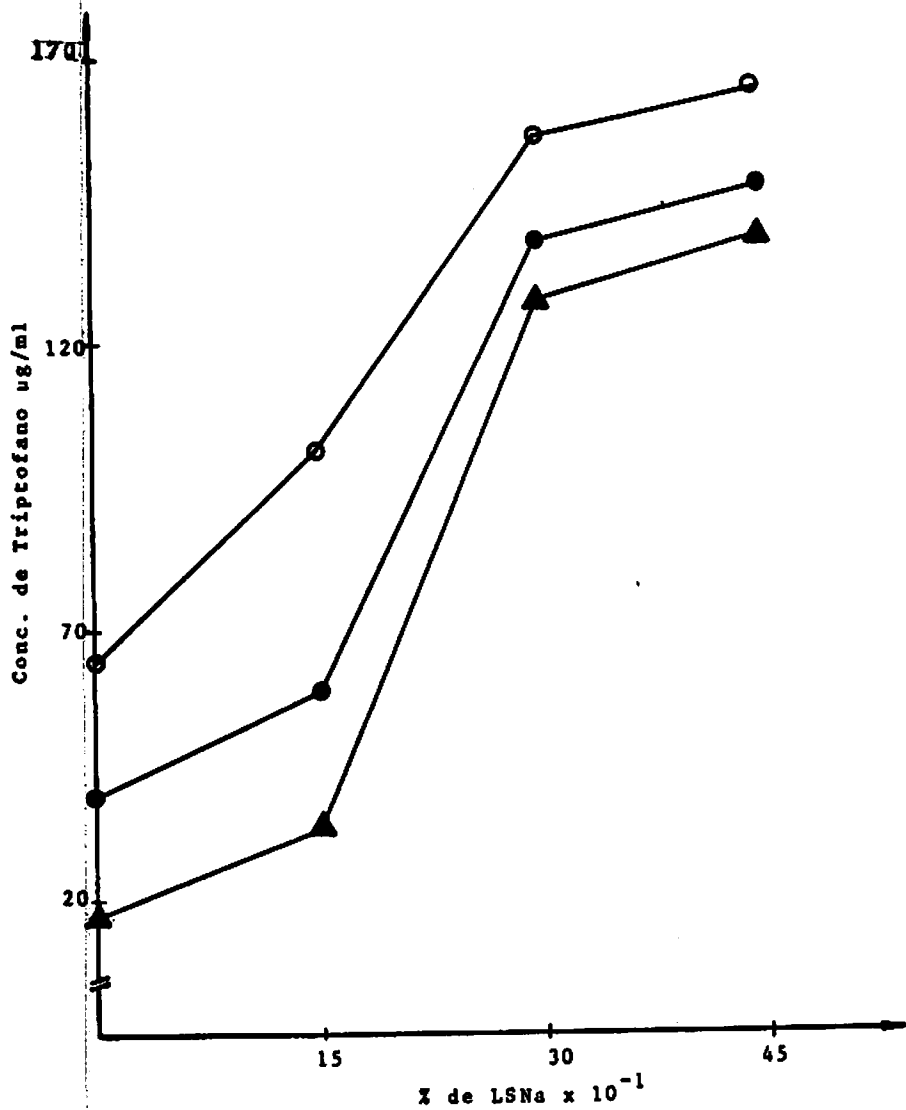


FIGURA 11 - Teor de triptofano em µg/ml no hidrolisado de milho AG-4Q1 segundo as condições:

- ▲— NaOH 0,05 N, temperatura 75°C, tempo 30 minutos.
- NaOH 0,10 N, temperatura 75°C, tempo 30 minutos.
- NaOH 0,15 N, temperatura 75°C, tempo 30 minutos.

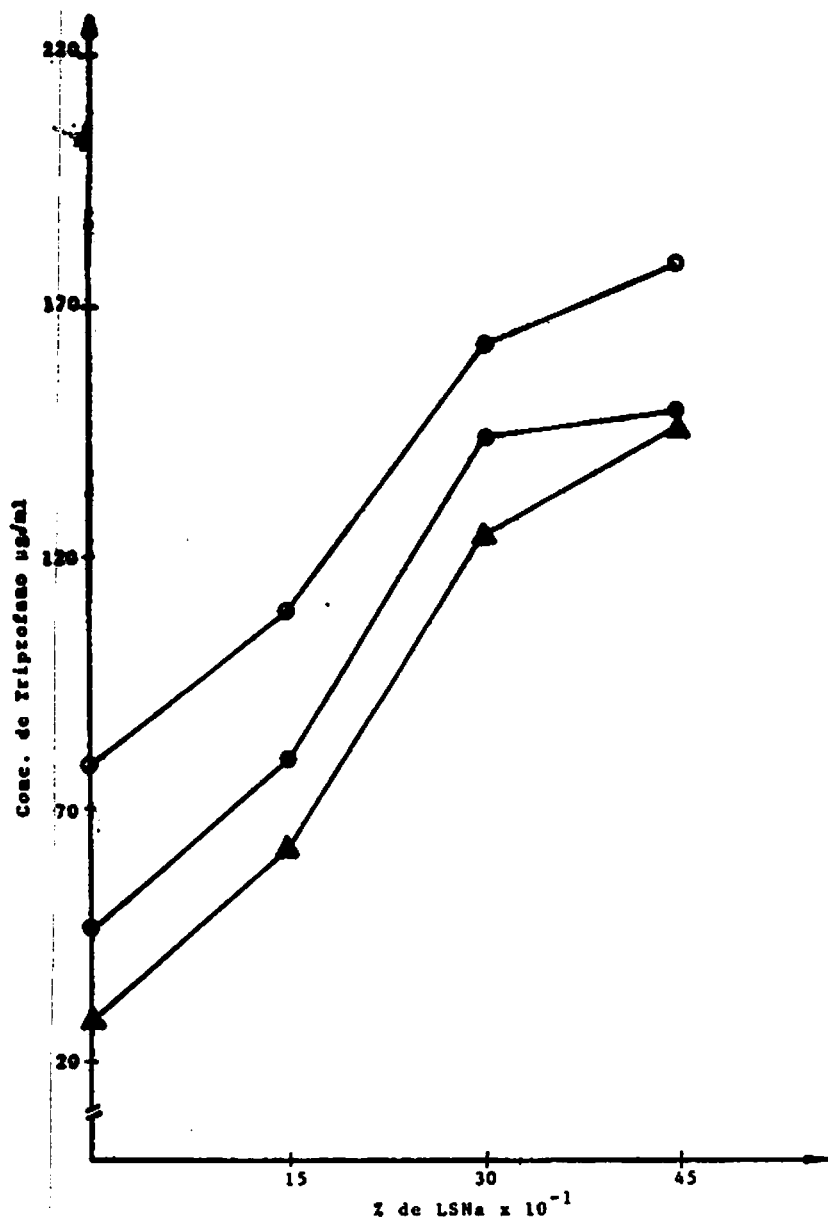


FIGURA 12 - Teor de triptofano em  $\mu\text{g/ml}$  no hidrolisado de milho AG-401 segundo as condições:

- ▲— NaOH 0,05 N, temperatura  $75^{\circ}\text{C}$ , tempo 60 minutos.
- NaOH 0,10 N, temperatura  $75^{\circ}\text{C}$ , tempo 60 minutos.
- NaOH 0,15 N, temperatura  $75^{\circ}\text{C}$ , tempo 60 minutos.



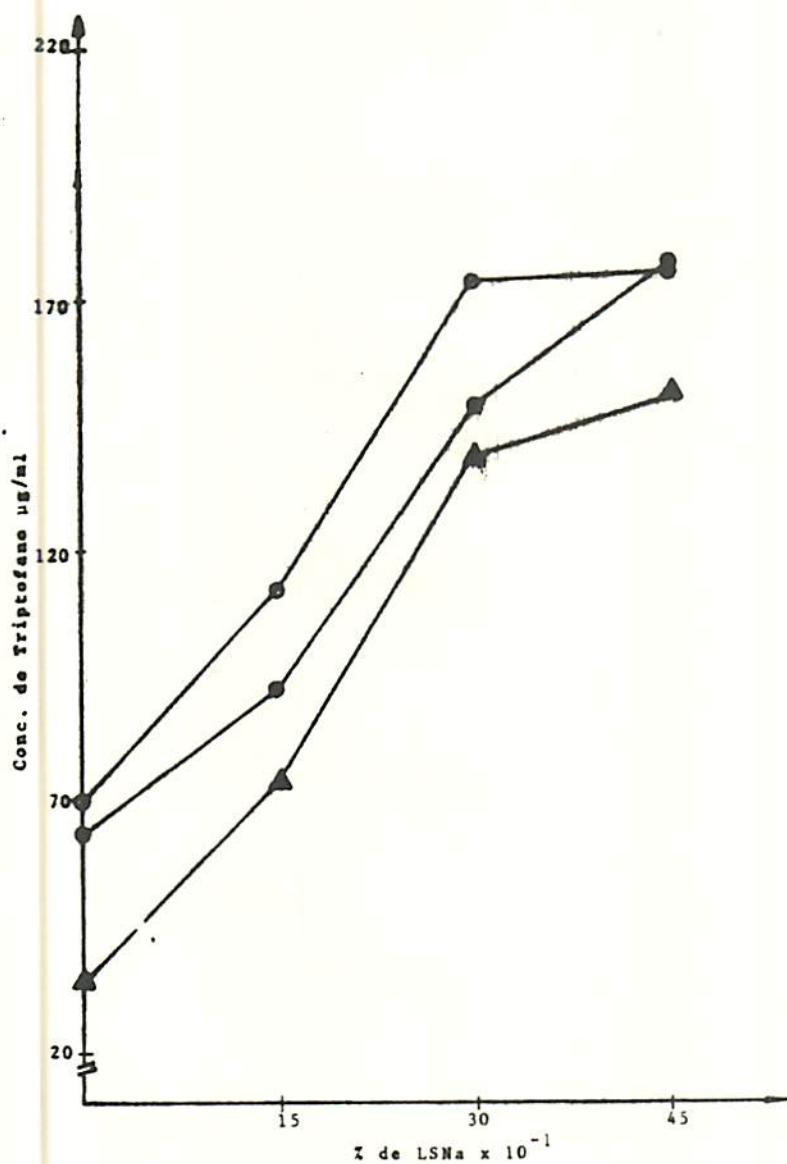


FIGURA 13 - Teor de triptofano em  $\mu\text{g/ml}$  no hidrolisado de milho AG-401 segundo as condições:

—▲▲— NaOH 0,05 N, temperatura  $75^{\circ}\text{C}$ , tempo 90 minutos.

—●●— NaOH 0,10 N, temperatura  $75^{\circ}\text{C}$ , tempo 90 minutos.

—□□— NaOH 0,15 N, temperatura  $75^{\circ}\text{C}$ , tempo 90 minutos.

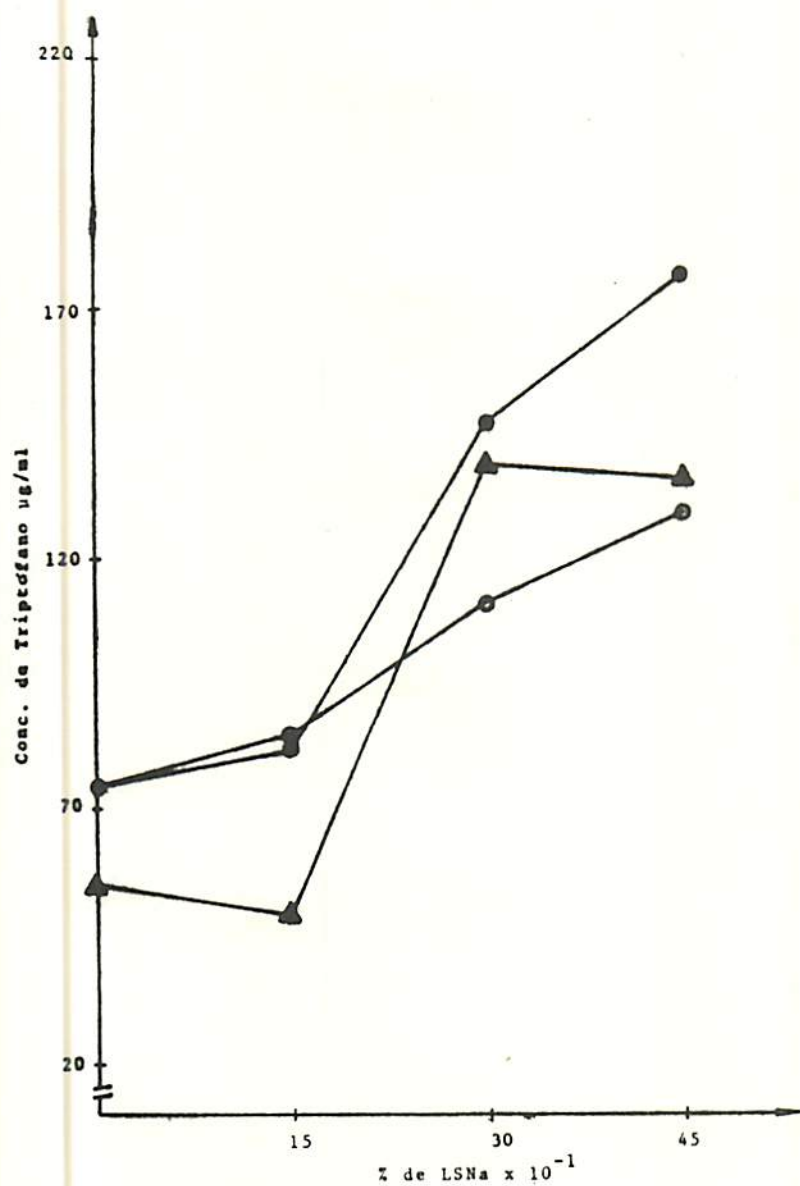


FIGURA 14 - Teor de triptofano em  $\mu\text{g/ml}$  no hidrolisado de milho AG-401 segundo as condições:

- ▲— NaOH 0,05 N, temperatura  $98^{\circ}\text{C}$ , tempo 30 minutos.
- NaOH 0,10 N, temperatura  $98^{\circ}\text{C}$ , tempo 30 minutos.
- NaOH 0,15 N, temperatura  $98^{\circ}\text{C}$ , tempo 30 minutos.

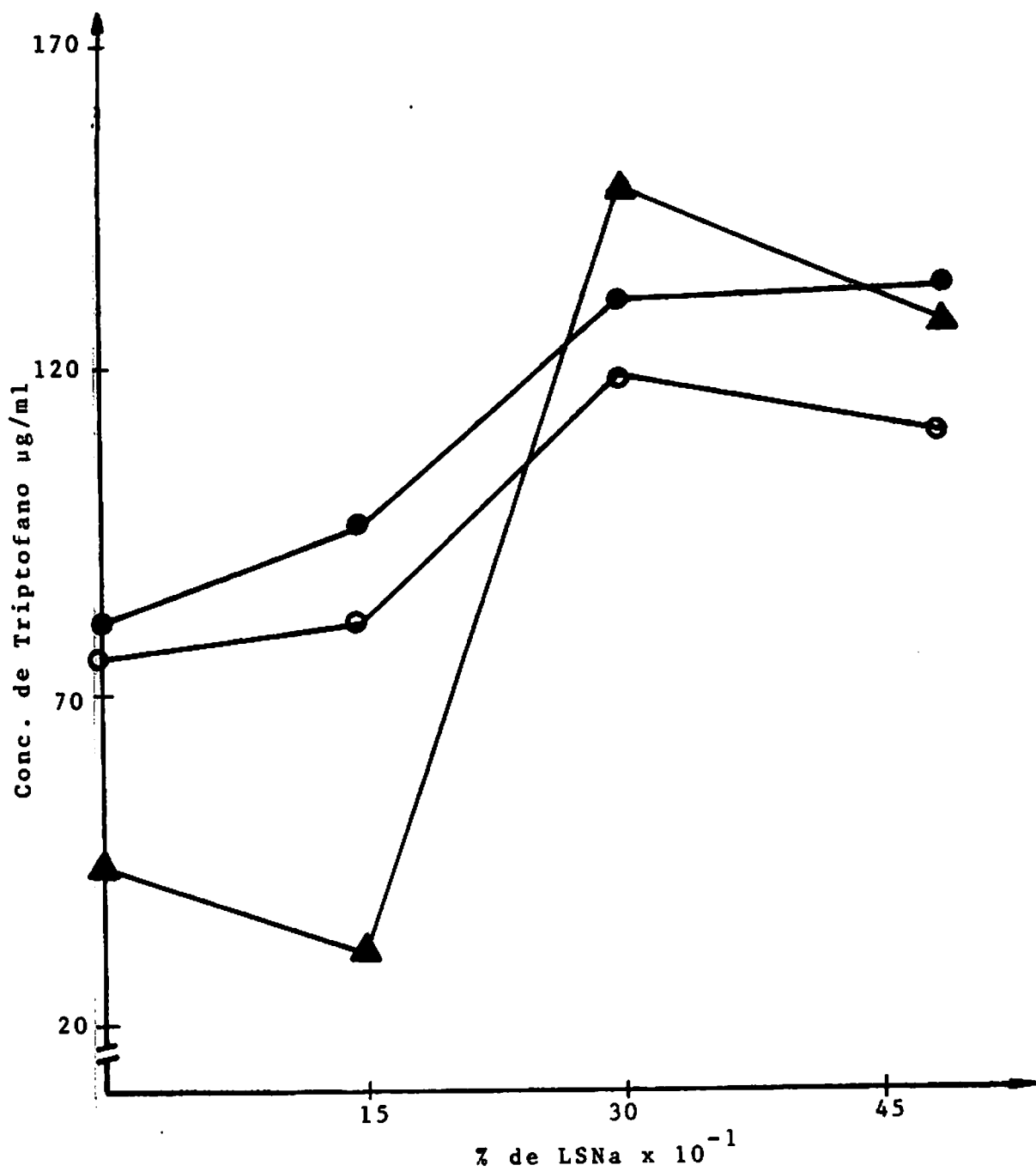


FIGURA 15 - Teor de triptofano em  $\mu\text{g/ml}$  no hidrolisado de milho AG-401 segundo as condições:

- ▲▲— NaOH 0,05 N, temperatura  $98^{\circ}\text{C}$ , tempo 60 minutos.
- NaOH 0,10 N, temperatura  $98^{\circ}\text{C}$ , tempo 60 minutos.
- NaOH 0,15 N, temperatura  $98^{\circ}\text{C}$ , tempo 60 minutos.

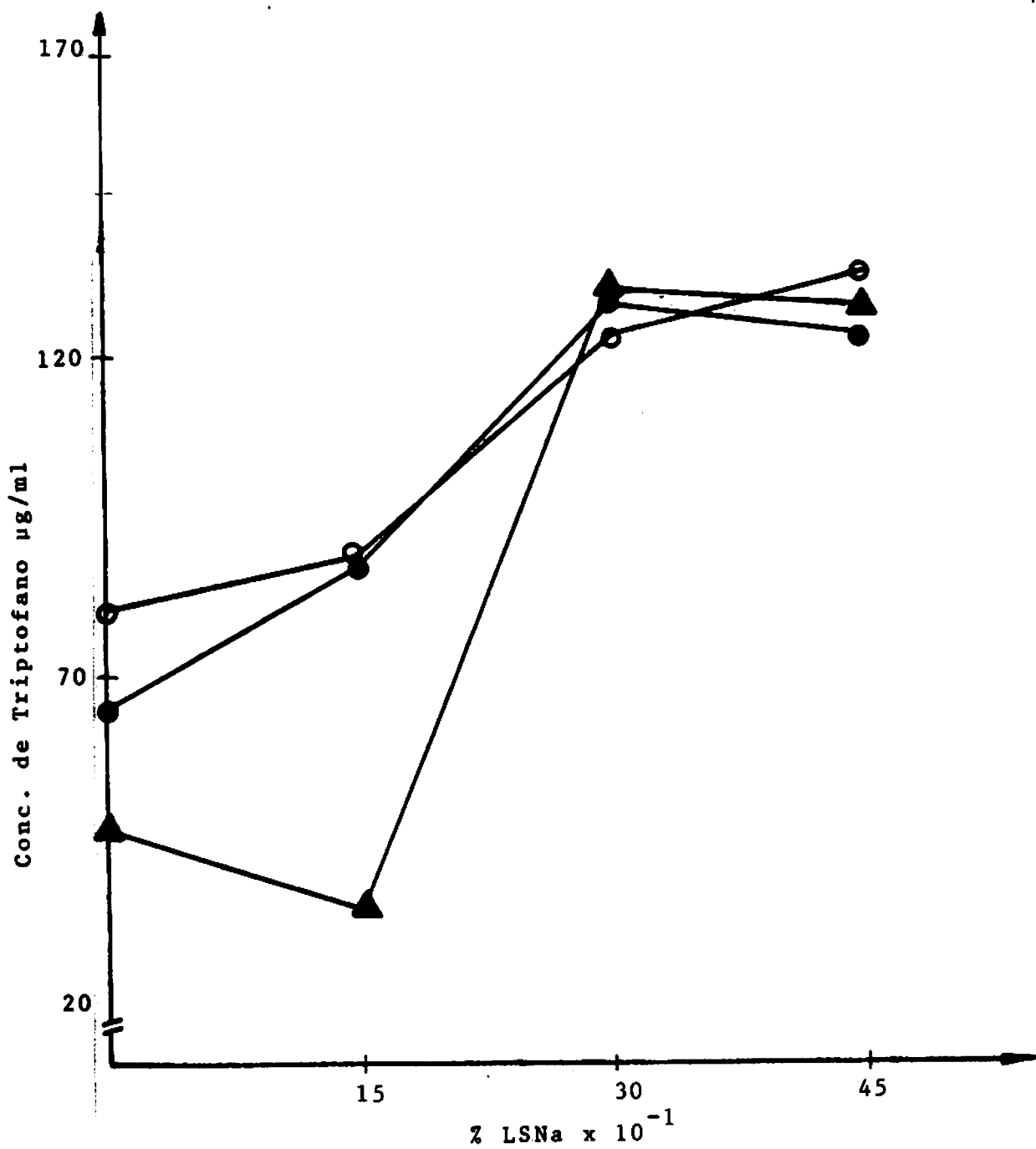


FIGURA 16 - Teor de triptofano em  $\mu\text{g/ml}$  no hidrolisado de milho AG-401 segundo as condições

—▲— NaOH 0,05 N, temperatura  $98^{\circ}\text{C}$ , tempo 90 minutos.

—●— NaOH 0,10 N, temperatura  $98^{\circ}\text{C}$ , tempo 90 minutos.

—○— NaOH 0,15 N, temperatura  $98^{\circ}\text{C}$ , tempo 90 minutos.

Pelos gráficos apresentados observa-se uma marcada influência do lauril sulfato de sódio, na solubilização das proteínas.

Entre as temperaturas estudadas, a mais alta (98°C) apresentou um comportamento diferente quanto aos níveis de triptofano quantificado. Observou-se a formação de um gel que dificultou a extração do sobrenadante. Assim sendo o sobrenadante foi obtido com exaustiva centrifugação. Após quantificação, níveis menores em relação aos demais tratamentos foram observados. Na literatura, SMITH & FRIEDMAN (35) mostraram em misturas de caseína com amido, sacarose e glicose que a interação de carboidratos e lisina provocava a destruição de outros aminoácidos. Neste trabalho observou-se, para 98°C, um nível menor de triptofano; acredita-se portanto que tal valor poderá ser resultante da interação de carboidratos com a lisina da proteína do milho. O acima relatado é visto nas Figuras 14, 15 e 16.

Entretanto observa-se que, se a obtenção do hidrolisado ocorrer no tempo mínimo (30 minutos) com o hidróxido de sódio em concentração 0,10 N e lauril sulfato de sódio 4,5%, o resultado obtido não siferencia estatisticamente a nível de 5% dos melhores tratamentos. Já nas temperaturas inferiores, como a temperatura de 75°C, com lauril sulfato de sódio 4,5%, hidróxido de sódio de 0,10N e 0,15N, num período de 60 e 90 minutos, além de se obter maiores teores de triptofano, dá mais segurança com relação ao relatado por SMITH & FRIEDMAN (35), e não há formação de gel.

Entre estes tratamentos não há diferença mínima significativa a nível de 5%, porém o tempo é um fator importante, em se tra-

tando de análise, na Figura 17 pode-se analisar o efeito do tempo nestes tratamentos.

Sendo o tempo, também um fator primordial, a análise da Figura 17 dá visão das melhores condições de obtenção do hidrolisado.

Com as modificações que este trabalho se propôs a fazer o milho AG-401 dessecado e desengordurado apresentou os seguintes teores de proteína e de triptofano (Quadro 7).

QUADRO 7 - Teor de triptofano e de proteína no milho AG-401 dessecado e desengordurado.

Amostra	Proteína (%)	Triptofano g/100g de milho
Milho AG-401	9,54	0,18

#### 4.3. Teor de triptofano na variedade de sorgo AG-1011

Os resultados dos teores de triptofano no hidrolisado sorgo AG-1011 relativo a cada tratamento aplicado estão no Quadro 2 do apêndice.

O Quadro 8 apresenta teores de triptofano no sorgo segundo ALBINO et alii (1).

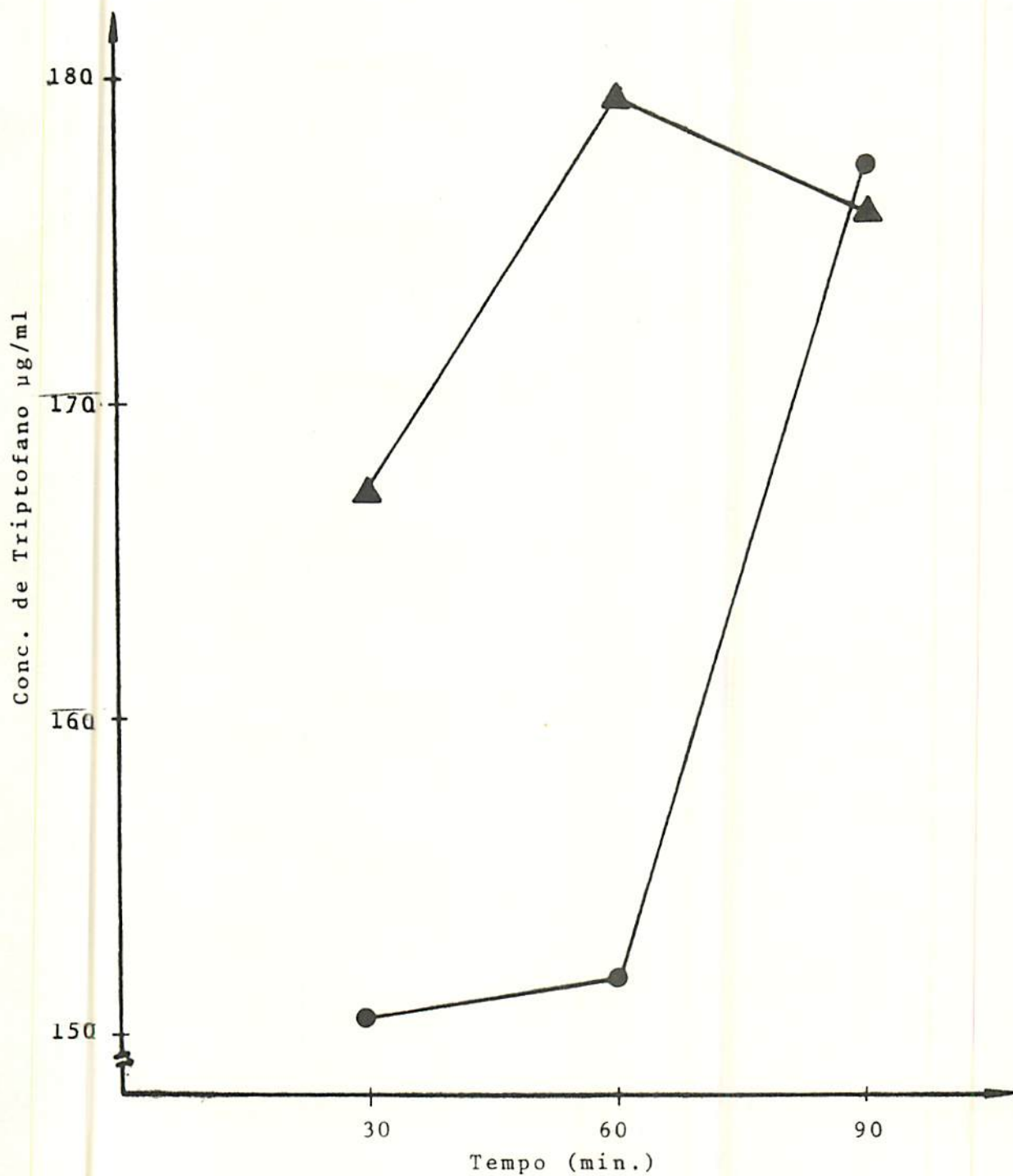


FIGURA 17 - Tempo de hidrólise do milho AG-401 dessecado e desengordurado nos tratamentos: (●—●) NaOH 0,10N, (▲—▲) NaOH 0,15 N à 75°C e LSNa 4,5%.

QUADRO 8 - Valores de triptofano expressos com percentagem na base da matéria natural e na base da matéria seca.

Grão	Proteínas	Triptofano	
		Matéria Natural (%)	Matéria Seca (%)
Sorgo Granífero I	8,1	0,07	0,08
Sorgo Granífero II	6,0	0,07	0,08

Os teores de aminoácido no sorgo variam também de acordo com as cultivares assim relatam os trabalhos de STEPHENSON et alii (38); JOSEPH & CHEVASSUS AGNES (17); TEMCHENKO (40) e o de SINGHANIA et alii (32).

O sorgo AG-1011 utilizado neste trabalho não pode ter seus resultados avaliados com relação aos da literatura, tendo em vista esta variação.

Os níveis de triptofano no sorgo foram avaliados de acordo com a curva padrão do DL-triptofano (Figura 3).

As amostras cujas leituras ficaram fora da faixa tiveram a tomada de ensaio modificada para que ficassem dentro da faixa ótima de trabalho de acordo com a lei de Beer.

A análise de variância, mostrada no Quadro 5, do apêndice, com um valor inferior a 10% demonstra a eficácia do método empregado na solubilização e quantificação do triptofano, apresentando uma recuperação de 94%.



Nos tratamentos realizados pode-se observar a influência do lauril sulfato de sódio na etapa de solubilização, representada nos gráficos a seguir Figura 18 à Figura 26 para o hidrolisado de sorgo AG-1011, descorticado, dessecado e desengordurado.

Nos tratamentos efetuados com o sorgo, não obtivemos resultados com a temperatura de  $98^{\circ}\text{C}$ , pois houve a formação de um gel e não foi possível obter um sobrenadante para se fazer a quantificação do triptofano. Nas demais temperaturas foi possível obter um sobrenadante pois não se verificava a formação do gel.

Nos gráficos das Figuras 24, 25 e 26 observa-se um comportamento idêntico, e os tratamentos que resultaram as curvas do referido gráfico, demonstram que estes foram os que apresentaram uma melhor solubilização, levando maiores teores de triptofano no hidrolisado, em relação aos demais tratamentos.

Outro fator observado foi que a temperatura teve influência muito grande, uma vez que o aumento de temperatura associado com tempo de hidrólise nos levou a resultados melhores. Isto pode ser visto comparando os gráficos da Figura 18 a Figura 25.

No gráfico da Figura 25 pode-se observar o tratamento que levou a um maior teor de triptofano, conseqüentemente o que apresentou uma melhor solubilização. Este tratamento apresenta a seguinte associação hidróxido de sódio 0,15N, lauril sulfato de sódio 4,5% temperatura  $75^{\circ}\text{C}$  em um tempo de 60 minutos. As curvas do gráfico da Figura 25 apresenta um comportamento semelhante ao apresentado por FLIEDEL & KOBREHEL (8) que em seu trabalho mostra um estudo da solubilização de proteínas de sorgo com detergente.

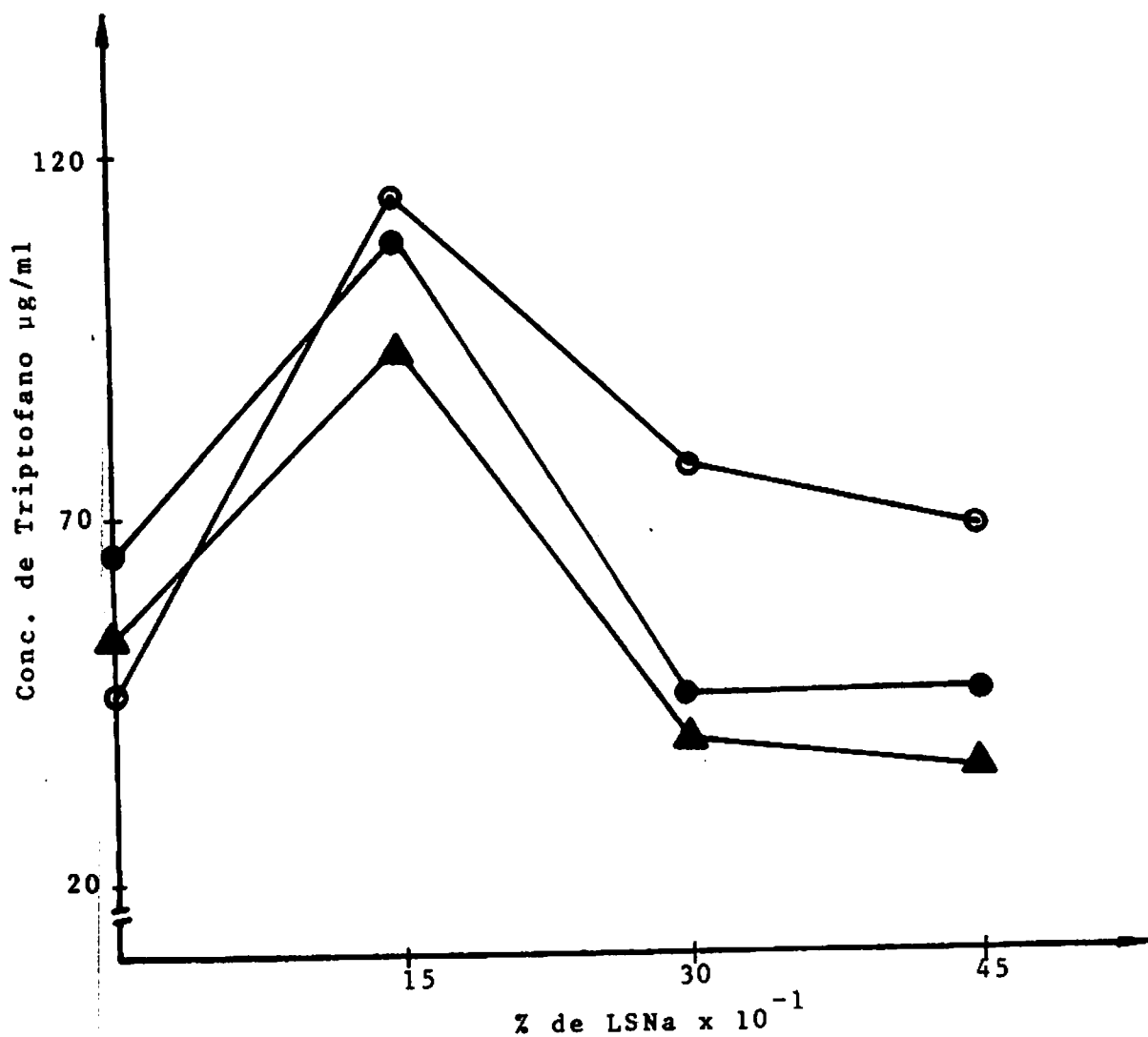


FIGURA 18 - Teor de triptofano em µg/ml no hidrolisado de sorgo AG-1011 segundo as condições:

- ▲— NaOH 0,05 N, temperatura 25°C, tempo 30 minutos.
- NaOH 0,10 N, temperatura 25°C, tempo 30 minutos.
- NaOH 0,15 N, temperatura 25°C, tempo 30 minutos.

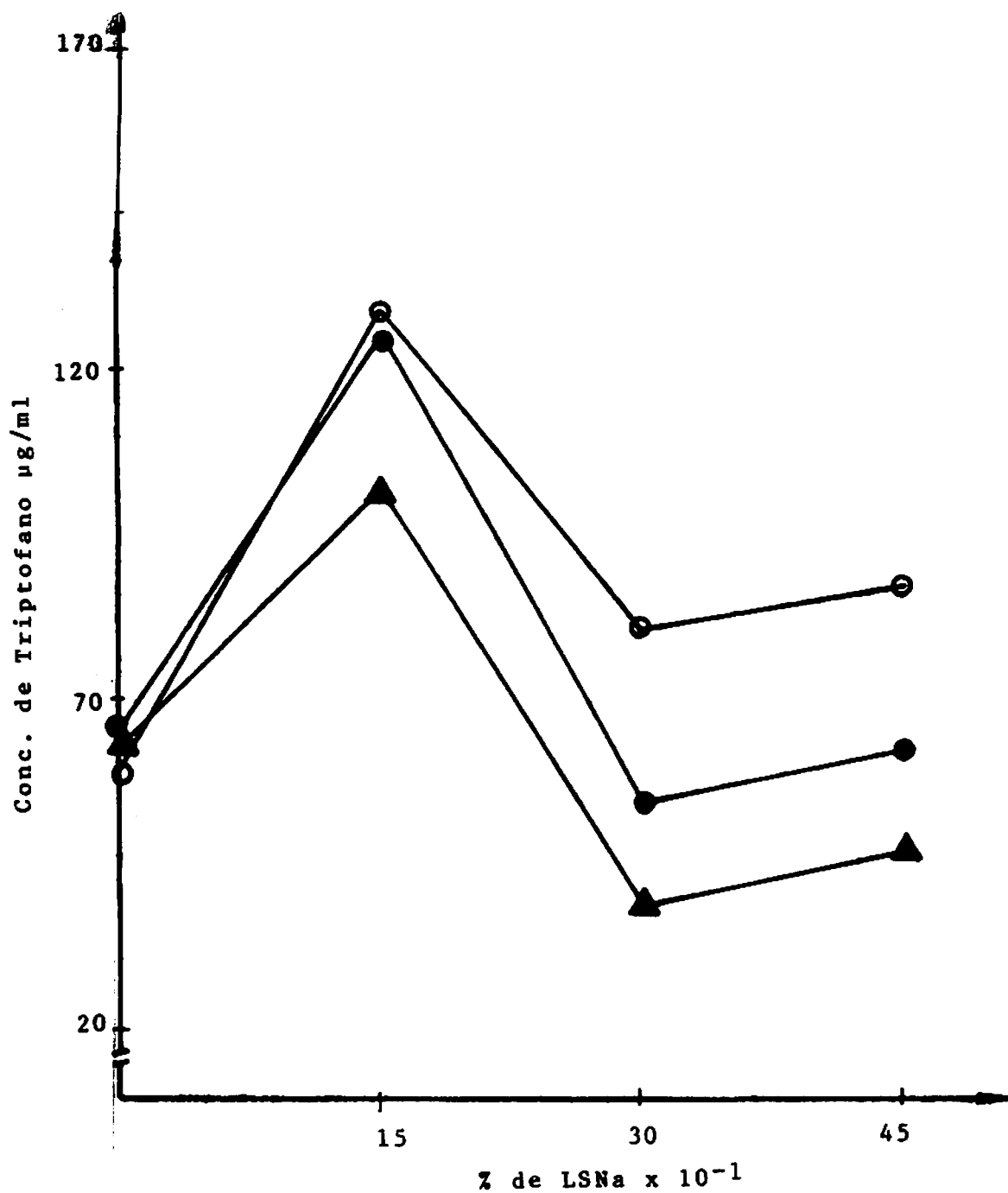


FIGURA 19 - Teor de triptofano em  $\mu\text{g/ml}$  no hidrolisado de sorgo AG 1011 segundo as condições:

- ▲— NaOH 0,05 N, temperatura 25°C, tempo 60 minutos.
- NaOH 0,10 N, temperatura 25°C, tempo 60 minutos.
- NaOH 0,15 N, temperatura 25°C, tempo 60 minutos.

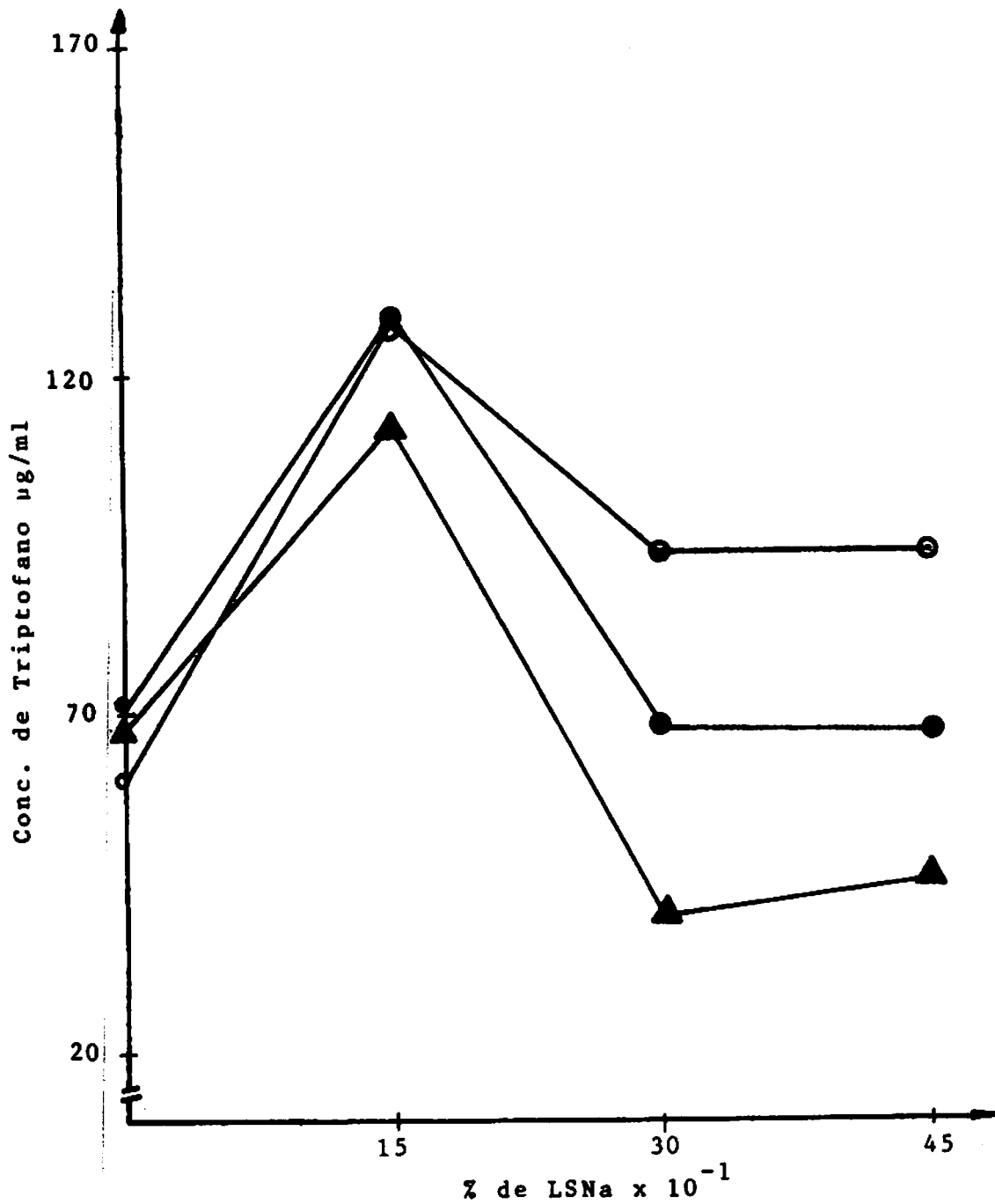


FIGURA 20 - Teor de triptofano em  $\mu\text{g/ml}$  no hidrolisado de sorgo AG-1011 segundo as condições:

- ▲—▲— NaOH 0,05 N, temperatura 25<sup>o</sup>C, tempo 90 minutos.
- NaOH 0,10 N, temperatura 25<sup>o</sup>C, tempo 90 minutos.
- NaOH 0,15 N, temperatura 25<sup>o</sup>C, tempo 90 minutos.

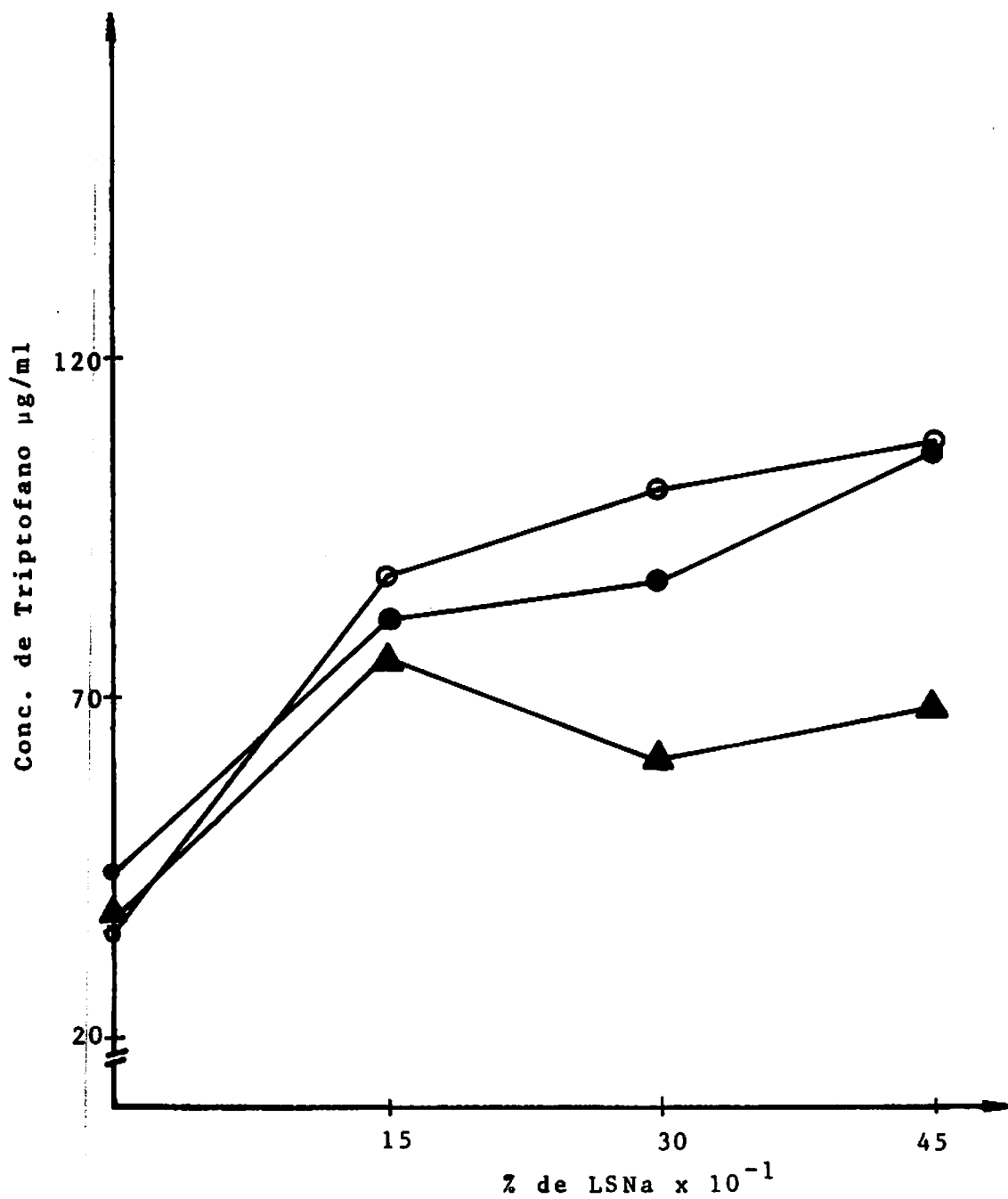


FIGURA 21 - Teor de triptofano em  $\mu\text{g/ml}$  no hidrolisado de sorgo AG-1011 segundo as condições:

- ▲▲— NaOH 0,05 N, temperatura  $50^{\circ}\text{C}$ , tempo 30 minutos.
- NaOH 0,10 N, temperatura  $50^{\circ}\text{C}$ , tempo 30 minutos.
- NaOH 0,15 N, temperatura  $50^{\circ}\text{C}$ , tempo 30 minutos

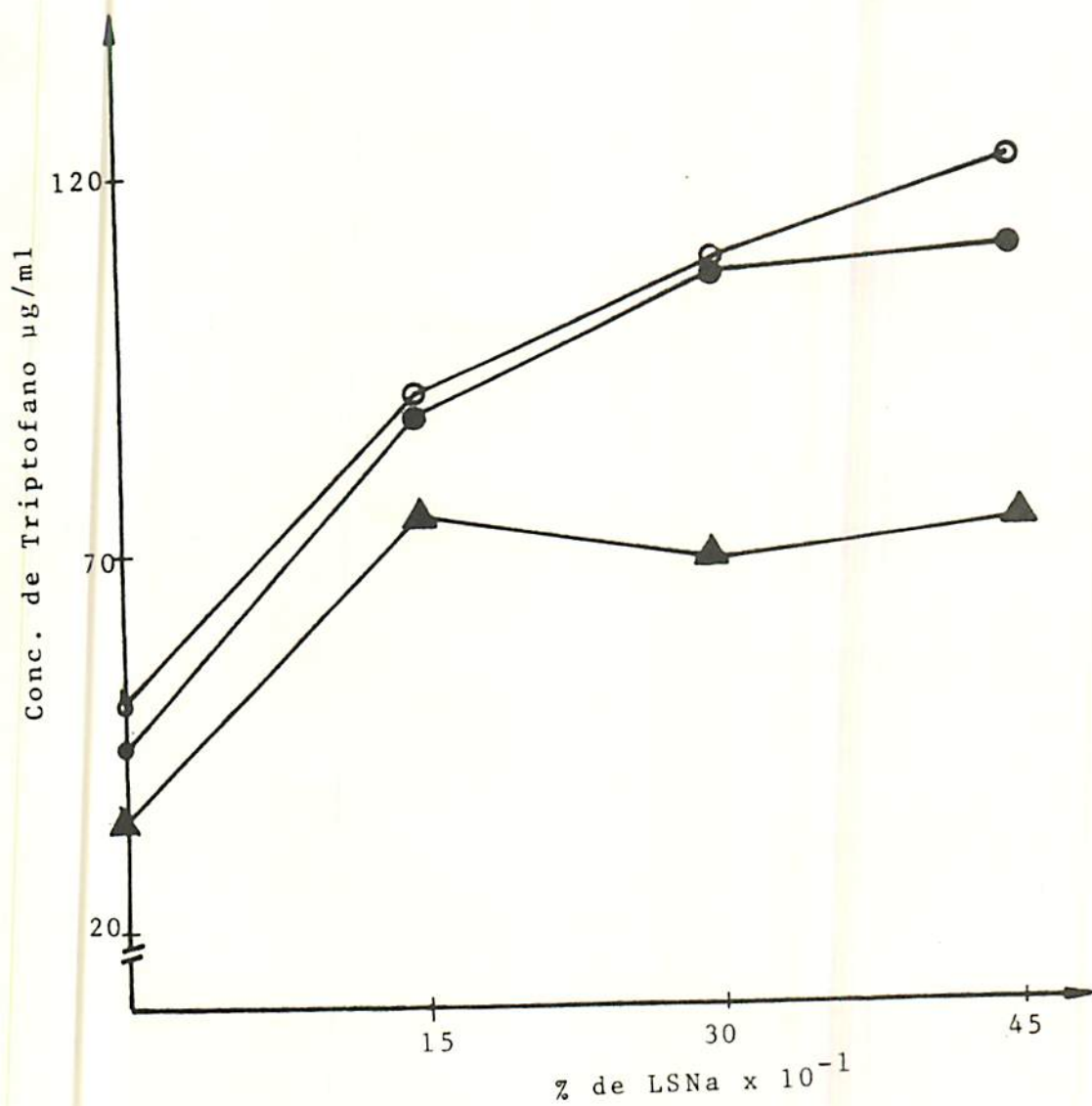


FIGURA 22 - Teor de triptofano em  $\mu\text{g/ml}$  no hidrolisado de sorgo AG-1011 segundo as condições:

- ▲—▲— NaOH 0,05 N, temperatura  $50^{\circ}\text{C}$ , tempo 60 minutos.
- NaOH 0,10 N, temperatura  $50^{\circ}\text{C}$ , tempo 60 minutos.
- NaOH 0,15 N, temperatura  $50^{\circ}\text{C}$ , tempo 60 minutos.

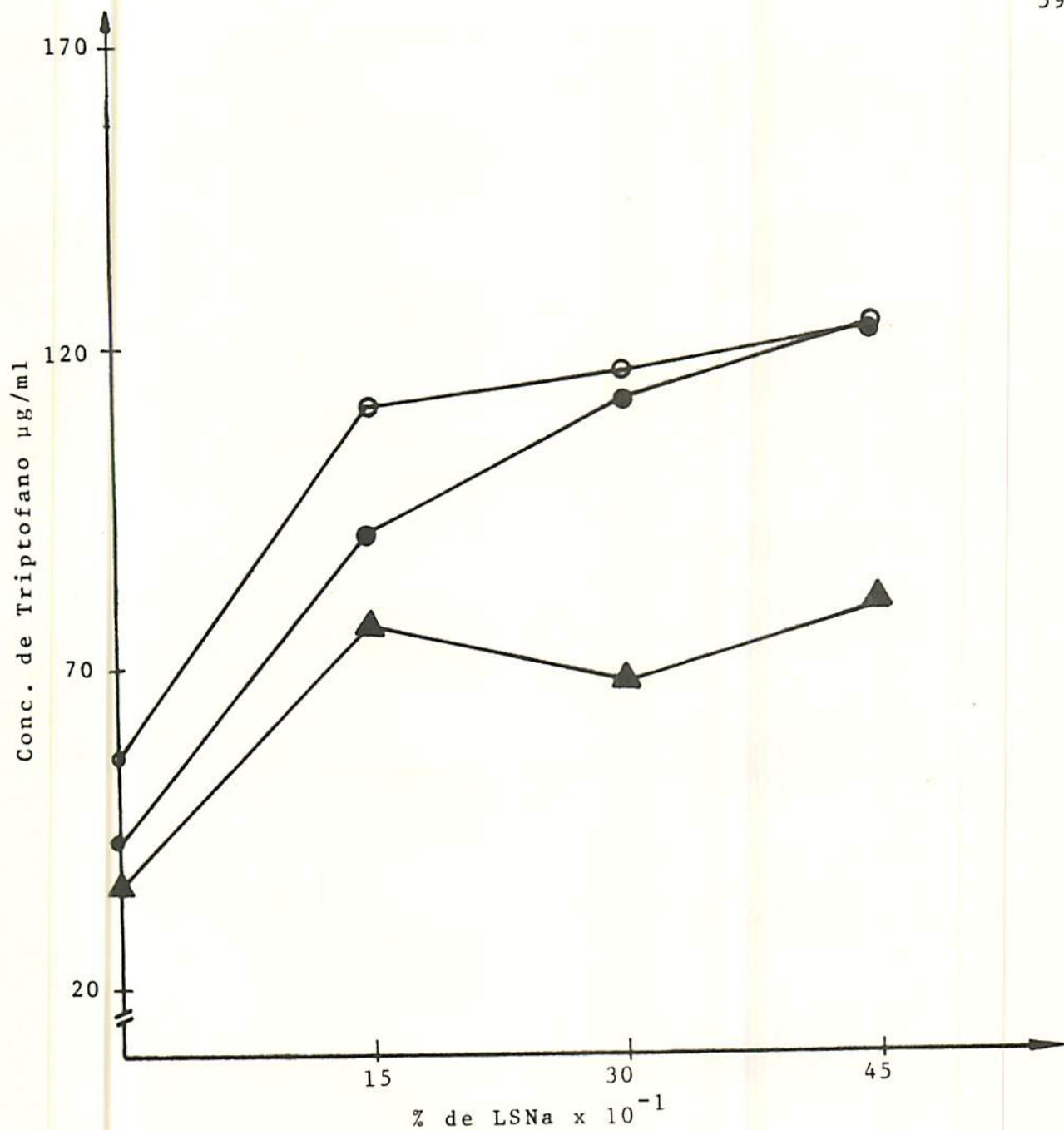


FIGURA 23 - Teor de triptofano em  $\mu\text{g/ml}$  no hidrolisado de sorgo AG-1011 segundo as condições:

- ▲▲— NaOH 0,05 N, temperatura  $50^{\circ}\text{C}$ , tempo 90 minutos.
- NaOH 0,10 N, temperatura  $50^{\circ}\text{C}$ , tempo 90 minutos.
- NaOH 0,15 N, temperatura  $50^{\circ}\text{C}$ , tempo 90 minutos.

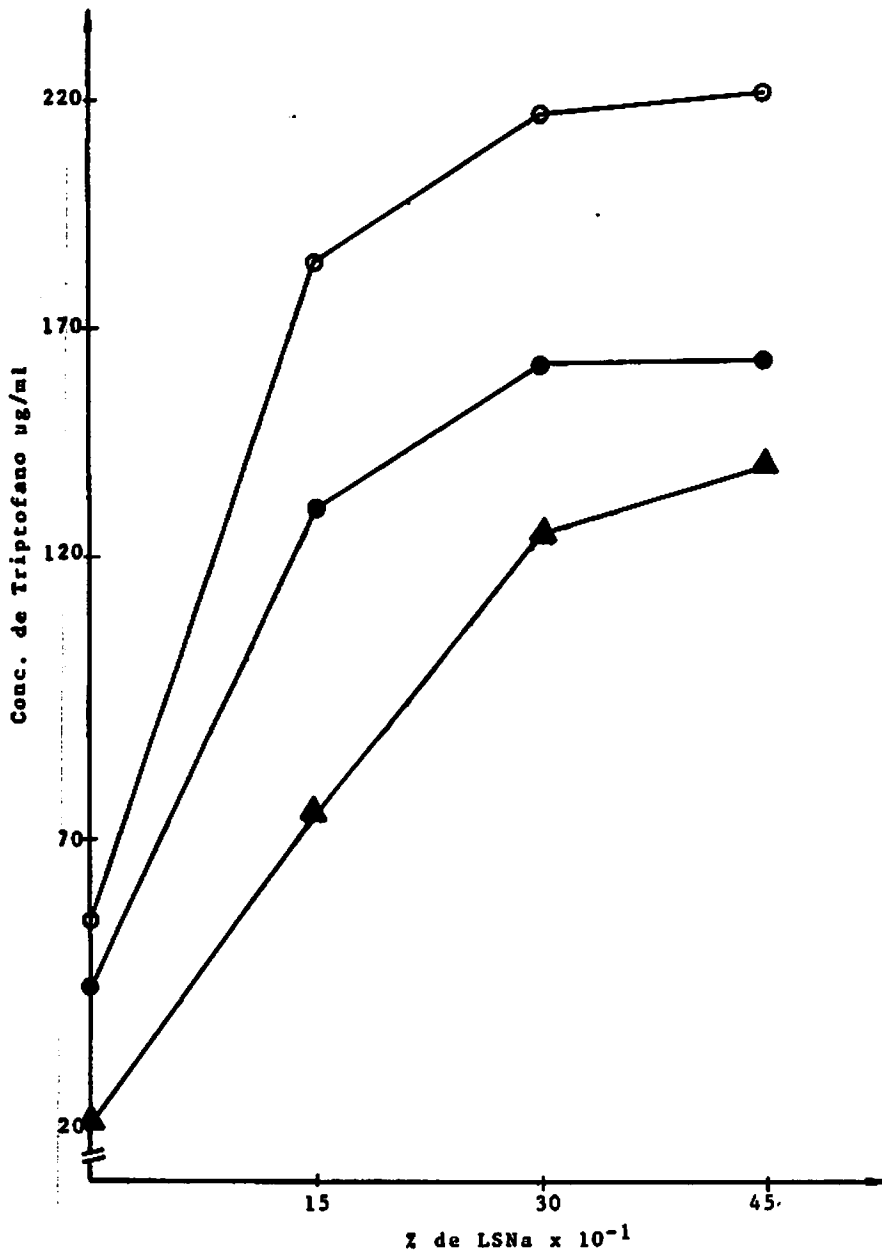


FIGURA 24 - Teor de triptofano em  $\mu\text{g/ml}$  no hidrolisado de sorgo AG-1011 segundo as condições:

- ▲— NaOH 0,05 N, temperatura  $75^{\circ}\text{C}$ , tempo 30 minutos.
- NaOH 0,10 N, temperatura  $75^{\circ}\text{C}$ , tempo 30 minutos.
- NaOH 0,15 N, temperatura  $75^{\circ}\text{C}$ , tempo 30 minutos.



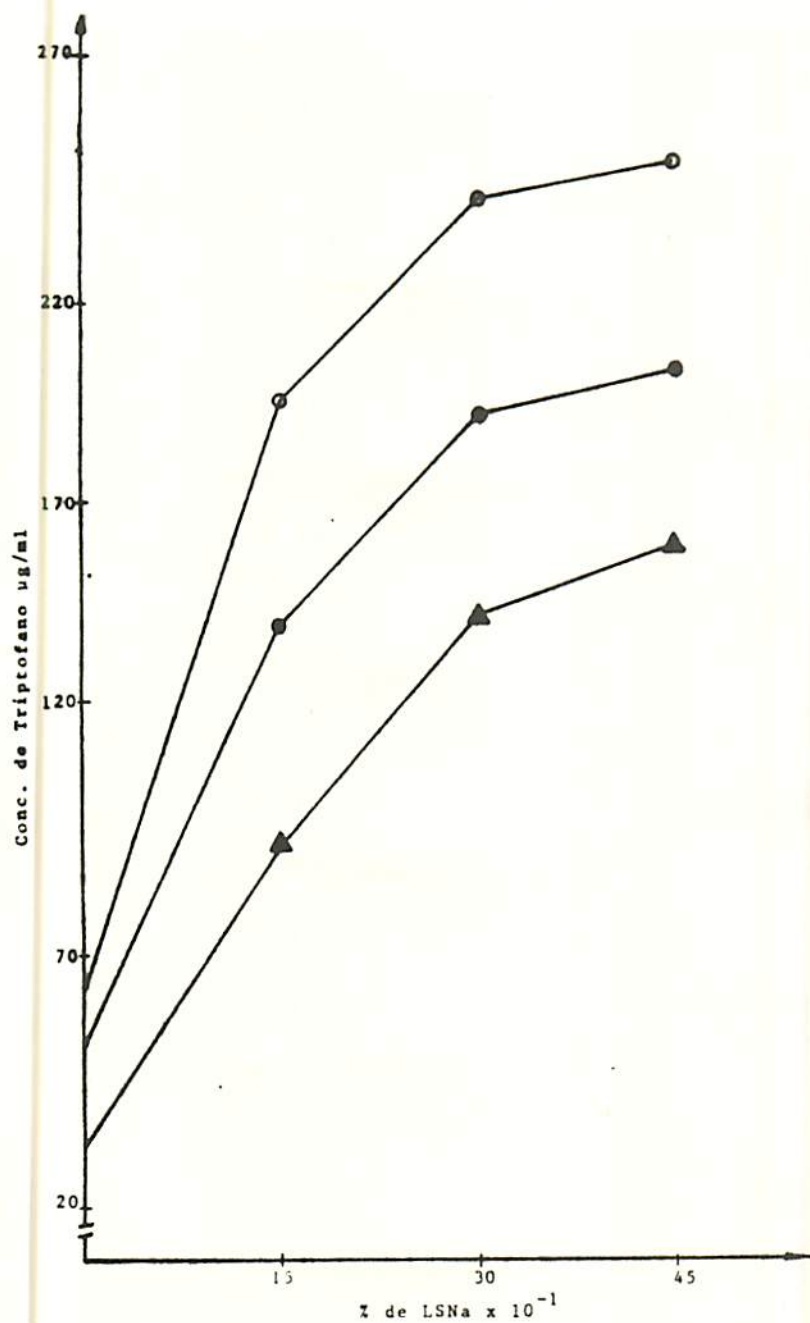


FIGURA 25 - Teor de triptofano em  $\mu\text{g/ml}$  no hidrolisado de sorgo AG-1011 segundo as condições:

- ▲— NaOH 0,05 N, temperatura  $75^{\circ}\text{C}$ , tempo 60 minutos.
- NaOH 0,10 N, temperatura  $75^{\circ}\text{C}$ , tempo 60 minutos.
- NaOH 0,15 N, temperatura  $75^{\circ}\text{C}$ , tempo 60 minutos.

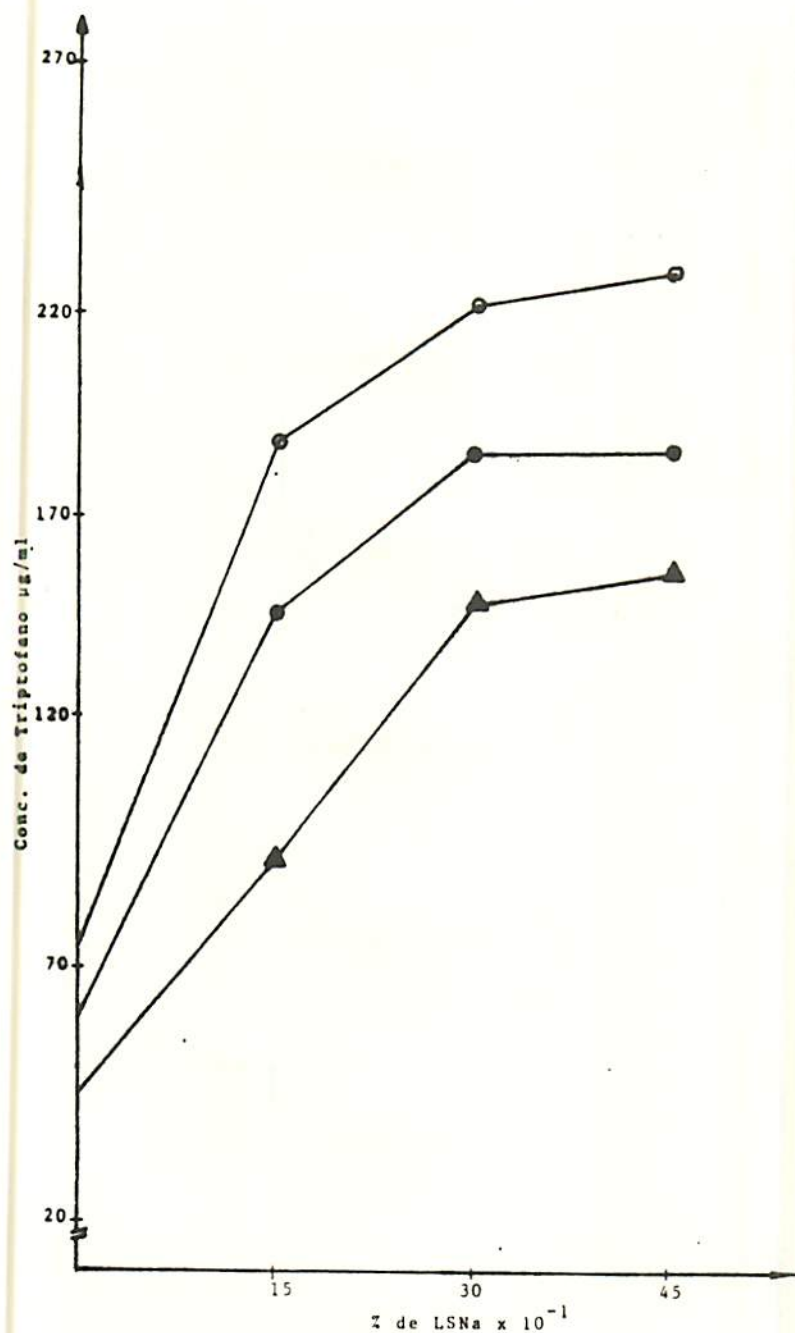


FIGURA 26 - Teor de triptofano em  $\mu\text{g/ml}$  no hidrolisado de sorgo AG-1011 segundo as condições:

- ▲—▲— NaOH 0,05 N, temperatura  $75^{\circ}\text{C}$ , tempo 90 minutos.
- NaOH 0,10 N, temperatura  $75^{\circ}\text{C}$ , tempo 90 minutos.
- NaOH 0,15 N, temperatura  $75^{\circ}\text{C}$ , tempo 90 minutos.

A influência dos fenólicos também foi observada, motivo pelo qual, houve a necessidade de descorticação. Porque quando a amostra analisada se apresentava na forma íntegra, depois de se passar por todos para se obter o hidrolisado, este se apresentava com uma coloração marrom devido a pigmentos que compõem a casca do grão bem como a presença dos fenólicos. Esta coloração impedia a de finição da cor do composto corado, dando uma composição.

Por outro lado os compostos fenólicos em grande quantidade complexam as proteínas, impedindo uma melhor solubilização das mesmas.

Os teores de tanino encontrados no grão do sorgo AG-1011 descorticado foram de 207,20 mg/100g e esta quantidade não interferiu na análise em tratamentos com temperatura mais elevada, mas em temperaturas mais baixas e tempo de solubilização maiores, impediram provavelmente uma melhor solubilização das proteínas. Isto pode ser observado nos gráficos iniciais apresentados para o sorgo AG-1011 descorticado, dessecado e desengordurado.

O sorgo descorticado, dessecado e desengordurado apresentou os seguintes teores de proteína e de triptofano. (Quadro 9).

QUADRO 9 - Teor de triptofano e de proteína no sorgo AG-1011 descorticado, dessecado e desengordurado.

Amostra	Proteína (%)	Triptofano g/100g de sorgo AG-1011
Sorgo AG-1011	9,65	0,23

#### 4.4. Teor de triptofano na caseína

Os resultados dos teores de triptofano na caseína com relação a todos os tratamentos estão no Quadro 3 no apêndice.

Os gráficos da Figura 27 a Figura 37 mostram o comportamento do hidrolisado quanto ao teor de triptofano com relação aos tratamentos aplicados.

Nos tratamentos iniciais já se observa para proteína pura um melhor comportamento com hidróxido de sódio 0,10 N para todos os níveis de lauril sulfato de sódio.

Quando há o aumento de temperatura pode-se observar uma influência negativa com relação aos níveis de triptofano, devido talvez a uma destruição do mesmo, como relatam LUCAS & SOTECO (23) mostrando os efeitos da concentração de alcalis, temperatura e tempo de hidrólise em proteínas puras, onde o aumento de temperatura causa uma destruição de 5% do triptofano original, e sob as condições que são citadas nesse trabalho concluem que um tempo máximo de hidrólise para triptofano em proteínas puras ou isolados proteicos e de 4 horas e 8 horas para outros alimentos.

Entre os tratamentos para proteína pura o que apresentou melhor solubilização foi o tratamento com hidróxido de sódio 0,10N, lauril sulfato de sódio 4,5%, temperatura 50°C, no tempo de 90 minutos-

Nestas condições obtêm-se teores de triptofano dentro daqueles relatados na literatura, TURNER (41).

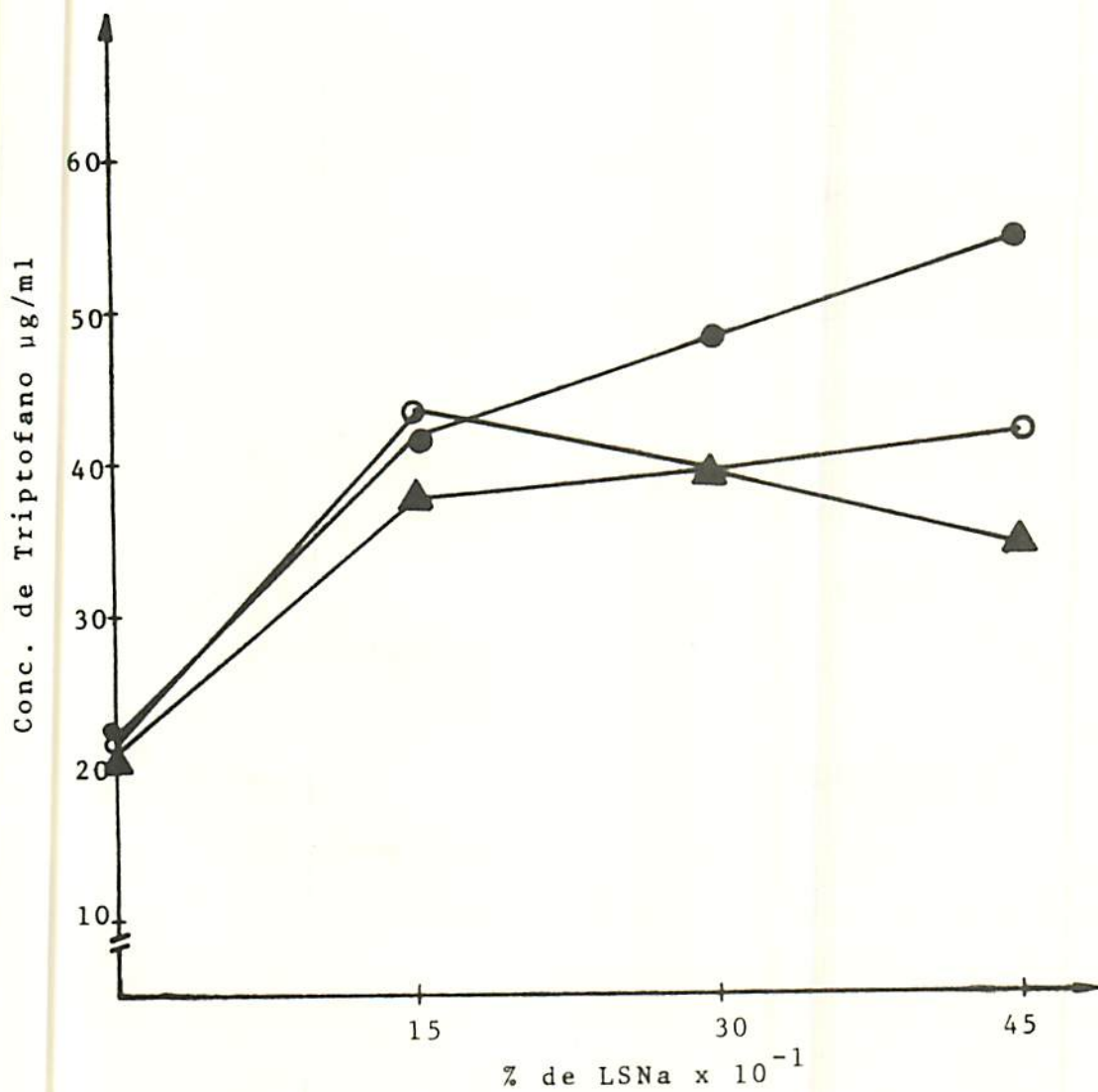


FIGURA 27 - Teor de triptofano em  $\mu\text{g/ml}$  no hidrolisado de caseína

Hammarsten segundo as condições:

—▲— NaOH 0,05 N, temperatura 25°C, tempo 30 minutos.

—●— NaOH 0,10 N, temperatura 25°C, tempo 30 minutos.

—○— NaOH 0,15 N, temperatura 25°C, tempo 30 minutos.

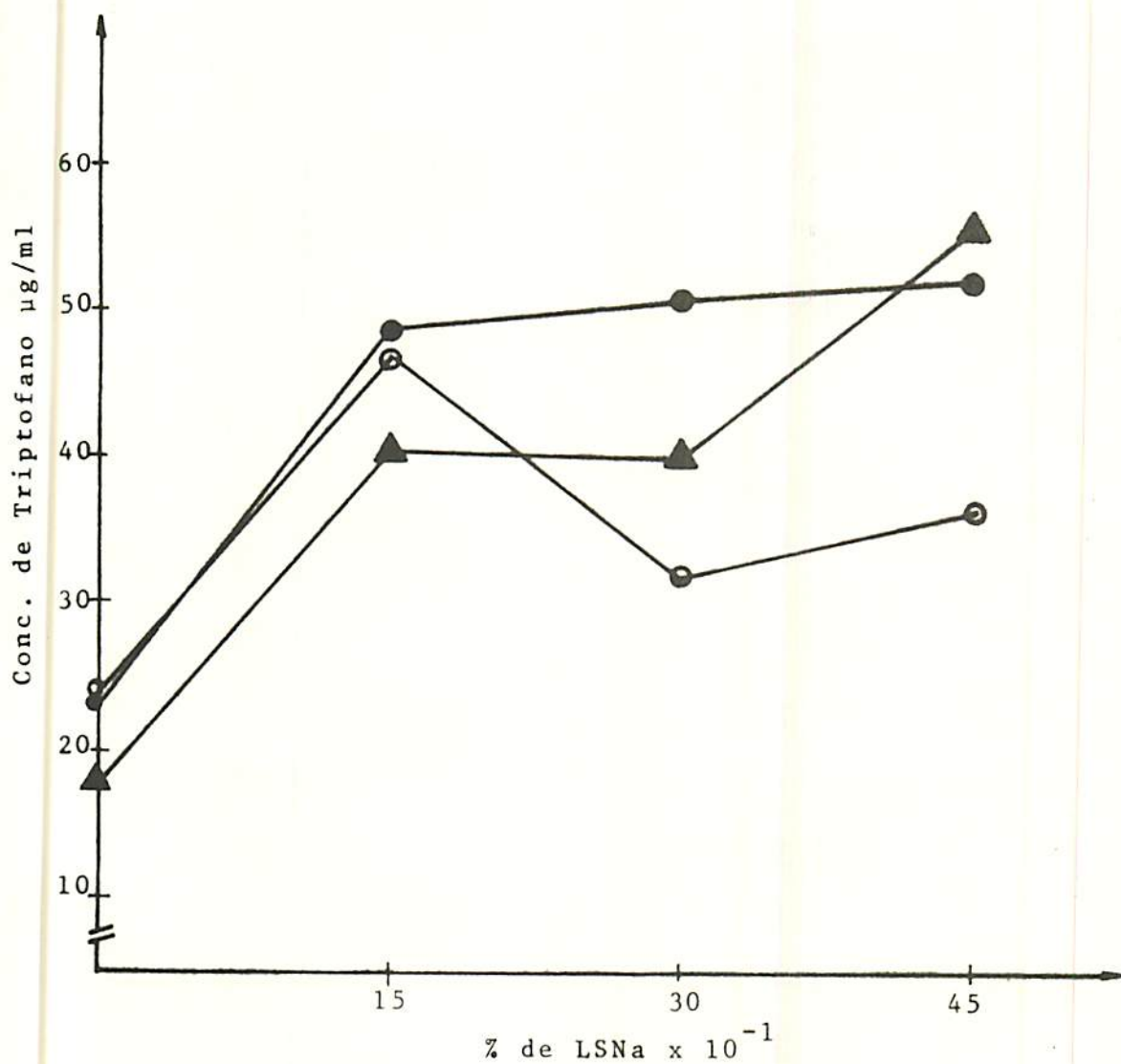


FIGURA 28 - Teor de triptofano em  $\mu\text{g/ml}$  do hidrolisado de caseína Hammarsten segundo as condições:

- ▲— NaOH 0,05 N, temperatura  $25^{\circ}\text{C}$ , tempo 60 minutos.
- NaOH 0,10 N, temperatura  $25^{\circ}\text{C}$ , tempo 60 minutos.
- NaOH 0,15 N, temperatura  $25^{\circ}\text{C}$ , tempo 60 minutos.

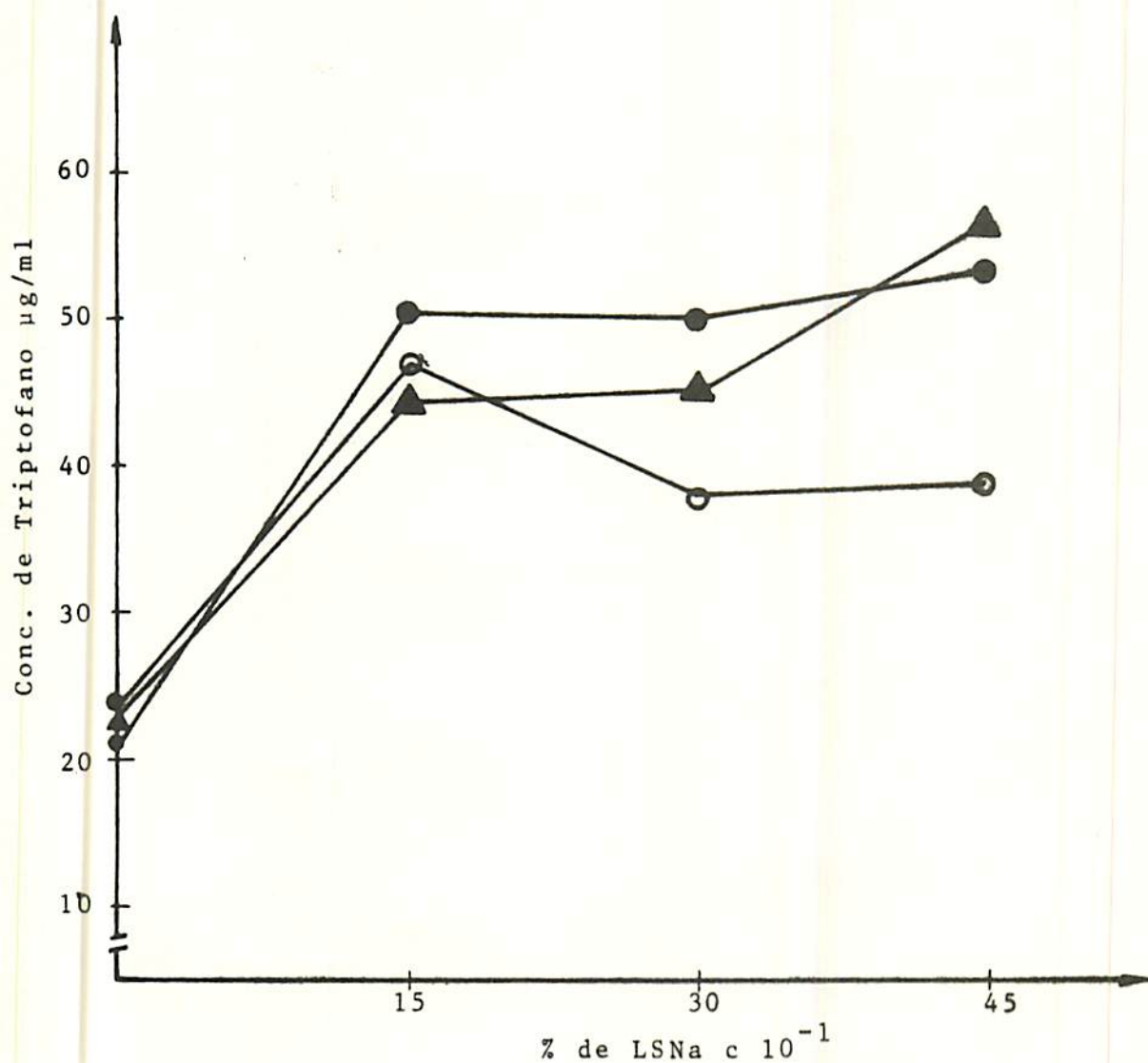


FIGURA 29 - Teor de triptofano em  $\mu\text{g/ml}$  do hidrolisado de caseína

Hammarsten segundo as condições:

—▲▲— NaOH 0,05 N, temperatura  $25^{\circ}\text{C}$ , tempo 90 minutos.

—●●— NaOH 0,10 N, temperatura  $25^{\circ}\text{C}$ , tempo 90 minutos.

—○— NaOH 0,15 N, temperatura  $25^{\circ}\text{C}$ , tempo 90 minutos.

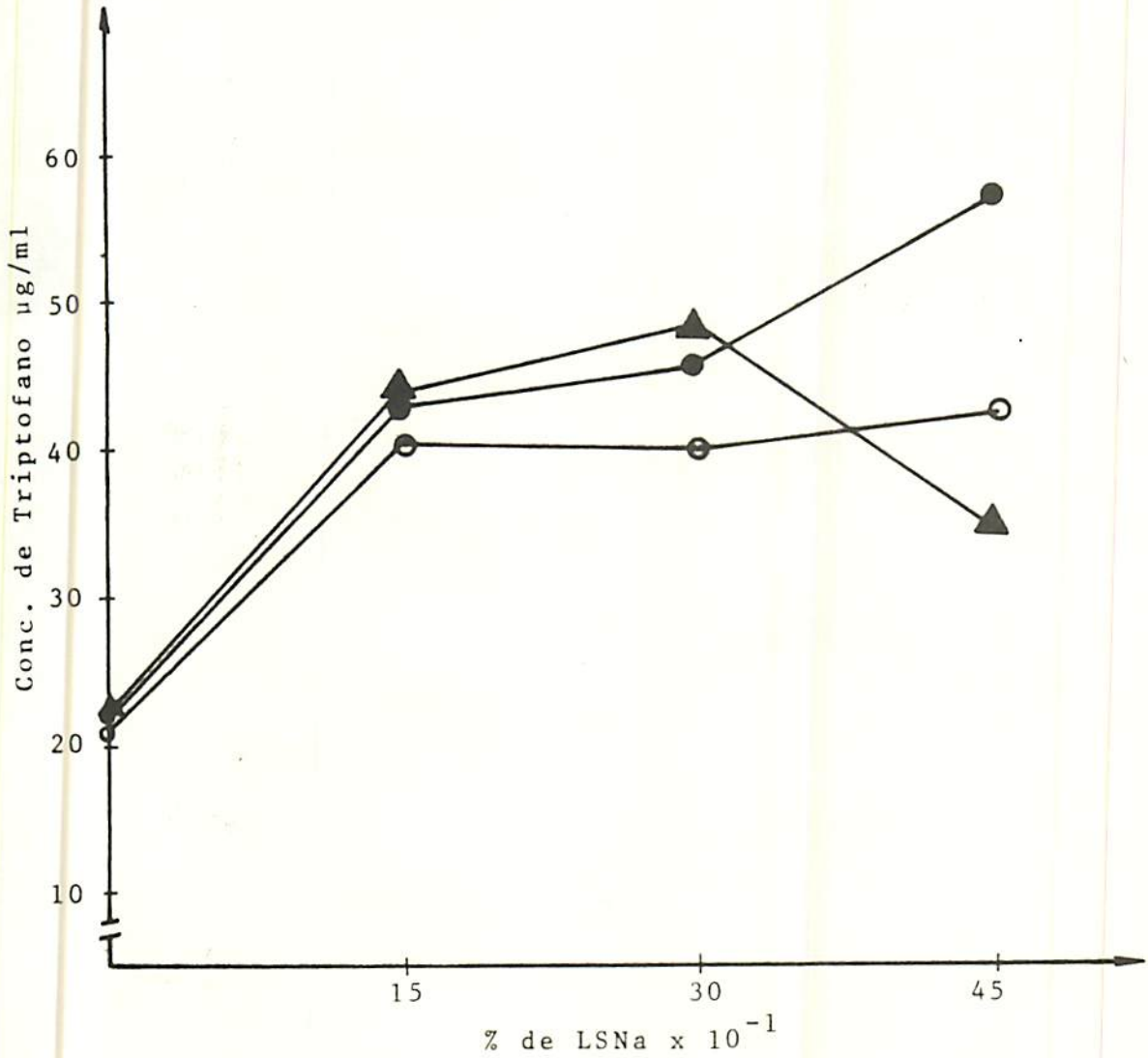


FIGURA 30 - Teor de triptofano em  $\mu\text{g/ml}$  no hidrolisado de caseína

Hammarsten segundo as condições:

▲▲ NaOH 0,05 N, temperatura  $50^{\circ}\text{C}$ , tempo 30 minutos.

●● NaOH 0,10 N, temperatura  $50^{\circ}\text{C}$ , tempo 30 minutos.

○○ NaOH 0,15 N, temperatura  $50^{\circ}\text{C}$ , tempo 30 minutos.



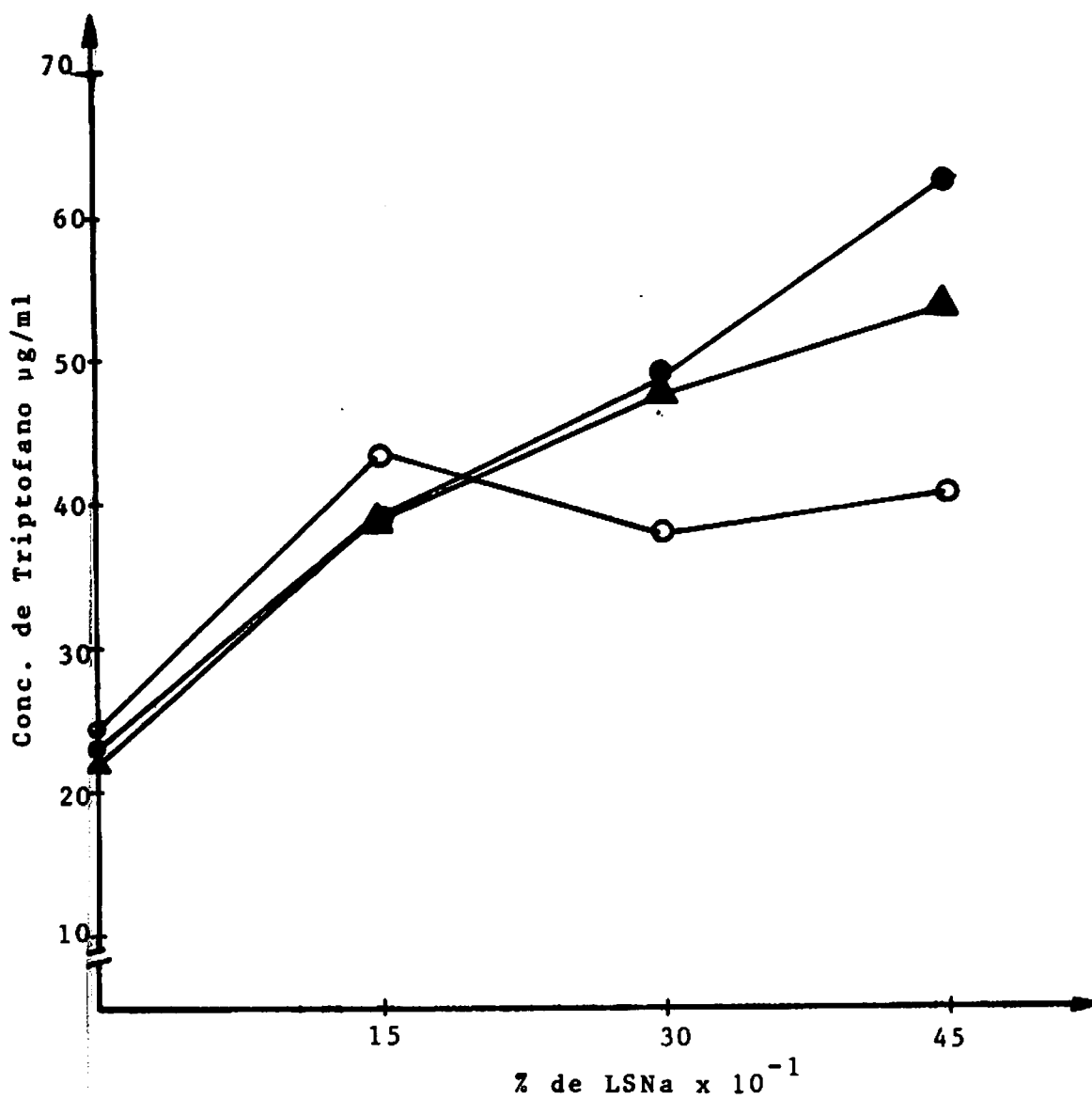


FIGURA 31 - Teor de triptofano em  $\mu\text{g/ml}$  no hidrolisado de caseína Hammarsten segundo as condições:

- ▲▲ NaOH 0,05 N, temperatura 50°C, tempo 60 minutos.
- NaOH 0,10 N, temperatura 50°C, tempo 60 minutos.
- NaOH 0,15 N, temperatura 50°C, tempo 60 minutos.

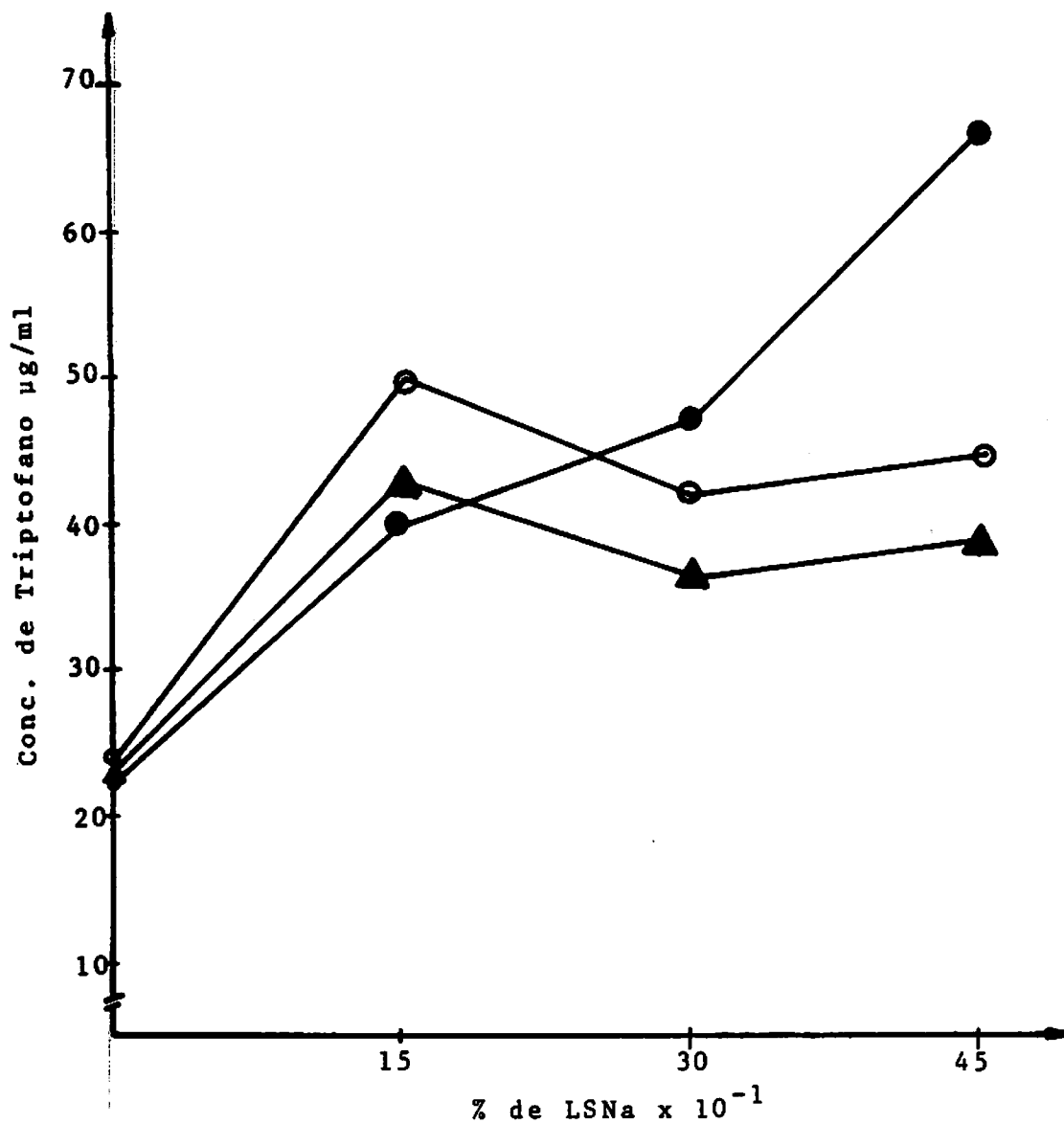


FIGURA 32 - Teor de triptofano em µg/ml do hidrolisado de caseína Hammarsten segundo as condições:

- ▲— NaOH 0,05 N, temperatura 50°C, tempo 90 minutos.
- NaOH 0,10 N, temperatura 50°C, tempo 90 minutos.
- NaOH 0,15 N, temperatura 50°C, tempo 90 minutos.

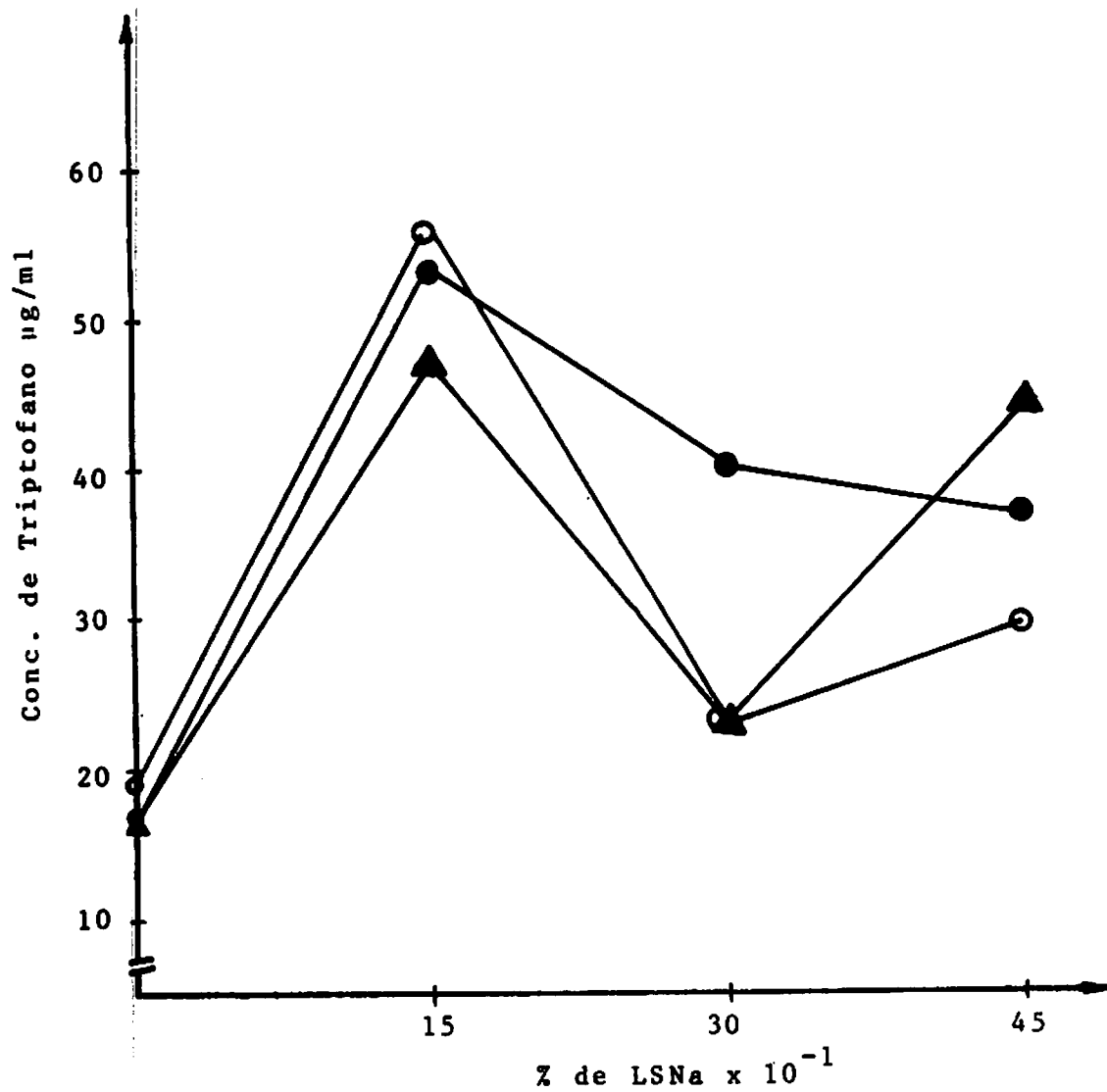


FIGURA 33 - Teor de triptofano em  $\mu\text{g/ml}$  no hidrolisado de caseína Hammarsten segundo as condições:

- ▲— NaOH 0,05 N, temperatura  $75^{\circ}\text{C}$ , tempo 30 minutos.
- NaOH 0,10 N, temperatura  $75^{\circ}\text{C}$ , tempo 30 minutos.
- NaOH 0,15 N, temperatura  $75^{\circ}\text{C}$ , tempo 30 minutos.

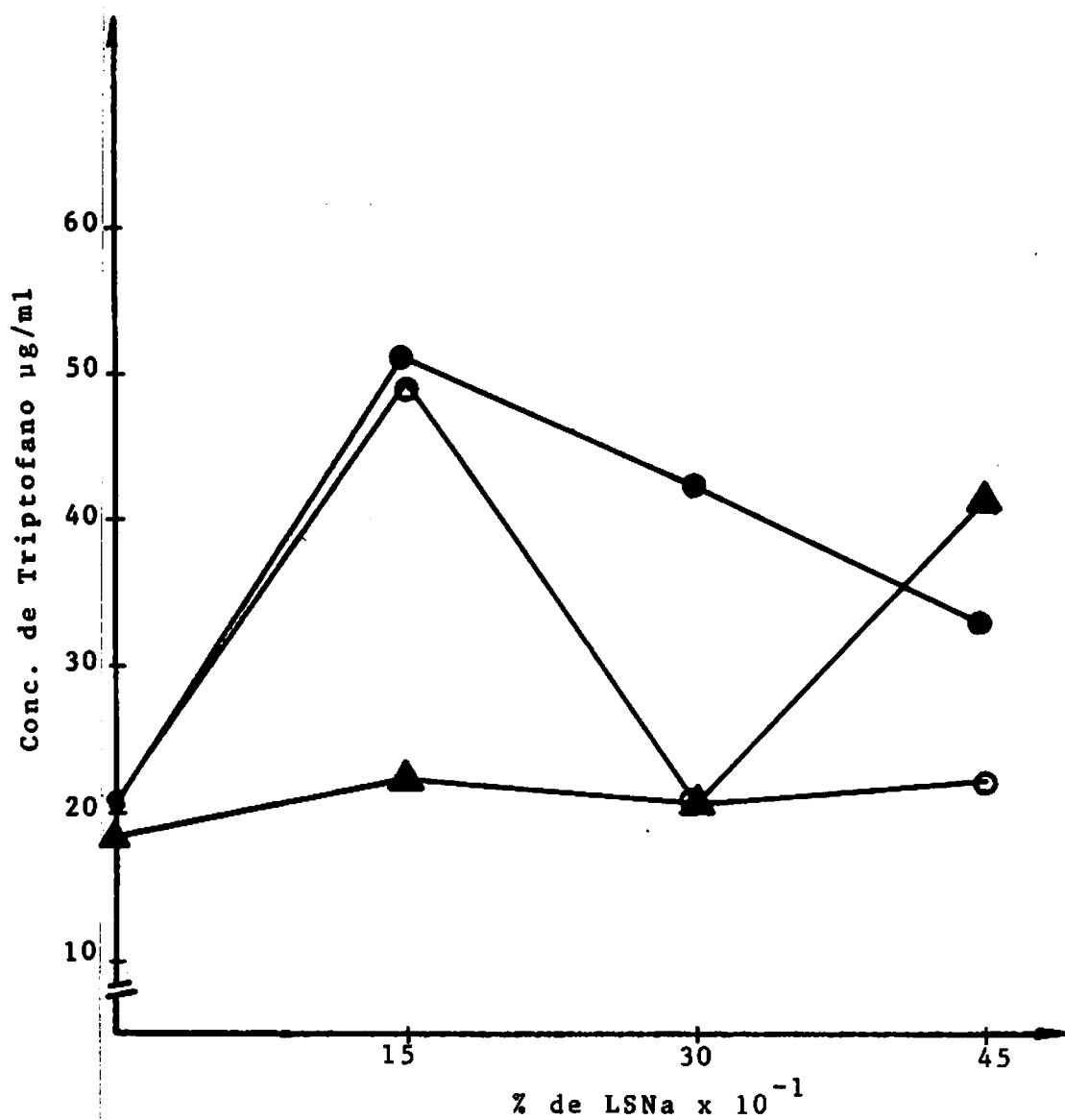


FIGURA 34 - Teor de triptofano em  $\mu\text{g/ml}$  no hidrolisado de caseína Hammarsten segundo as condições:

- ▲— NaOH 0,05 N, temperatura 75°C, tempo 60 minutos.
- NaOH 0,10 N, temperatura 75°C, tempo 60 minutos.
- NaOH 0,15 N, temperatura 75°C, tempo 60 minutos.

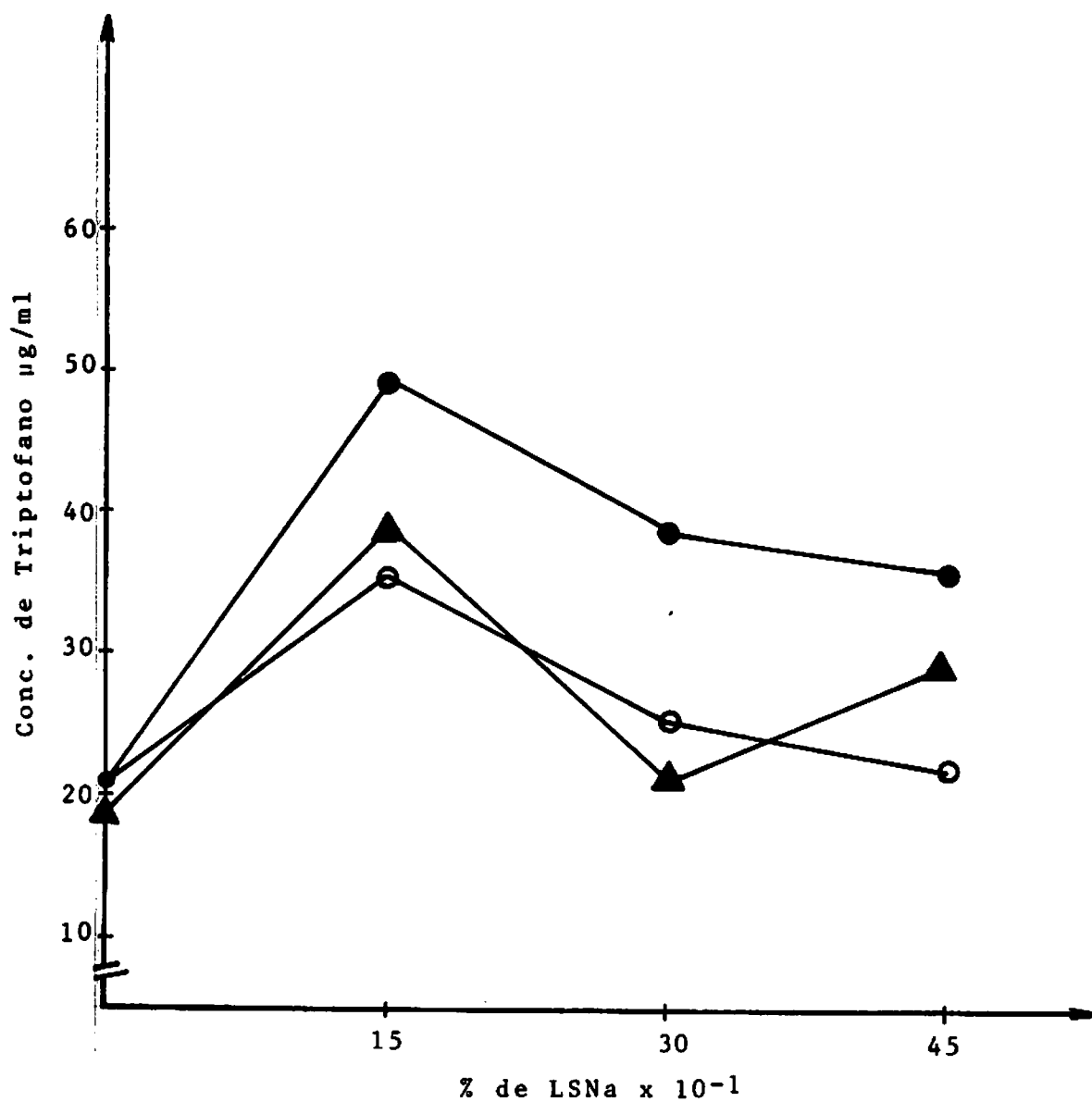


FIGURA 35 - Teor de triptofano em µg/ml no hidrolisado de caseína

Hammarsten segundo as condições:

▲▲ NaOH 0,05 N, temperatura 75°C, tempo 90 minutos.

●● NaOH 0,10 N, temperatura 75°C, tempo 90 minutos.

○○ NaOH 0,15 N, temperatura 75°C, tempo 90 minutos.

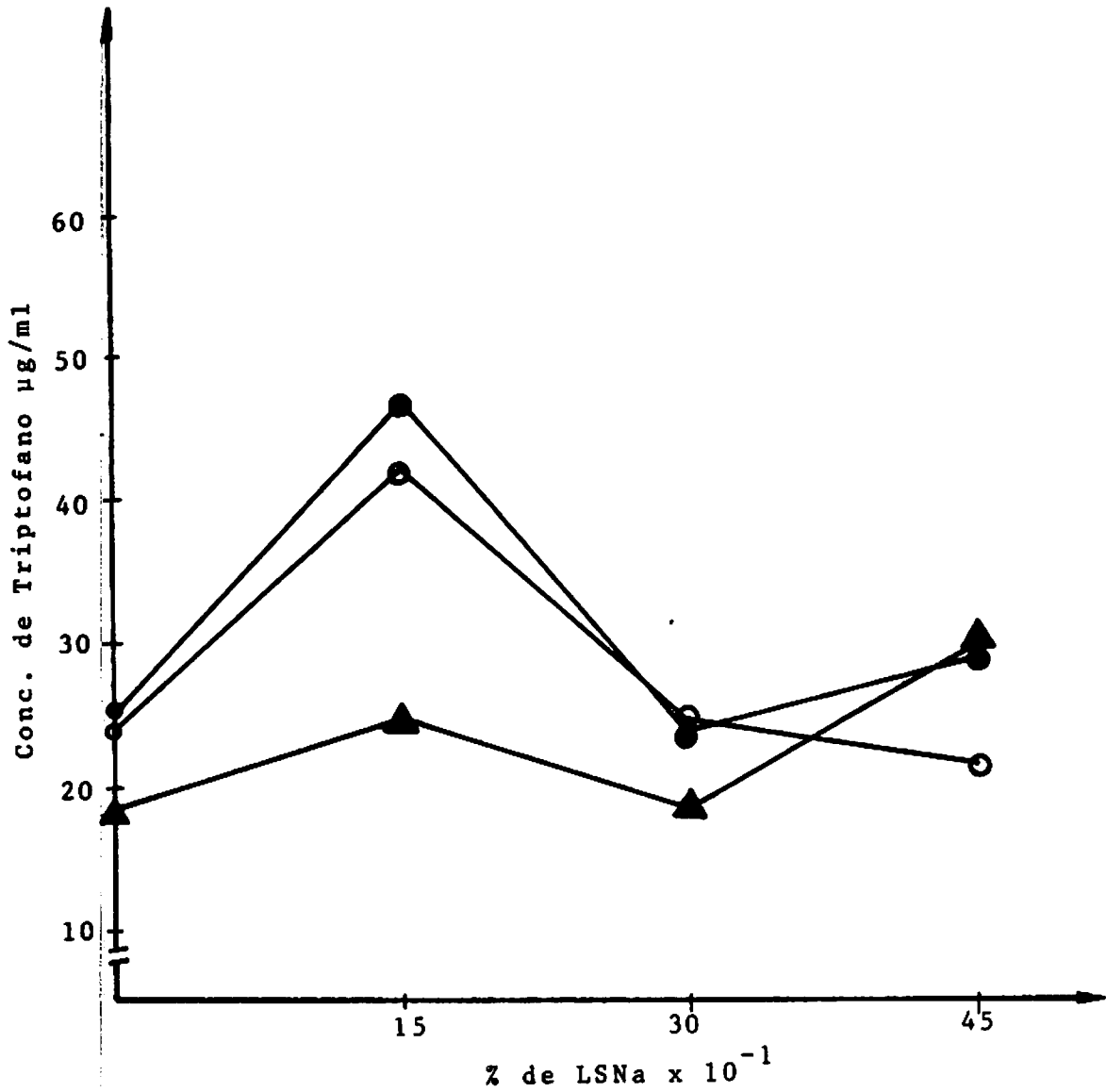


FIGURA 36 - Teor de triptofano em  $\mu\text{g/ml}$  no hidrolisado de caseína Hammarsten segundo as condições.

- ▲— NaOH 0,05 N, temperatura 98°C, tempo 30 minutos.
- NaOH 0,10 N, temperatura 98°C, tempo 30 minutos.
- NaOH 0,15 N, temperatura 98°C, tempo 30 minutos.

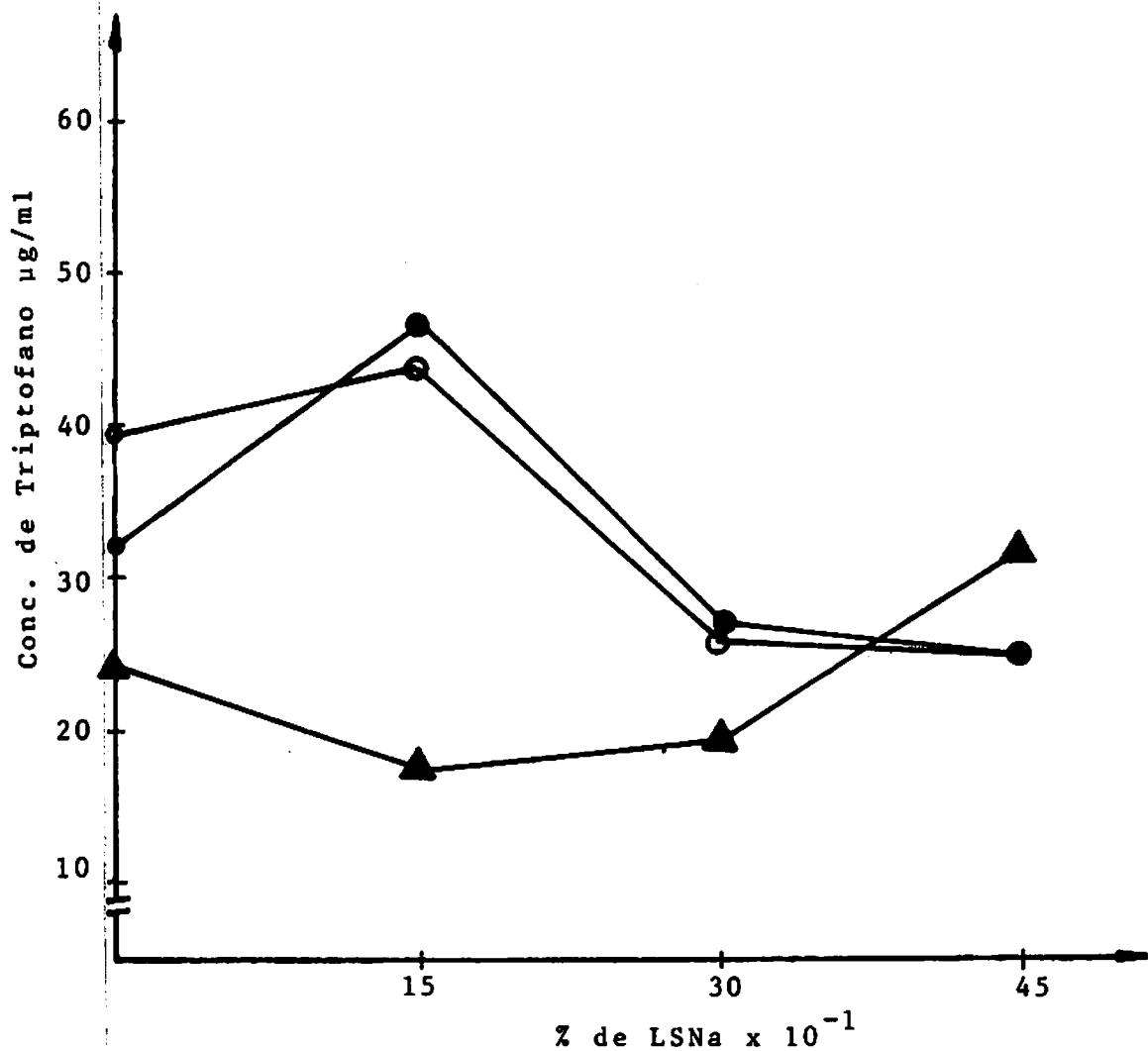


FIGURA 37 - Teor de triptofano em  $\mu\text{g/ml}$  no hidrolisado de caseína Hammarsten segundo as condições:

- ▲— NaOH 0,05 N, temperatura  $98^{\circ}\text{C}$ , tempo 60 minutos.
- NaOH 0,10 N, temperatura  $98^{\circ}\text{C}$ , tempo 60 minutos.
- NaOH 0,15 N, temperatura  $98^{\circ}\text{C}$ , tempo 60 minutos.

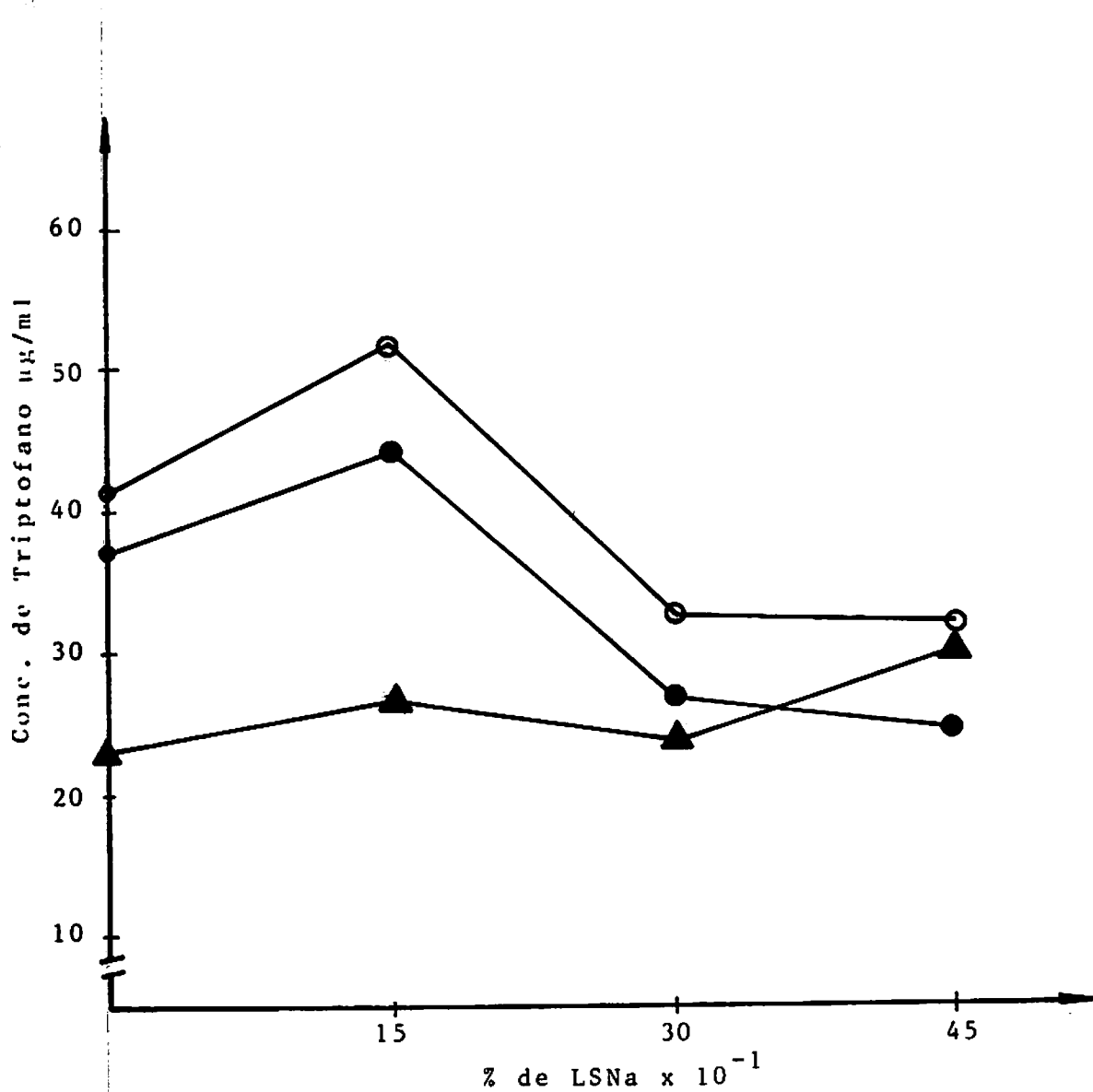


FIGURA 38 - Teor de triptofano em  $\mu\text{g/ml}$  no hidrolisado de caseína Hammarsten segundo as condições:

- ▲—▲ NaOH 0,05 N, temperatura  $98^{\circ}\text{C}$ , tempo 90 minutos.
- NaOH 0,10 N, temperatura  $98^{\circ}\text{C}$ , tempo 90 minutos.
- NaOH 0,15 N, temperatura  $98^{\circ}\text{C}$ , tempo 90 minutos.



## 5. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, com as diversas variações de concentração de lauril sulfato de sódio associado às concentrações de hidróxido de sódio, com variações de temperatura e tempo para solubilização das proteínas.

Conclui-se que:

- O lauril sulfato de sódio, atuou de forma significativa nos diferentes níveis de aplicação, diminuindo o tempo de solubilização.

- A solubilização pode ser processada em temperatura relativamente baixa em relação a outras técnicas que utilizam temperaturas mais elevadas.

Entre os diversos tratamentos utilizados para a determinação do triptofano, pode-se seguir a seguinte marcha analítica: Colocar em um frasco cônico de 125 ml, 0,5 g a 1 g de amostra finamente pulverizada, que já tenha sido dessecada e desengordurada, juntar 5 ml de solução 4,5% lauril sulfato de sódio, agitar, em seguida adicionar 5 ml de hidróxido de sódio 0,15 N. Tampar o frasco e colocar em banho maria a 75°C por 60 minutos, agitando de vez em quando. Após esta etapa centrifugar por 15 minutos de 3500-4000 rpm. Retirar

o sobrenadante, Pipetar 1 ml do sobrenadante para tubo de ensaio, adicionar 2 ml de solução (1) e 1 ml de solução (2). Deixar na ausência de luz por 15 minutos. Em seguida efetuar leitura em espectrofotômetro em 565 nm.

Solução (1): ácido acético glacial contendo 56 mg  $\text{Fe}^{+++}$  / litro (0,27g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  dissolvido em 0,5 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ ).

Solução (2): ácido sulfúrico concentrado.

## 6. RESUMO

Este trabalho teve por objetivo estudar o efeito do lauril sulfato de sódio na solubilização de proteínas, visando uma modificação da etapa hidrolítica de SESSA et alii (31), para quantificação do aminoácido triptofano. Foram feitos vários tratamentos modificando níveis de lauril sulfato de sódio, hidróxido de sódio, temperatura e tempo.

As condições dos tratamentos foram: lauril sulfato de sódio 0%; 1,5%; 3,0%; 4,5%; hidróxido de sódio 0,05N, 0,10N e 0,15N; temperatura de estudo 25°C; 50°C; 75°C; 98°C, por um período de 30; 60 e 90 minutos.

As amostras de milho e sorgo foram moídas, dessecadas e delipidadas, sendo que o sorgo, teve seus grãos discorticados para evitar efeitos dos fenólicos.

Foi utilizada uma proteína pura (caseína Hammarsten) como controle e para a curva padrão utilizou-se DL-triptofano.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, sendo feita análise de variância pelo programa AVBRPOL.

A dosagem da proteína foi feita pelo método micro-Kjeldahl ( $N \times 6,25$ ).

Pelos resultados obtidos, verificou-se o efeito acentuado do lauril sulfato de sódio na solubilização das proteínas de milho e sorgo. Entre as temperaturas, a  $75^{\circ}C$  foi a que apresentou melhor resultado, sendo o período de 60 minutos.

Na temperatura mais alta  $98^{\circ}C$  verificou-se a formação de um gel que impediu a separação do sobrenadante.

O uso de lauril sulfato de sódio contribuiu para melhorar a solubilização das proteínas, e efetivamente para determinação do triptofano, com decréscimo no tempo e baixa temperatura.

## 7. SUMMARY

This work studied here is the effect of sodium lauryl sulphate (LSNa) on protein solubilization modifying Sessa et alii (31) technique for tryptophan determination. The experimental design used different levels of LSNa; sodium hydroxide; temperature and time extraction.

Treatment conditions were: sodium lauryl sulphate at 0, 1,5, 3,0 and 4,5%; sodium hydroxide at 0,05, 0,10 and 0,15 N; temperature of 25, 50, 75 and 98°C; time of 30, 60 and 90 minutes.

Samples of corn and sorghum were ground, dried; fat extracted; sorghum grain was previously decorticated.

Casein was used as a control, and for standard curve according to Beer's law DL-tryptophan was used.

Results from a completely randomized experimental design were analysed using the AVBRPOL program.

Protein content was determined by micro-Kejeldahl from the results obtained it is concluded that sodium lauryl sulphate was very effective on corn and sorghum protein solubilization for posterior tryptophan determination.

Among temperatures the best results were obtained at 75°C. at 98°C protein hydrolysed was not extracted due to the gel formation.

The best extraction time was 60 minutes.

The use of LSNa improved protein extraction contributing effectively to tryptophan determination due to the decrease in time extraction and use of low temperature.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBINO, T.F.L.; ROSTAGNO, G.H.; FONSECA, B.J.; COSTA, A.M.P. & COELHO, T.L.M. Tabela de composição de alimentos concentrados. VI. Valores de triptofano e de triptofano aparentemente metabolizável. Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Viçosa, 10(1):147-55, 1981.
2. ANDERSON, N.E. & CLYDESDALE, F.M. Analysis of tryptophan utilizing its reaction with alpha-ketoglutaric acid. Journal of Food Science, Chicago, 43(5):1595-9, Sept./Oct. 1978.
3. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 12.ed. Washington, 1975. 1094p.
4. BAKRI, M. & CARLSON, J.R. Chromatographic separation of tryptophan metabolites. Analytical Biochemistry, New Yor, 34(1): 46-65, Mar. 1970.
5. BARMAN, T.E. & KOSHLAND JÚNIOR, D.F. A colorimetric procedure for the quantitative determination of tryptophan residues in proteins. The Journal of Biological Chemistry, Baltimore, 242(24):5771-6, Dec. 1967.

6. DANNO, G.; KANAZAWA, K. & NATAKE, M. Extraction of wheat flour proteins with sodium dodecyl sulfate and their molecular weight distribution. Agricultural and Biological Chemistry, Tokyo, 38(10):1948-55, Oct. 1974.
7. DE VRIES, J.W.; KOSKI, M.C.; EGBERG, D.C. & LARSON, A.P. Comparison between a spectrophotometric and a high-pressure liquid chromatography method for determining tryptophan in food products. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Washington, 28(5):896-9, Sept./Oct. 1980.
8. FLIEDEL, G. & KOBREHEL, K. Studies on sorghum proteins. I. Solubilization of protein with soaps. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Washington, 33(2):303-8, Mar./Apr. 1985.
9. FRIEDMAN, M. & SIGEL, C.W. A kinetic study of the ninhydrin reaction. Biochemistry, Washington, 5(20):478-85, Feb. 1966.
10. GODWIN, T.W. & MORTON, R.A. The spectrophotometric determination of tyrosine and tryptophan in proteins. Biochemical Journal, Colchester, 40:28-32, 1946.
11. GRUEN, L.C.; NICHOLLS, P.W. Improved recovery of tryptophan following acid hydrolysis of proteins. Analytical Biochemistry, Washington, 47(2):348-55, Feb. 1972.



12. HARVEY, G.D.; MILLER, E.J. & ROBSON, W. The Adamkiewicz, Hopkins and Cale, and Rosenhein Tests for Tryptophan. An Investigation of the Configuration of the Organic Molecule responsible for the Colour Formation and its Bearing on the Constitution of Yohimbine, with a Note on the Action of Formaldehyde on Tryptophan. Journal of the Chemical Society, London, (1):153-9, Jan. 1941.
13. HERNÁNDEZ, H.H. & BATES, L.S. A modified method for rapid tryptophan analysis of maize. Mexico, International maize and wheat Improvement Center, 1969. 7p. (Research Bulletin,13).
14. HOPKINS, G.F. & COLE, W.S. A contribution to the chemistry of proteins. Part I. A preliminary Study of a hitherto undescribed Product of Tryptic Digestion. The Journal of Physiology, New York, 27:418, 1901.
15. HOWE, J.M.; YAMAMURA, Y. & CLARK, H.E. Determination of tryptophan in cereals. Cereal Chemistry, Saint Paul, 49(5): 566-71, Sept./Oct. 1972.
16. JACOBS, W.A. & CRAIG, L.C. The ergot alkaloids. VIII. The synthesis of 4-carboxylic acids. Journal of Biological Chemistry, Baltimore, 113(3):759-65, Mar. 1936.
17. JOSEPH, A.; CHEVASSUS AGNES, S. Proteins and lysine contents of some North-Cameroon hybrids of sorghum grains. Cahiers de l'ONAREST (1979), 2(3):5-16, (En, 33 ref.). From Abstracts on Tropical Agriculture (1980), 6(4); Abst. 29745.

In: PLANT BREEDING ABSTRACTS, Farnham Royal, 51(11):852, Nov. 1981, abstracts 9648.

18. KNOX, R.; KOHLER, G.O.; PALTER, R. & WALKER, H.G. Determination of tryptophan in feeds. Analytical Chemistry, New York, 36(1):136-43, Jan. 1964.
19. LIMA, P.C. & SILVEIRA, J.V. Manual de usuário: AVBRPOL (análise de variância para ensaios balanceados e regressão linear). 3.ed. Lavras, ESAL, 1983. 15p.
20. LIU, T.Y. & CHANG, Y.H. Hydrolysis of proteins with p-toluene-sulfonic acid. Determination of tryptophan. Journal of Biological Chemistry, Baltimore, 246(9):2842-8, May 1971.
21. LOMBARD, J.H. & LANG, D.J. de. The chemical determination of tryptophan in foods and mixed diets. Analytical Biochemistry, New York, 10(2):260-5, Feb. 1975.
22. LOTT, W.L.; NERY, J.P.; GALLO, J.R. & MEDCALF, J.C. A técnica de análise foliar aplicada ao cafeeiro. New York, IBEC Research Institute, 1956, 40p. (IBEC Research Institute, 9).
23. LUCAS, B. & SOTELO, A. Effect of different alkalies, temperature, and hydrolysis times on tryptophan determination of pure protein and of foods. Analytical Biochemistry, New York, 109(1):192-7, Nov. 1980.

24. MATSUBARA, H. & SASAKI, R.M. High recovery of tryptophan from acid hidrolysates of proteins. Biochemical and Biophysical Research Communications, New York, 35(2):175-81, Mar./Apr. 1969.
25. MILLER, E.L. Determination of the tryptophan content of feedingstuffs with particular reference to cereals. Journal of the Science of Food and Agriculture, London, 18(9):381-6, Sept. 1967.
26. NEUCERE, J.N.; JACKS, J.T. & SUMRELL, G. Interactions of globular protein with simple polyphenols. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Washington, 26(1):214-6, Jan./Feb. 1978.
27. NEUZIL, E.; LABADIE, M. & BRETON, J.C. Recherches sur la reactivité des composés indoliques. Bulletin Societé Pharmacié Bordeaux, Bordeaux, 105(1):20-40, 1966.
28. OPIENSKA-BLAUTH, J.; CHAREZINSK, M. & BERBEC, H. A new rapid method of determining tryptophan. Analytical Biochemistry, New York, 6(1):69-76, July 1963.
29. PENKE, B.; FERENCZI, R. & KOVÁCS, K. A new acid hydrolysis method for determining tryptophan in peptides and Proteins. Analytical Biochemistry, Washington, 60(1):45-50, Jan. 1974.
30. SEBER, G.A.F. Linear regression analysis. New York, John Wiley, 1977. 465p.

31. SESSA, D.J.; ABBEY, K.J. & RACKISS, J.J. Tryptophan in soybean meal and soybean whey proteins. Cereal Chemistry, Saint Paul, 48(3):321-7, May/June 1971.
32. SINGHANIA, D.L.; DEOSTHALE, Y.G.; RAO, N.G.P. A study of gene action for protein and lysine content in sorghum (*S. bicolor* (L.) Moench). Indian Journal of Heredity (1979), 11(1):25-34, (En, 17 ref.) IARI Reg. Res. Sta., Rajendranagar, Hyderabad, India. In: PLANT BREEDING ABSTRACTS, Farnham Royal, 50(8):621, Aug. 1980. abstracts 7235.
33. SLUMP, P. & SCHRENDER, H.A.W. Determination of tryptophan in foods. Analytical Biochemistry, New York, 27(2):182-6, Feb. 1969.
34. SMITH, M.H. The amino acid composition of proteins. Journal of Theoretical Biology, London, 13(4):261-82, Dec. 1966.
35. SMITH, G.A. & FRIEDMAN, M. Effect of carbohydrates and heat on the amino acid composition and chemically available lysine content of casein. Journal of Food Science, Chicago, 49(3):817-20, May/June 1984.
36. SPIES, R.J. & CHAMBERS, C.D. Chemical determination of tryptophan. Analytical Chemistry, Washington, 20(1):30-39, Jan. 1948.
37. \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. Chemical determination of tryptophan in proteins. Analytical Chemistry, Washington, 21(10):1249-66, Oct. 1949.

38. STEPHENSON, E.L.; YORK, J.O.; BRAGG, D.B. & IVY, C.A. The amino acid content and availability of different strains of grain sorghum to the chick. Poultry Science, Champaign, 50 (2):581-4, Mar. 1971.
39. TAFURI, L.M. & BRUNE, W. Avaliação de triptofano em grãos de milho. Experientiae, Viçosa, 11(9):319-333, maio 1971.
40. TEMCHENKO, V.A. |Protein and lysine content in the grain of parents and first-generation sorghum hybrids|. Byul VNH Kuku-ruzy (1976) n<sup>o</sup> 4, 55-8 (Ru) From Referativnyi Fhurnal (1976) 7,55.168. In: PLANT BREEDING ABSTRACTS, Farnham Royal, 48 (8):627, Aug. 1978, abstracts 7604.
41. TURNER, D. Handbook of diet therapy. 5.ed. Chicago, The University of Chicago, 1970. 260p.
42. VAN SOEST, P.J. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. I. Preparation of fiber residues of low nitrogen content. Journal of the Association of Official and Agricultural Chemists, Washington, 46(5):825-9, Sept./Oct. 1963.
43. \_\_\_\_\_. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. Journal of the Association of Official and Agricultural Chemists, Washington, 46(5):829-35, Sept./Oct. 1963.
44. VILLEGAS, E. and MERTZ, E.T. Chemical screening methods for maize protein quality at CIMMYT. México, International maize and wheat Improvement centre, 1971. 11p. (Research Bulletin, 20).

45. VILLEGAS, E. Analytical procedures for screening protein quality in cereal grains. In: MILNER, M., ed. Nutrition improvement of food legumes by breeding. New York, Protein Advisory Group of the United Nations System, 1972. p.335-40.
46. WILLIAMS, K.T. & BEVENUE, A. Problems and techniques in the analysis of plant material for hemicellulose. Journal of the Association of Official and Agricultural Chemists, Washington, 39(4):901-18, July/Aug. 1957.

**APÊNDICE**

QUADRO 1 - Teor médio de triptofano no hidrolisado de milho AG-401 dessecado e desengordurado, relativo a cada tratamento.

NaOH (N)	LSNa (%)	Temperatura (°C)	Tempo (min.)	Médias	
				Teor de Triptofano (µg/ml)	Leituras Absorvância
0,05	0	75	30	20,38	0,100
0,05	0	75	60	28,36	0,139
0,10	0	50	60	29,53	0,144
0,05	1,5	98	60	31,16	0,152
0,05	0	75	90	33,49	0,164
0,05	1,5	98	90	33,78	0,165
0,05	0	25	30	34,19	0,167
0,05	1,5	25	30	34,41	0,168
0,05	0	25	60	35,82	0,175
0,05	1,5	75	30	36,23	0,177
0,05	0	25	90	36,98	0,181
0,05	1,5	25	60	40,89	0,200
0,05	1,5	25	90	41,76	0,204
0,10	0	75	30	41,92	0,205
0,10	0	50	90	41,94	0,205
0,05	0	98	60	44,96	0,220
0,10	0	75	60	45,87	0,224
0,05	0	50	30	46,71	0,228
0,05	0	98	90	46,71	0,228
0,10	0	50	30	47,59	0,233
0,10	0	25	30	49,51	0,242
0,05	1,5	98	30	50,09	0,245
0,15	0	25	60	50,09	0,245
0,10	0	25	60	50,56	0,247
0,10	0	25	90	54,46	0,266
0,15	0	50	60	55,22	0,270
0,05	0	98	30	56,21	0,275
0,10	1,5	25	30	58,83	0,288
0,15	0	25	90	59,00	0,289
0,10	1,5	25	60	59,18	0,289
0,10	1,5	50	30	59,23	0,290
0,10	1,5	75	30	60,01	0,294
0,15	0	50	30	60,98	0,298
0,15	1,5	25	30	61,04	0,299
0,15	0	25	30	61,45	0,301
0,05	1,5	75	60	62,50	0,306
0,10	1,5	25	90	62,61	0,306
0,15	1,5	25	60	62,61	0,306
0,10	0	75	90	63,29	0,310
0,15	1,5	25	90	63,29	0,310
0,15	0	75	30	64,94	0,318
0,10	0	98	90	65,68	0,321
0,05	0	50	90	65,82	0,322
0,05	0	50	60	67,10	0,328



Continuação.

NaOH (N)	LSNa (%)	Temperatura (°C)	Tempo (min.)	Médias	
				Teor de Triptofano (µg/ml)	Leituras Absorvância
0,15	0	50	90	68,26	0,334
0,15	0	75	90	69,87	0,342
0,10	1,5	50	60	74,10	0,362
0,05	1,5	75	90	74,03	0,362
0,10	0	98	30	74,64	0,365
0,15	0	98	30	75,13	0,367
0,15	0	98	60	76,20	0,373
0,05	1,5	50	30	77,64	0,380
0,15	1,5	50	30	79,33	0,388
0,15	0	75	60	79,57	0,389
0,10	1,5	75	60	80,15	0,392
0,15	0	98	90	80,64	0,394
0,15	1,5	98	60	81,13	0,397
0,10	0	98	60	81,63	0,399
0,05	1,5	50	60	81,78	0,400
0,10	1,5	98	30	82,45	0,403
0,10	1,5	50	90	84,34	0,413
0,15	1,5	98	30	85,00	0,416
0,10	1,5	98	90	86,89	0,425
0,15	1,5	98	90	88,86	0,435
0,15	1,5	50	60	89,52	0,438
0,05	1,5	50	90	90,63	0,443
0,10	1,5	75	90	92,15	0,451
0,15	1,5	50	90	95,29	0,466
0,10	1,5	98	60	95,85	0,469
0,05	3,0	25	30	96,42	0,472
0,05	3,0	25	60	99,05	0,484
0,15	1,5	75	30	102,01	0,499
0,10	4,5	25	30	102,34	0,501
0,05	4,5	25	30	103,91	0,508
0,10	3,0	25	30	104,07	0,509
0,10	3,0	25	90	105,88	0,518
0,10	4,5	25	90	106,86	0,523
0,10	3,0	25	60	107,77	0,527
0,05	3,0	25	90	108,10	0,529
0,05	4,5	25	90	108,67	0,532
0,15	1,5	75	60	108,92	0,533
0,15	3,0	25	30	109,08	0,534
0,15	4,5	98	60	110,40	0,540
0,15	3,0	98	30	111,62	0,546
0,05	4,5	25	60	111,88	0,547
0,10	4,5	25	60	112,45	0,550
0,15	1,5	75	90	112,62	0,551
0,15	4,5	25	30	115,08	0,281*
0,10	3,0	50	60	117,75	0,288*
0,15	4,5	25	90	118,04	0,289*
0,15	3,0	98	60	119,12	0,291*

NaOH	LSNA	Temperatura	Tempo	Teor de Triptofano	Leturas	Absorvância
(N)	(%)	(°C)	(min.)	(µg/ml)		
0,15	4,5	25	60	119,20	0,292*	0,292*
0,15	3,0	25	60	119,69	0,293*	0,293*
0,15	3,0	25	90	120,92	0,296*	0,296*
0,15	3,0	98	90	123,44	0,302*	0,302*
0,10	4,5	98	90	124,12	0,304*	0,304*
0,05	3,0	75	60	125,41	0,307*	0,307*
0,05	3,0	50	30	125,61	0,307*	0,307*
0,05	4,5	98	90	126,70	0,310*	0,310*
0,05	4,5	98	60	127,30	0,311*	0,311*
0,15	4,5	98	30	128,97	0,315*	0,315*
0,05	3,0	98	90	129,50	0,317*	0,317*
0,05	3,0	50	60	129,71	0,317*	0,317*
0,10	3,0	98	60	130,71	0,320*	0,320*
0,05	4,5	50	30	130,86	0,320*	0,320*
0,05	3,0	98	90	130,86	0,320*	0,320*
0,10	4,5	50	60	132,15	0,323*	0,323*
0,05	3,0	50	90	132,35	0,324*	0,324*
0,10	4,5	98	60	132,98	0,325*	0,325*
0,15	4,5	98	90	133,36	0,326*	0,326*
0,05	4,5	50	90	133,99	0,328*	0,328*
0,10	3,0	50	90	134,43	0,329*	0,329*
0,10	4,5	50	30	134,65	0,329*	0,329*
0,05	4,5	98	30	136,62	0,334*	0,334*
0,15	3,0	50	30	137,83	0,337*	0,337*
0,15	4,5	50	90	137,99	0,337*	0,337*
0,05	4,5	50	60	138,10	0,338*	0,338*
0,05	3,0	75	90	139,73	0,342*	0,342*
0,10	3,0	75	30	140,26	0,343*	0,343*
0,15	3,0	50	90	140,71	0,344*	0,344*
0,05	3,0	98	30	140,79	0,344*	0,344*
0,05	4,5	75	30	142,30	0,348*	0,348*
0,15	3,0	50	60	142,45	0,348*	0,348*
0,10	3,0	75	60	144,96	0,354*	0,354*
0,10	4,5	50	90	145,18	0,355*	0,355*
0,15	4,5	50	60	146,02	0,357*	0,357*
0,05	4,5	75	60	146,85	0,359*	0,359*
0,10	3,0	98	60	147,38	0,360*	0,360*
0,10	3,0	98	30	147,84	0,362*	0,362*
0,15	4,5	50	30	148,67	0,364*	0,364*
0,10	3,0	75	90	149,20	0,365*	0,365*
0,10	4,5	75	30	150,57	0,368*	0,368*
0,10	4,5	75	60	151,32	0,370*	0,370*
0,05	4,5	75	90	151,70	0,371*	0,371*

Continuação.

NaOH	LSNA	Temperatura	Tempo	(N)	(%)	(°C)	(min.)	Teor de Triptofano	Leituras	Absorvância
			Médias							
0,15	3,0	75	30	158,14	0,387*					
0,15	3,0	75	60	163,70	0,400*					
0,15	4,5	75	30	167,31	0,409*					
0,15	3,0	75	90	173,90	0,425*					
0,15	4,5	75	90	176,18	0,431*					
0,10	4,5	98	30	177,32	0,434*					
0,10	4,5	75	90	177,62	0,434*					
0,15	4,5	75	60	179,97	0,440*					

Diferença mínima significativa, pelo teste de Tukey (5%) = 30,55.  
 \* Tomada de ensaio de 0,5000g, para que a leitura ficasse na faixa ótima, na curva padrão.

QUADRO 2 - Teor médio de triptofano no hidrolisado de sorgo AG-1011 descorticado, dessecado e desengordurado, relativo a cada tratamento.

NaOH (N)	LSNa (%)	Temperatura (°C)	Tempo (min.)	Médias	
				Teor de Triptofano (µg/ml)	Leituras Absorvância
0,05	0	75	30	25,22	0,123
0,05	0	75	60	32,37	0,158
0,05	0	50	60	34,55	0,169
0,05	4,5	25	30	35,44	0,173
0,05	0	50	90	36,12	0,177
0,15	0	50	30	36,60	0,179
0,05	0	50	30	37,69	0,184
0,05	3,0	25	60	39,05	0,191
0,05	3,0	25	30	39,32	0,192
0,05	3,0	25	90	40,21	0,197
0,10	0	50	90	42,94	0,210
0,10	0	75	30	43,62	0,213
0,10	0	50	60	44,64	0,218
0,10	3,0	25	30	44,64	0,218
0,10	0	50	30	45,18	0,221
0,05	0	75	90	45,32	0,222
0,05	4,5	25	90	46,00	0,225
0,15	0	25	30	46,14	0,226
0,10	4,5	25	30	46,34	0,227
0,05	4,5	25	60	47,37	0,232
0,15	0	50	60	51,45	0,252
0,10	0	75	60	52,14	0,255
0,05	0	25	30	53,70	0,263
0,10	3,0	25	60	54,52	0,267
0,15	0	75	30	55,20	0,270
0,15	0	50	90	56,84	0,278
0,15	0	25	60	58,13	0,284
0,15	0	25	90	59,16	0,289
0,10	0	75	90	60,65	0,297
0,05	3,0	50	30	61,34	0,300
0,05	0	25	60	63,04	0,308
0,10	4,5	25	60	63,38	0,310
0,15	0	75	60	64,06	0,313
0,10	0	25	60	65,09	0,318
0,10	3,0	25	90	67,47	0,330
0,10	4,5	25	90	67,47	0,330
0,05	0	25	90	68,15	0,333
0,05	3,0	50	90	68,15	0,333
0,05	3,0	50	60	68,15	0,333
0,15	4,5	25	30	68,49	0,335

## Continuação.

NaOH (N)	LSNa (%)	Temperatura (°C)	Tempo (min.)	Médias	
				Teor de Triptofano (µg/ml)	Leituras Absorvância
0,05	4,5	50	30	69,52	0,340
0,10	0	25	30	70,20	0,343
0,10	0	25	90	71,36	0,349
0,05	4,5	50	60	74,28	0,363
0,15	0	75	90	74,28	0,363
0,05	1,5	50	60	75m31	0,368
0,05	1,5	50	30	75,65	0,370
0,05	1,5	50	90	77,35	0,378
0,15	3,0	25	30	77,35	0,378
0,05	4,5	50	90	79,74	0,390
0,15	3,0	25	60	81,10	0,397
0,10	1,5	50	30	82,26	0,402
0,05	1,5	75	30	84,65	0,414
0,15	4,5	25	60	87,58	0,428
0,10	1,5	50	60	88,40	0,432
0,10	3,0	50	30	88,60	0,433
0,15	1,5	50	30	88,94	0,435
0,15	1,5	50	60	91,46	0,447
0,10	1,5	50	90	91,67	0,448
0,05	1,5	75	90	91,67	0,448
0,05	1,5	75	60	91,94	0,450
0,05	1,5	25	30	92,75	0,454
0,15	3,0	25	90	93,71	0,458
0,15	4,5	25	90	94,05	0,460
0,15	3,0	50	30	101,07	0,494
0,05	1,5	25	60	102,02	0,499
0,10	4,5	50	30	107,00	0,523
0,15	4,5	50	30	107,00	0,523
0,10	3,0	50	60	107,00	0,523
0,15	3,0	50	60	109,25	0,534
0,10	1,5	25	30	109,45	0,535
0,10	4,5	50	60	110,75	0,542
0,15	1,5	50	90	111,56	0,546
0,10	3,0	50	90	112,52	0,550
0,05	1,5	25	90	112,59	0,551
0,15	1,5	25	30	113,88	0,557
0,15	3,0	50	90	116,88	0,286*
0,15	4,5	50	60	122,20	0,299*
0,05	3,0	75	30	123,70	0,303*
0,10	4,5	50	90	123,70	0,303*
0,15	4,5	50	90	123,70	0,303*
0,10	1,5	25	60	125,54	0,307*
0,15	1,5	25	90	128,60	0,314*
0,15	1,5	25	60	128,94	0,315*
0,10	1,5	75	30	129,15	0,316*

Continuação.

NaOH (N)	LSNa (%)	Temperatura (°C)	Tempo (min.)	Médias	
				Teor de Triptofano (µg/ml)	Leituras Absorvância
0,10	1,5	25	90	130,71	0,320*
0,10	1,5	75	60	136,30	0,333*
0,05	4,5	75	30	136,51	0,334*
0,05	3,0	75	60	138,69	0,339*
0,05	3,0	75	90	143,12	0,350*
0,10	1,5	75	90	141,19	0,345*
0,05	4,5	75	90	149,93	0,367*
0,05	4,5	75	60	152,32	0,372*
0,10	3,0	75	30	154,02	0,377*
0,10	4,5	75	30	154,84	0,379*
0,15	1,5	75	30	172,42	0,422*
0,10	3,0	75	90	173,24	0,424*
0,10	4,5	75	90	173,78	0,425*
0,15	1,5	75	90	175,14	0,428*
0,10	3,0	75	60	177,88	0,435*
0,15	1,5	75	60	180,60	0,442*
0,10	4,5	75	60	187,42	0,458*
0,15	3,0	75	60	198,04	0,484*
0,15	4,5	75	30	201,72	0,493*
0,15	3,0	75	30	201,74	0,494*
0,15	4,5	75	90	209,10	0,511*
0,15	3,0	75	60	220,82	0,540*
0,15	4,5	75	60	227,82	0,557*

Diferença mínima significativa, pelo teste de Tukey (5%) = 21,43.

\* Tomada de ensaio de 0,50000g, para que a leitura ficasse na faixa ótima, na curva padrão.

QUADRO 3 - Teor médio de triptofano na caseína Hammarsten, relativa a cada tratamento.

NaOH (N)	LSNa (%)	Temperatura (°C)	Tempo (min.)	Médias	
				Teor de Triptofano (µg/ml)	Leituras Absorvância
0,10	0	75	30	16,65	0,081
0,05	0	75	30	17,05	0,083
0,05	0	25	60	17,46	0,085
0,05	1,5	98	60	17,46	0,085
0,05	0	98	30	18,68	0,091
0,05	0	75	60	18,68	0,091
0,05	0	75	90	18,68	0,091
0,15	0	75	30	19,08	0,093
0,05	3,0	98	60	19,45	0,095
0,15	4,5	98	30	20,59	0,101
0,05	0	25	30	20,71	0,101
0,15	0	75	90	20,71	0,101
0,10	0	75	60	21,11	0,103
0,10	0	25	90	21,11	0,103
0,10	0	75	90	21,11	0,103
0,15	0	50	30	21,11	0,103
0,05	3,0	75	60	21,35	0,104
0,05	3,0	75	90	21,35	0,104
0,15	3,0	75	60	21,35	0,104
0,10	0	50	30	21,68	0,106
0,15	0	25	30	21,76	0,106
0,05	0	50	60	21,92	0,107
0,10	0	50	90	21,92	0,107
0,10	0	25	30	21,92	0,107
0,15	4,5	75	90	22,11	0,108
0,05	0	50	30	22,33	0,109
0,15	0	75	60	22,33	0,109
0,15	4,5	75	60	22,50	0,110
0,10	0	50	60	22,73	0,111
0,05	0	50	90	22,73	0,111
0,05	1,5	75	60	22,73	0,111
0,05	3,0	75	30	22,87	0,112
0,10	0	25	60	23,14	0,113
0,05	0	25	90	23,14	0,113
0,05	0	98	90	23,14	0,113
0,15	0	25	90	23,39	0,114
0,15	0	50	90	23,55	0,115
0,05	3,0	98	90	23,64	0,116
0,15	0	25	60	23,64	0,116
0,15	0	98	30	23,95	0,117
0,05	3,0	98	30	23,95	0,117
0,05	0	98	60	24,36	0,119

Continuação.

NaOH (N)	LSNa (%)	Temperatura (°C)	Tempo (min.)	Médias	
				Teor de Triptofano (µg/ml)	Leituras Absorvância
0,15	0	50	60	24,36	0,119
0,10	3,0	98	30	24,40	0,119
0,15	3,0	98	30	24,40	0,119
0,10	4,5	98	60	24,79	0,121
0,10	4,5	98	90	24,79	0,121
0,10	0	98	30	25,01	0,122
0,15	4,5	98	60	25,16	0,123
0,05	1,5	98	30	25,17	0,123
0,15	3,0	75	90	25,32	0,124
0,15	3,0	75	30	26,31	0,129
0,15	3,0	98	60	26,31	0,129
0,10	3,0	98	90	26,80	0,131
0,05	1,5	98	90	26,80	0,131
0,10	3,0	98	60	27,07	0,132
0,10	4,5	98	30	29,36	0,144
0,15	4,5	75	30	29,36	0,144
0,05	4,5	75	90	29,74	0,145
0,05	4,5	98	30	30,50	0,149
0,05	4,5	98	90	30,88	0,151
0,15	3,0	25	60	31,88	0,156
0,15	4,5	98	90	32,03	0,157
0,15	3,0	98	90	32,79	0,160
0,10	0	98	60	32,89	0,161
0,10	4,5	75	60	33,17	0,162
0,05	4,5	25	30	34,32	0,168
0,05	3,0	25	90	34,32	0,168
0,05	4,5	50	30	34,70	0,170
0,15	1,5	75	90	35,73	0,175
0,10	4,5	75	90	36,22	0,177
0,15	4,5	25	60	36,45	0,178
0,05	3,0	50	90	36,60	0,179
0,10	0	98	90	36,95	0,181
0,05	4,5	98	60	36,99	0,181
0,10	4,5	75	30	37,21	0,182
0,15	3,0	50	60	37,75	0,185
0,05	1,5	25	30	37,76	0,185
0,15	3,0	25	90	38,13	0,186
0,15	4,5	25	90	38,51	0,188
0,05	4,5	50	90	38,89	0,190
0,10	3,0	75	90	38,89	0,190
0,05	1,5	50	60	38,98	0,191
0,05	1,5	75	90	38,98	0,191
0,15	3,0	25	30	39,66	0,194
0,15	0	98	60	39,79	0,195
0,10	1,5	50	90	39,79	0,195



Continuação.

NaOH (N)	LSNa (%)	Temperatura (°C)	Tempo (min.)	Médias	
				Teor de Triptofano (µg/ml)	Leituras Absorvância
0,05	3,0	25	60	40,04	0,196
0,15	3,0	50	30	40,04	0,196
0,10	3,0	75	30	40,42	0,198
0,05	1,5	25	60	40,60	0,199
0,15	1,5	50	30	40,60	0,199
0,15	4,5	50	60	40,80	0,200
0,10	1,5	50	60	41,41	0,203
0,15	0	98	90	41,41	0,203
0,10	1,5	25	30	42,15	0,206
0,15	4,5	25	30	42,15	0,206
0,15	1,5	98	30	42,15	0,206
0,15	3,0	50	90	42,32	0,207
0,05	4,5	75	60	42,32	0,207
0,10	3,0	75	60	42,32	0,207
0,15	4,5	50	30	42,32	0,207
0,05	1,5	50	90	43,04	0,211
0,10	1,5	50	30	43,04	0,211
0,15	1,5	25	30	43,36	0,212
0,15	1,5	50	60	43,44	0,212
0,05	1,5	50	30	43,85	0,214
0,15	1,5	98	60	43,85	0,214
0,10	3,0	50	60	44,23	0,216
0,05	1,5	25	90	44,66	0,218
0,10	1,5	98	90	44,66	0,218
0,05	4,5	75	30	44,76	0,219
0,10	3,0	25	90	44,99	0,220
0,15	4,5	50	90	44,99	0,220
0,10	3,0	50	30	46,14	0,226
0,10	1,5	98	30	46,69	0,228
0,10	1,5	98	60	46,69	0,228
0,15	1,5	25	60	46,86	0,229
0,05	1,5	75	30	47,10	0,230
0,15	1,5	25	90	47,10	0,230
0,10	3,0	50	90	47,28	0,231
0,05	3,0	50	60	48,04	0,235
0,05	3,0	50	30	48,43	0,237
0,10	1,5	25	30	48,43	0,237
0,10	3,0	25	60	48,80	0,239
0,10	1,5	75	90	49,53	0,242
0,15	1,5	75	60	49,53	0,242
0,05	3,0	25	30	49,53	0,242
0,15	1,5	50	90	49,94	0,244
0,10	1,5	25	90	50,35	0,246
0,10	3,0	25	60	51,16	0,250
0,10	1,5	75	60	51,16	0,250

Continuação.

NaOH (N)	LSNa (%)	Temperatura (°C)	Tempo (min.)	Médias	
				Teor de Triptofano (µg/ml)	Leituras Absorvância
0,15	1,5	98	90	51,97	0,254
0,10	4,5	25	60	52,24	0,256
0,10	4,5	25	90	53,38	0,261
0,10	1,5	75	30	53,59	0,262
0,05	4,5	50	60	53,59	0,263
0,10	4,5	25	30	54,91	0,269
0,05	4,5	25	60	55,67	0,272
0,15	1,5	75	30	56,03	0,274
0,05	4,5	25	90	56,44	0,276
0,10	4,5	50	30	57,20	0,280
0,10	4,5	50	60	62,91	0,308
0,10	4,5	50	90	66,73	0,326

Diferença mínima significativa, pelo teste de Tukey (5%) = 12,44.

QUADRO 4 - Análise de variância - Milho AG-401.

Causas de Variação	G.L.	Q.M.	Nível de Significância
Tratamento	143	4891,784668	< 0,0001%
Erro	288	64,25537872	
TOTAL	431		
Coeficiente de Variação = 8,19%			
Média Geral = 97,876			

QUADRO 5 - Análise de variância - Sorgo 1011.

Causas de Variação	G.L.	Q.M.	Nível de Significância
Tratamento	107	7039,439941	<0,0001%
Erro	216	34,71727753	
Total	323		
Coeficiente de Variação = 6,12%			
Média Geral = 96,276			

## QUADRO 6 - Análise de variância - Caseína.

Causas de Variação	G.L.	Q.M.	Nível de Significância
Tratamento	143	422,0527649	< 0,0001%
Erro	288	10,66451263	
TOTAL	431		

Coefficiente de Variação = 9,13%  
Média Geral = 35,088