

DETERMINAÇÃO DE AMINOÁCIDOS EM SOLOS DE CERRADO¹

CLÉLIA ALVES SOCORRO DE SOUSA², LAURO MORHY³ e SEBASTIÃO A. DE OLIVEIRA⁴

RESUMO - O presente trabalho teve por objetivo identificar os aminoácidos presentes em solos do Distrito Federal. O material peptídico foi extraído dos solos com água a 100°C durante dez horas, e posteriormente separado por filtração em gel (Sephadex G-50). Os aminoácidos ocorreram com as seguintes variações: glicina - 18,42 a 180,29 nmol/g (média - 104,98 nmol/g); alanina - 9,18 a 218,77 nmol/g (média - 92,08 nmol/g); serina - 17,43 a 147,53 nmol/g (média - 60,49 nmol/g); fenilalanina = 12,87 a 192,40 nmol/g (média - 60,04 nmol/g); prolina - 28,42 a 123,64 nmol/g (média - 56,80 nmol/g); ácido glutâmico - 19,14 a 148,67 nmol/g (média - 52,40 nmol/g); treonina - 9,41 a 127,74 nmol/g (média - 51,32 nmol/g); valina - 10,54 a 119,65 nmol/g (média - 45,40 nmol/g); leucina - 5,54 a 96,69 nmol/g (média - 45,25 nmol/g); cisteína - 7,00 a 96,88 nmol/g (média - 41,00 nmol/g); ácido aspártico - 10,97 a 111,89 nmol/g (média - 35,27 nmol/g); tirosina - 5,74 a 98,77 nmol/g (média - 31,83 nmol/g); isoleucina - 10,18 a 56,68 nmol/g (média - 28,68 nmol/g); metionina - 6,21 a 21,74 nmol/g (média - 13,98 nmol/g); histidina - 5,18 a 23,30 nmol/g (média - 10,09 nmol/g); arginina - 6,09 a 10,13 nmol/g (média - 8,01 nmol/g) e lisina - 1,32 a 10,56 nmol/g (média - 4,09 nmol/g). A composição média de aminoácidos de solos de Cerrado apresentou predominância de aminoácidos neutros e ácidos, sendo que glicina, alanina, serina, ácido aspártico e ácido glutâmico foram encontrados nos 20 solos analisados.

Termos para indexação: filtração em gel, glicina, alanina, serina, ácido aspártico, ácido glutâmico, material peptídico.

DETERMINATION OF AMINO ACIDS IN SOILS OF THE 'CERRADO'

ABSTRACT - This study aims to identify the amino acids present in soils of the Distrito Federal (Brazil). The peptides were extracted from the soils using water at 100°C for 10 hours and afterwards separated by permeation in gel (Sephadex G-50). The amino acids occurred in the following ranges: glycine - 18,42 to 180,29 nmol/g (average - 104,98 nmol/g); alanine - 9,18 to 218,77 nmol/g (average - 92,08 nmol/g); serine - 17,43 to 147,53 nmol/g (average - 60,49 nmol/g); phenylalanine - 12,87 to 192,40 nmol/g (average - 60,04 nmol/g); proline - 28,42 to 123,64 nmol/g (average - 56,80 nmol/g); glutamic acid - 19,14 to 148,67 nmol/g (average - 52,40 nmol/g); threonine - 9,41 to 127,74 nmol/g (average - 51,32 nmol/g); valine - 10,54 to 119,65 nmol/g (average - 45,40 nmol/g); leucine - 5,54 to 96,69 nmol/g (average - 45,25 nmol/g); cysteine - 7,00 to 96,88 nmol/g (average - 41,00 nmol/g); aspartic acid - 10,97 to 111,89 nmol/g (average - 35,27 nmol/g); tyrosine - 5,74 to 98,77 nmol/g (average - 31,83 nmol/g); isoleucine - 10,18 to 56,68 nmol/g (average - 28,68 nmol/g); methionine - 6,21 to 21,74 nmol/g (average - 13,98 nmol/g); histidine - 5,18 to 23,30 nmol/g (average - 10,09 nmol/g); arginine - 6,09 to 10,13 nmol/g (average - 8,01 nmol/g) and lysine - 1,32 to 10,56 nmol/g (average - 4,09 nmol/g). The average composition of amino acids in soils of "Cerrado" region showed a predominance in the neutral and acidic amino acids. Glycine, alanine, serine, aspartic acid and glutamic acid were found in all of the 20 soils analysed.

Index terms: filtration in gel, glycine, alanine, serine, aspartic acid, glutamic acid, peptide material.

¹ Aceito para publicação em 21 de julho de 1995.

Extraído da Dissertação de Mestrado da autora, apresentada ao Dep. de Química da Univ. de Brasília para obtenção do título de Mestre em Química.

² Farmacêutica-Bioq. e Bióloga, M.Sc., Prof.^a Auxiliar III, Dep. de Matemática e Física, Univ. Católica de Goiás, CEP 74001-970, Goiânia-GO.

³ Biólogo, Dr., Prof. Adjunto, Dep. Biologia Celular, Univ. de Brasília.

⁴ Químico, Dr., Prof. Adjunto, Dep. de Eng. Agrônômica, Univ. de Brasília, CEP 70910-900, Brasília - DF.

INTRODUÇÃO

Mais de 95% do N total dos solos encontra-se combinado em compostos orgânicos. No entanto, metade deste N ainda não foi identificado. Sabe-se, porém, que 20-40% do N total hidrolisável em ácido encontra-se na forma de aminoácidos livres ou combinados (Bremner, 1951, 1965). Os aminoácidos, na maioria, se encontram combinados na

forma de proteínas ou peptídeos, associados com silte e partículas de argila ou complexados com outros componentes do solo, tais como colóides húmicos, açúcares, ligninas, taninos, etc. (Warman & Isnor, 1991). Como os aminoácidos são facilmente mineralizáveis (Sowden, 1956; Stevenson, 1982), tornam-se fontes potenciais de N para as plantas.

A quantidade de N proveniente de aminoácidos varia de acordo com a atividade biológica e combinações com os organominerais (Jocteur & Andreux, 1981). Segundo Janel (1978), o teor de N- α -amino em determinados tipos de húmus é variável em determinado solo ao longo do ano, sendo máximo no inverno, devido à baixa atividade biológica.

Com o presente trabalho, objetivou-se identificar e quantificar os aminoácidos presentes em 20 solos de Cerrado.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas amostras simples com três repetições, coletadas na camada arável (0-25 cm) de 20 diferentes locais no Distrito Federal, sob vegetação natural. A obtenção e análise de aminoácidos do solo foi feita conforme o esquema da Fig. 1. A purificação das amostras hidrolisadas foi feita passando-se o material em coluna de troca iônica (AG 50W-X-8), a qual foi ativada com 8 mL de HCl 1 mol/L, e os aminoácidos nela adsorvidos foram eluídos com 8 mL de NH_4OH 2 mol/L. Após liofilização e dissolução, foram retirados 100 μL do eluato para efetuar o acoplamento dos aminoácidos com PITC (fenilisotiocianato) (Heinrikson & Meredith, 1984).

O equipamento utilizado foi um HPLC (High Performance Liquid Chromatography) Waters 600E, com detector Modelo 441 de comprimento de onda fixo ($\lambda=254\text{nm}$) e um integrador 745 B (Waters Assoc.). A temperatura foi mantida em 40°C e as amostras foram injetadas manualmente com uma seringa de 100 μL .

A coluna utilizada foi a Pico-TagTM para análise de aminoácidos (15 cm x 3,9 mm), a qual foi estabilizada com dois eluentes: (A) um tampão aquoso (acetato de sódio 0,14 mol/L contendo 0,5 mL/L de TEA (trietanolamina) e ajustado o pH em 6,35 com ácido acético glacial) contendo 6% de acetonitrila e (B) 60% de acetonitrila em água. Durante a separação dos aminoácidos, o gradiente foi iniciado a 6% B, alcançando 60% B em 16 min. Em seguida, a limpe-

za da coluna foi programada para 100% do eluente B e 100% do eluente A, sendo cada etapa realizada em 15 min.

A identificação dos aminoácidos derivatizados foi realizada por comparação com os tempos de retenção de padrões de aminoácidos (Pierce), contendo 2,5 $\mu\text{mol/mL}$ de cada aminoácido em HCl 0,1 mol/L. O padrão era constituído de 17 PTC-aminoácidos (feniltiocarbamil-aminoácido). Cada amostra derivatizada foi dissolvida em 100 μL do diluente (Pico-Tag) e foram aplicados 10 μL da mistura resultante na coluna, obtendo-se os cromatogramas que permitiram determinar as quantidades de aminoácidos, ao nível de picomol.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os procedimentos experimentais adotados visaram ao conhecimento da composição de aminoácidos de estruturas protéicas ou peptídicas existentes nos solos de Cerrado estudados. Essas substâncias foram separadas por cromatografia (filtração em gel de Sephadex G-50), após procedimentos básicos de extração, filtração e liofilização.

Observa-se na Fig. 2 que os perfis cromatográficos típicos (a - solo 2, b - solo 6, c - solo 15 e d - solo 8) obtidos, apresentaram essencialmente frações com massas moleculares distintas, basicamente agrupadas nos picos 1 e 2. Não houve preocupação em manter essas frações separadas. Pelo contrário, foram reunidas com o objetivo de se ter a composição de aminoácidos da mistura, após hidrólise ácida. Constatou-se, contudo, que nas frações de todos os picos havia aminoácidos.

A Tabela 1 apresenta os resultados das análises de aminoácidos (nmol/g) das frações protéicas do solo (picos 1, 2 e 3 do cromatograma).

As análises foram realizadas em condições padronizadas. A Fig. 3 mostra um cromatograma típico obtido em HPLC, dos padrões de aminoácidos usados para as determinações analíticas quantitativas, e a Fig. 4 mostra um cromatograma típico da análise de hidrolisado de material extraído do solo nº 15.

Nos resultados mostrados na Tabela 1, observa-se que os solos apresentaram ampla variedade de aminoácidos, constatando-se a presença de ácido aspártico e ácido glutâmico em todos os solos analisados. Os aminoácidos neutros encontrados em maiores quantidades foram: glicina, alanina e serina, o que está em concordância com os resultados obtidos por Stevenson (1982) e Warman & Bishop (1985).

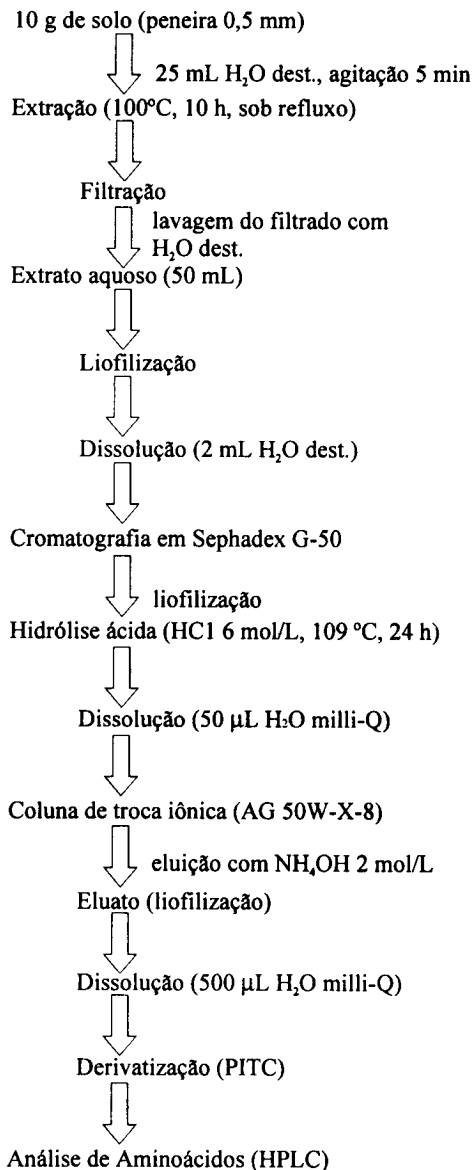


FIG. 1. Esquema geral de obtenção e análise de aminoácidos do solo.

Os aminoácidos básicos foram encontrados em quase todos os solos, decrescendo na seqüência: histidina, arginina e lisina. Warman & Isnor (1991), em trabalhos realizados com solos não cultivados, observaram maiores teores em lisina, seguido da arginina e histidina. Resultados similares foram encontrados por Warman & Bishop (1985) durante a análise de extrato bruto de solo obtido após tratamento com

HF-HCl 0,05 mol/L e o uso de resina Chelex-100 em água. O extrato bruto foi, posteriormente, passado em coluna GPC Sephadex G-25-80, dando frações de altos e baixos pesos moleculares, as quais, após serem analisadas, mostraram variações semelhantes para os aminoácidos. O teor dos aminoácidos contendo enxofre (metionina e cisteína) foi relativamente baixo, estando de acordo com Bremner

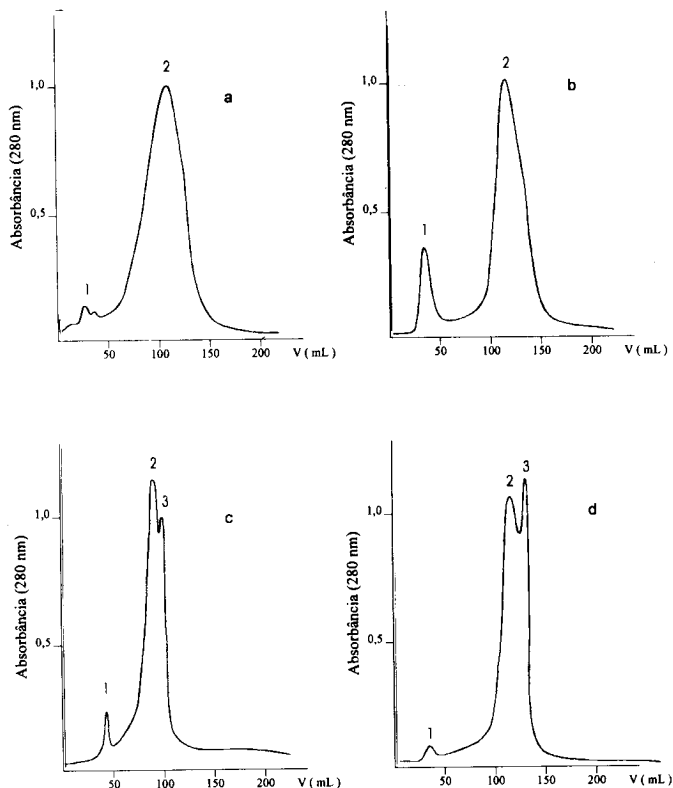


FIG. 2. Cromatograma por filtração em gel de Sephadex G-50 (35 X 2,3 cm). Perfis cromatográficos típicos obtidos (a, b, c, d). Amostra: 2 mL de extrato aquoso de solo. Fase móvel: água; Temperatura ambiente; Fluxo: 30 mL/hora; Frações de 5 mL/tubo; Detecção: 280 nm.

TABELA 1. Resultado da análise de aminoácidos (nmol/g) em solos de Cerrado do Distrito Federal.

AAs	Solos									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ASP	13,07	27,31	25,97	37,82	40,76	25,48	15,73	111,89	10,97	19,62
GLU	32,84	64,00	41,08	41,31	62,52	46,32	21,37	148,67	21,83	31,42
SER	20,09	79,73	50,00	69,58	54,09	45,80	22,68	147,53	30,59	55,94
GLY	46,29	118,82	93,40	92,72	18,42	63,23	171,02	174,98	161,27	76,21
HIS	5,18	9,36	7,44	9,27	7,34	5,48	7,96	23,30	5,52	9,90
ARG	-	8,75	6,68	7,93	6,09	-	-	-	-	-
THR	28,61	70,60	44,27	53,90	59,65	38,54	16,03	127,74	23,31	43,73
ALA	9,18	135,45	93,09	89,59	90,85	64,84	47,76	135,01	29,55	80,98
PRO	-	47,79	35,74	51,15	49,62	28,42	40,80	99,03	32,17	32,13
TYR	14,20	-	33,97	-	54,48	31,89	-	10,18	29,05	5,74
VAL	10,54	41,88	-	25,52	-	-	-	117,70	-	-
MET	6,21	-	-	-	-	-	21,74	-	-	-
CYS	96,88	-	27,18	-	48,07	28,62	7,00	-	-	38,27
ILE	-	24,54	21,29	19,85	42,09	25,12	10,18	56,20	13,05	-
LEU	5,54	35,57	-	40,04	-	-	16,52	78,58	18,49	-
PHE	-	25,84	-	-	19,74	98,64	39,37	192,40	12,87	-
LYS	1,32	2,88	4,17	5,19	5,84	4,01	2,44	10,56	2,73	2,69

Continua...

TABELA 1. Continuação

AA's	11	12	13	14	Solos		17	18	19	20
					15	16				
ASP	17,01	53,43	39,33	20,80	45,41	84,89	24,56	23,43	14,56	53,35
GLU	21,74	98,43	38,41	19,14	50,82	134,91	39,99	36,32	24,47	72,32
SER	43,48	102,37	57,90	45,53	74,01	138,48	17,43	57,01	48,88	48,67
GLY	116,86	136,92	79,92	57,72	112,93	180,29	70,91	65,84	76,49	125,38
HIS	5,99	13,39	9,68	-	8,32	11,68	11,58	7,35	-	22,81
ARG	-	8,50	-	-	-	-	-	-	-	10,13
THR	36,87	122,23	51,50	41,24	9,41	126,52	14,50	38,41	42,94	36,44
ALA	57,10	191,56	75,18	39,86	137,52	218,77	94,54	74,93	82,22	93,71
PRO	33,10	77,05	49,37	31,49	91,62	123,64	78,99	29,05	54,28	93,77
TYR	-	98,77	-	-	6,08	-	-	-	-	-
VAL	14,78	-	30,65	44,69	75,73	119,65	27,84	29,68	29,31	22,23
MET	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CYS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ILE	11,93	56,68	18,19	28,80	44,22	49,95	26,45	22,67	25,33	19,64
LEU	19,02	80,20	28,90	39,01	64,94	96,69	38,25	32,56	46,12	32,26
PHE	33,50	77,62	54,99	30,20	86,58	-	59,29	48,00	69,86	51,76
LYS	2,56	5,72	2,81	1,52	4,74	2,60	7,86	4,99	1,57	5,56

ASP = ácido aspártico GLU = ácido glutâmico SER = serina GLY = glicina HIS = histidina ARG = arginina THR = treonina ALA = alanina
 PRO = prolina TYR = tirosina VAL = valina MET = metionina CYS = cisteína ILE = isoleucina LEU = leucina PHE = fenilalanina LYS = lisina

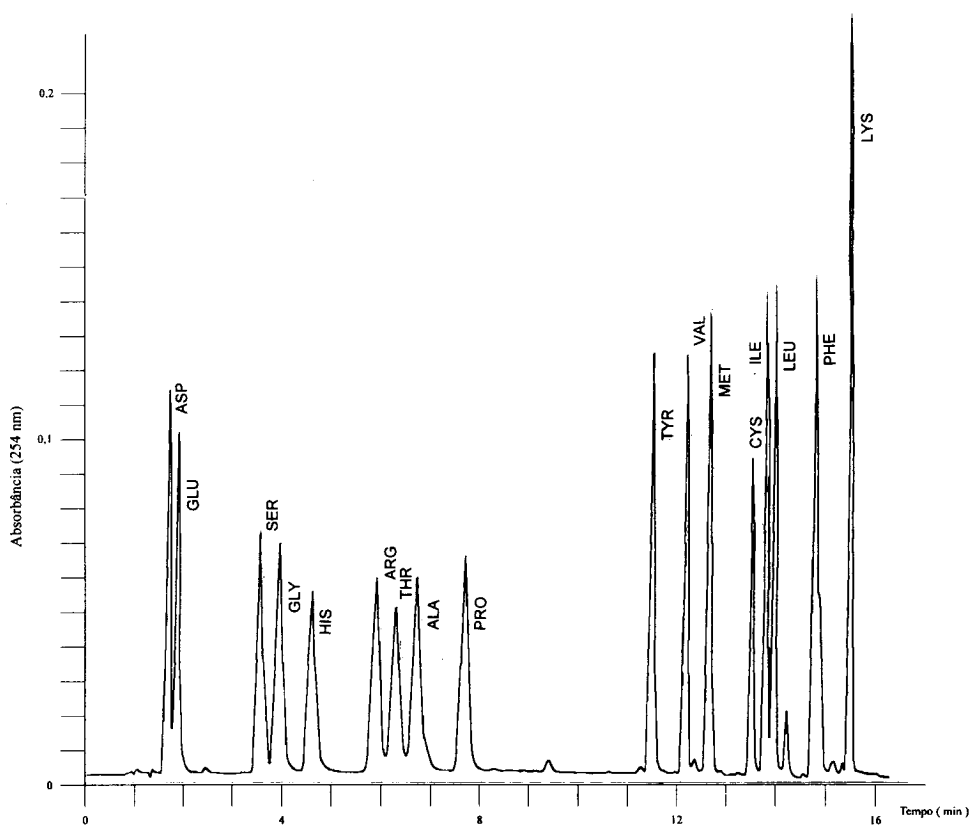


FIG. 3. Cromatograma obtido em HPLC/Pico-Tag. Amostra: mistura-padrão de aminoácidos Pierce, hidrolisada e derivatizada com PITC. Coluna: Pico-Tag; Fase móvel: eluentes A e B (6 a 60%) Pico-Tag; Fluxo: 1 mL/min por 16 min; Temperatura: 40 °C.

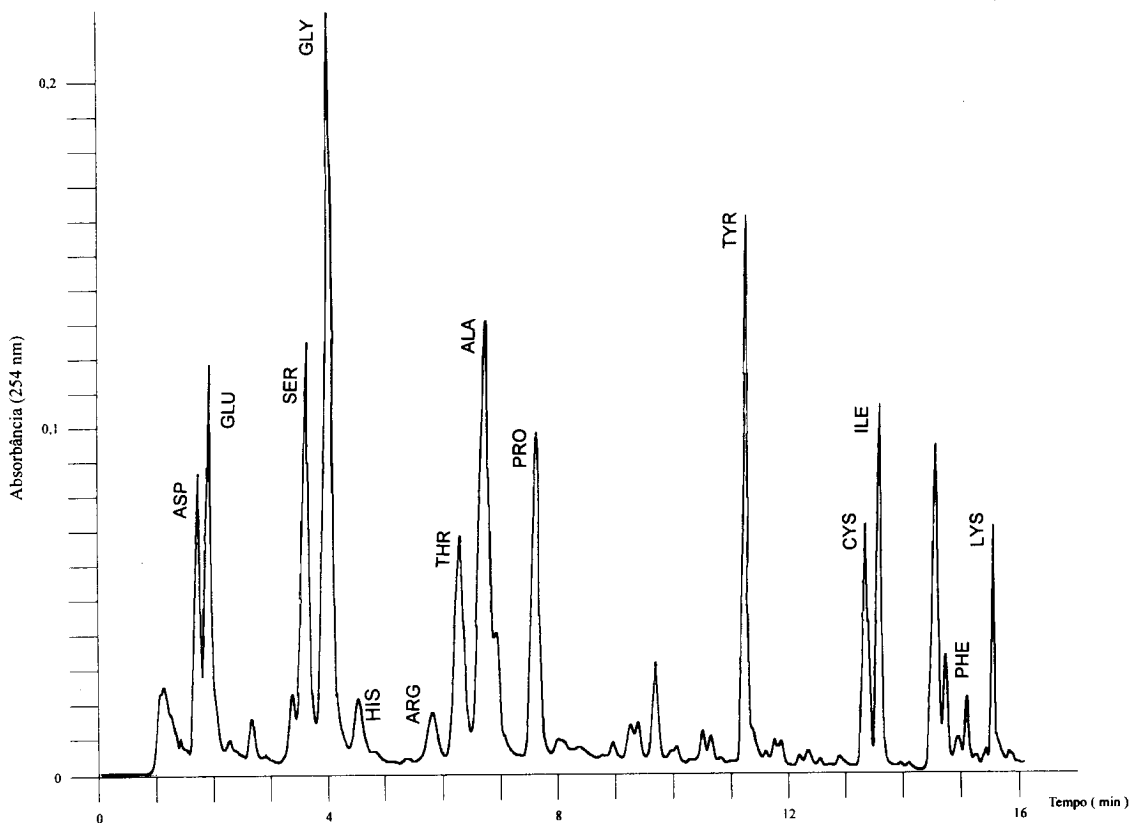


FIG. 4. Cromatograma obtido em HPLC/Pico-Tag. Amostra: extrato aquoso de solo pós-Sephadex, G-50 derivatizado com PITC. Coluna: Pico-Tag; Fase móvel: eluentes A e B (6 a 60%) Pico-Tag; Fluxo: 1 mL/min por 16 min; Temperatura: 40 °C.

(1950). Esses dois aminoácidos, assim como o triptofano, que não foi detectado, podem ter sido destruídos durante as reações de preparação da amostra para análise em HPLC.

A Fig. 5 mostra um perfil dos aminoácidos encontrados em solos de Cerrado, apresentando as suas contribuições percentuais médias nos 20 solos analisados.

A comparação dos resultados apresentados na Tabela 1 mostra que o material peptídico dos solos de Cerrado não difere grandemente na sua composição. As similaridades encontradas nos diferentes

solos sugerem que, embora a matéria orgânica seja formada a partir de uma variedade de materiais sob diferentes condições, há tendência em manter-se uma composição mais ou menos constante, em relação aos aminoácidos, provavelmente devido à atividade dos microorganismos do solo (Bremner, 1950).

A análise em HPLC apresenta as vantagens de ser relativamente rápida, precisa e reprodutível. Futuros esforços deverão ser feitos no sentido de melhorar o processo de extração e preparação do material biomolecular para as análises.

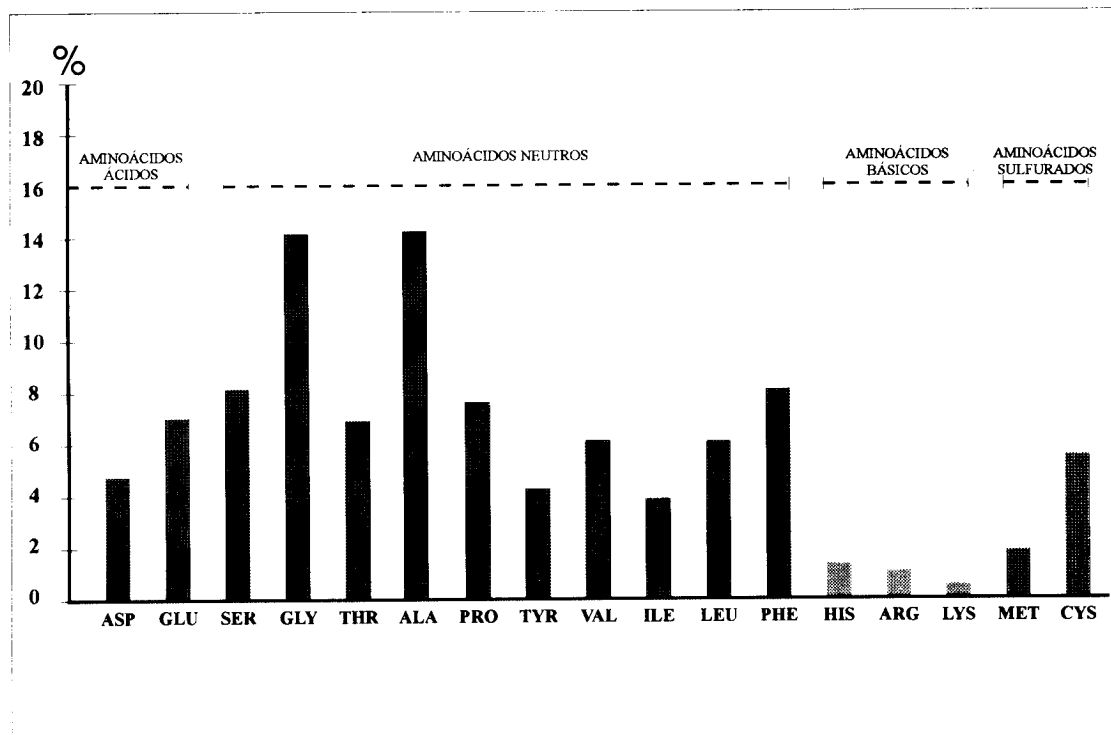


FIG. 5. Composição percentual média de aminoácidos em solos de Cerrado.

CONCLUSÕES

O estudo da composição de aminoácidos de estruturas protéicas ou peptídicas existentes nos solos de Cerrado apresentou uma predominância de aminoácidos neutros e ácidos, sendo que glicina (14,15%), alanina (12,41%), serina (8,16%), ácido glutâmico (7,06%) e ácido aspártico (4,76%) foram encontrados nos 20 solos analisados. A variabilidade dos aminoácidos detectados foi bastante ampla, o que pode ser atribuído à diferença na composição da matéria orgânica e sua mineralização e aos organominerais do solo.

Os resultados indicaram que o material biomolecular extraído dos solos em estudo foi similar em sua composição.

REFERÊNCIAS

- BREMNER, J.M. A review of recent work on soil organic matter. *International Journal Soil Science*, v. 2, p. 67-82, 1951.
- BREMNER, J.M. Organic nitrogen in soils. In: BARTHOLOMEW, W.V.; CLARK, F.E. *Soil nitrogen*. Madison: American Society of Agronomy, 1965. cap. 3, p. 93-149. (Série, 10).
- BREMNER, J.M. The amino-acid composition of the protein material in soil. *Biochemistry Journal*, v. 47, p. 538-542, 1950.
- HEINRIKSON, R.L.; MEREDITH, S.C. Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Analytical Biochemistry*, v. 136, p. 65-74, 1984.
- JANEL, P. *Étude saisonnière des formes de l'azote organique dans trois types d'humus sous hêtre: moder, mull acide, mull calcaire*. Nancy: Univ. Nancy I, 1978. 63p. These Doct. Spec.
- JOCTEUR, M.; ANDREUX, F. L'azote organique des sols: exemples de quantification des formes protéiques et des combinaisons complexes. *Science du Sol*, v. 3, p. 219-242, 1981.

- SOWDEN, F.J. Distribution of aminoacids in selected horizons of soil profiles. **Soil Science**, Baltimore, v. 82, p. 491-496, 1956.
- STEVENSON, F.J. Organic forms of soil nitrogen. In: STEVENSON, F. J. (Ed.). **Nitrogen in agricultural soils**. Madison: American Society of Agronomy, 1982. cap. 3, p. 67-122. (Serie, 22).
- WARMAN, P.R.; BISHOP, C. The use of reverse-phase HPLC for soil amino-N analysis. **Journal of Liquid Chromatography**, v.8, n.14, p.2595-2602, 1985.
- WARMAN, P.R.; ISNOR, R.A. Amino acid composition of peptides present in organic matter fractions of sandy loam soils. **Soil Science**, v. 152, n. 1, p. 7-13, 1991.