

EXPERIMENTO 2

METODOS CUANTITATIVOS PARA LA IDENTIFICACION DE AMINOACIDOS Y PROTEINAS

REQUISITOS

Repasar las estructuras de los 20 L- α aminoácidos (AA), que forman las proteínas y las características de las proteínas.

OBJETIVOS

Identificar por métodos colorimétricos los 20 L- α aminoácidos (AA), que forman las proteínas, basados en las reacciones de los grupos R

1. FUNDAMENTOS

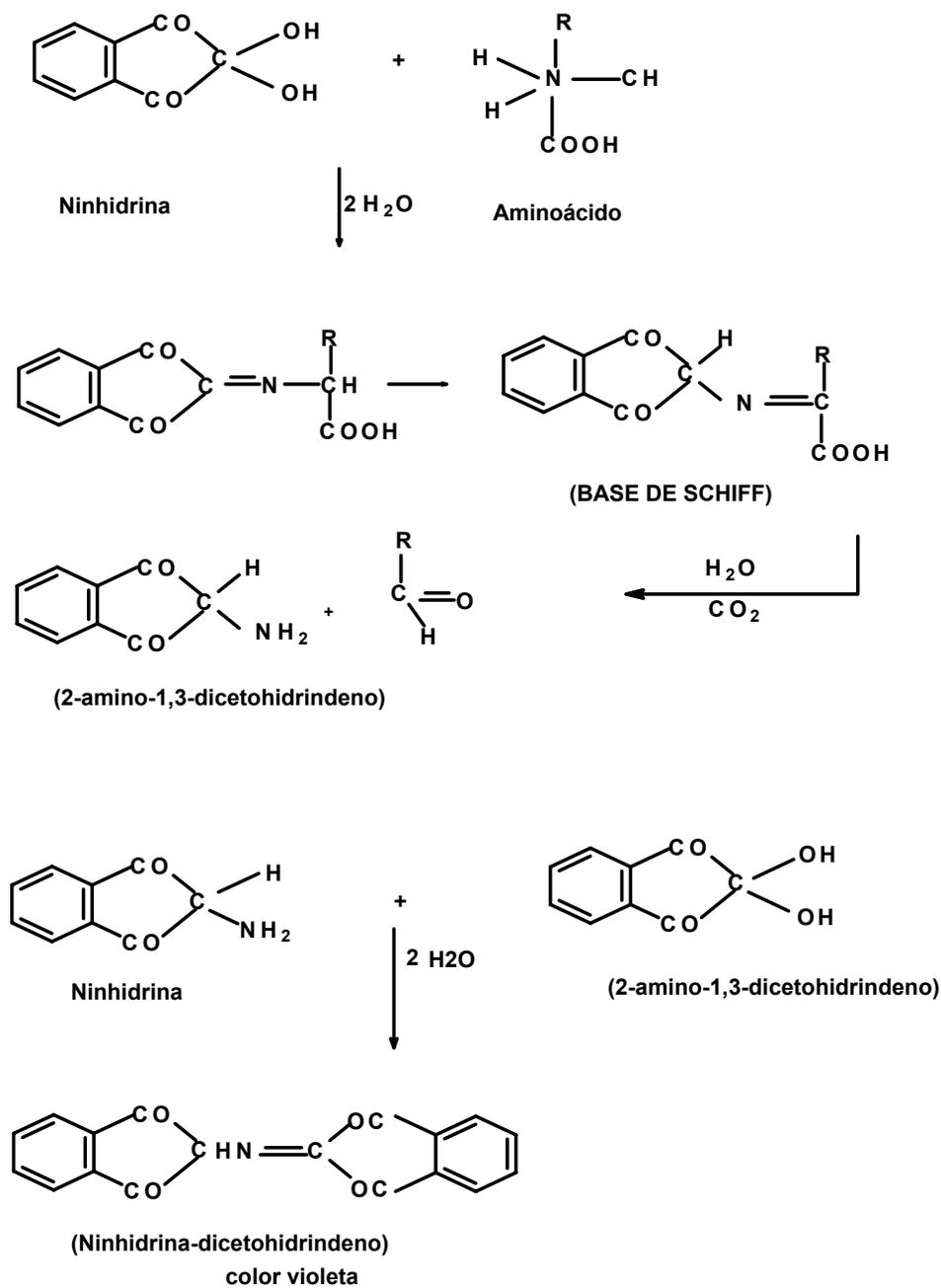
Por la estructura peptídica y la presencia de determinados grupos (grupos R), las proteínas pueden reaccionar con una variedad de agentes originándose productos coloreados. Estas reacciones son la base para la determinación cuantitativa y cualitativa de las proteínas. Por presentarse variaciones en la composición de los aminoácidos de las diferentes proteínas, se manifiestan diferentes colores y grados de intensidad para una misma reacción, íntimamente relacionado con la naturaleza de la proteína analizada.

1.1 Fundamentos químicos de las pruebas.

1.1.1 Prueba de la ninhidrina (Hidrato de tricetohidrindeno).

Todas aquellas sustancias que presentan al menos un grupo amino y uno carboxilo libre, reaccionaran con la ninhidrina. La positividad se manifiesta por la aparición de un color violáceo o amarillo. Debido a que las proteínas y los aminoácidos, poseen esta característica, la reacción sirve para identificarlos. Algunas soluciones de amonio y aminas, dan la coloración característica, aparentemente debido a una oxidación y reducción intramolecular de la ninhidrina en presencia de amoníaco. Los aminoácidos porina e hidroxiprolina, que no poseen grupo amino sino imino (-NH-), dan un color rojo que pasa rápidamente a amarillo. La reacción se muestra en la figura 1

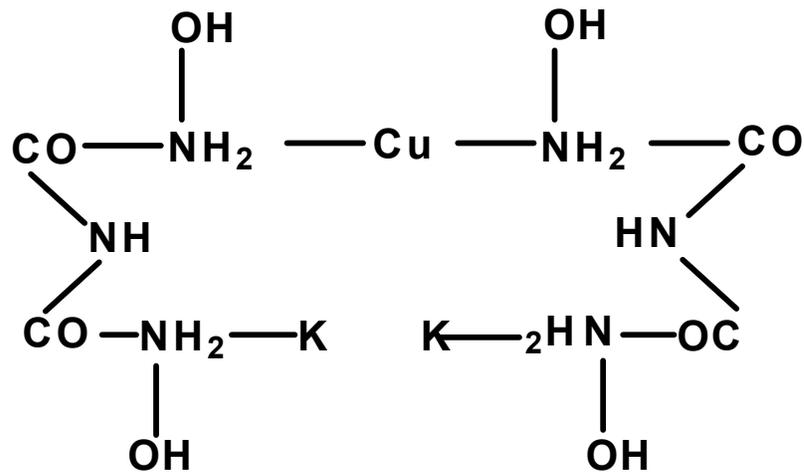
Figura 1 Reacción de la prueba de la ninhidrina



1.1.2 Prueba de Biuret

Es una prueba general para polipéptidos y proteínas ya que sirve para reconocer las uniones peptídicas. La positividad se manifiesta por la aparición de una coloración violeta. La formación de un complejo de coordinación entre los cationes cúpricos en medio alcalino con las uniones peptídicas.

Figura 2 Reacción de la prueba de Biuret



1.1.3 Prueba de coagulación:

Es una prueba para identificar: albúminas, globulinas, glutelinas y prolaminas. La positividad se manifiesta por la formación de un coágulo. No se conoce exactamente el mecanismo de reacción, se cree que ocurre cierta deshidratación de la molécula proteica.

1.1.4 Prueba de Sulfato de amonio:

Las proteínas, como otros coloide son precipitadas por soluciones concentradas de sales de amonio[NaCl. (NH₄)₂SO₄ y NaSO₄]. Aparentemente la precipitación se debe a la neutralización y deshidratación de la molécula, seguida de agregación y precipitación.

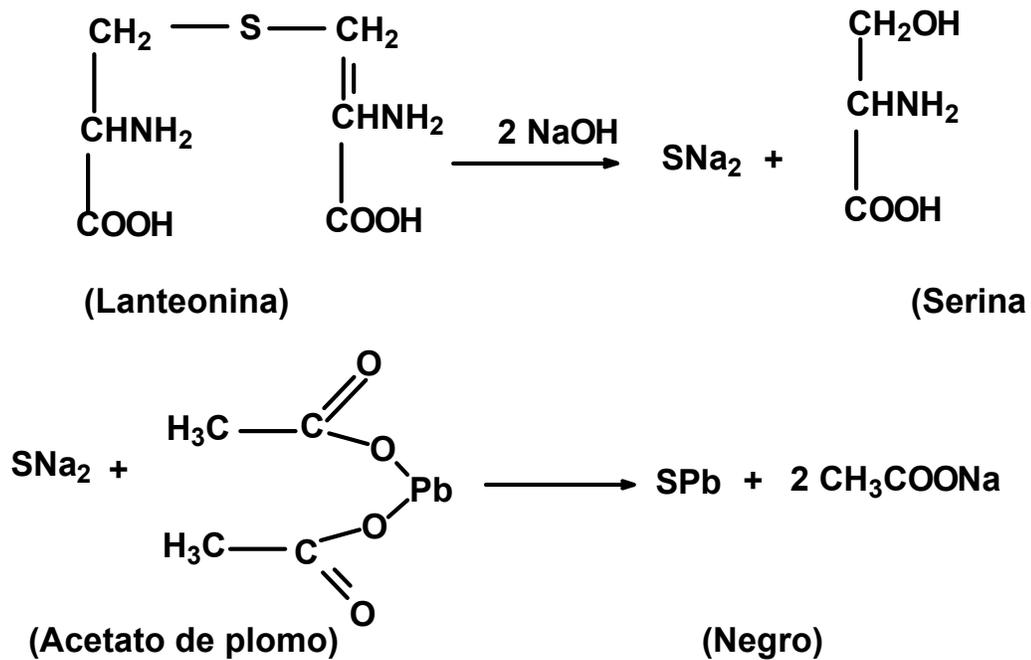
1.1.5 Prueba xantoprotica:

Es una reacción que reconoce los aminoácidos que poseen el grupo bencénico (tirosina, fenilalanina, triptófano). Las proteínas que tienen en su composición estos aminoácidos también darán la reacción. La positividad se reconoce por la aparición de un color amarillo o verde debido a la formación de nitrocompuestos.

1.1.6 Prueba de los grupos SH:

Es una prueba para identificar aminoácidos azufrados y las proteínas que los contiene, se reconocen por la formación de una coloración negra o gris. La figura siguiente muestra dicha reacción.

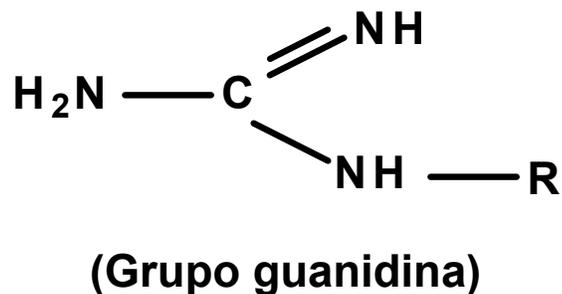
Figura 3. Reacción de la prueba de los grupos SH



1.1.7 Prueba de Sakaguchi:

Es una prueba para identificar arginina y se usa para identificar proteínas ya que casi todas las proteínas poseen ese aminoácido. El desarrollo de un color rojo marca la reacción positiva y se debe a la presencia del grupo guanidina, que caracteriza la arginina. (Figura 4)

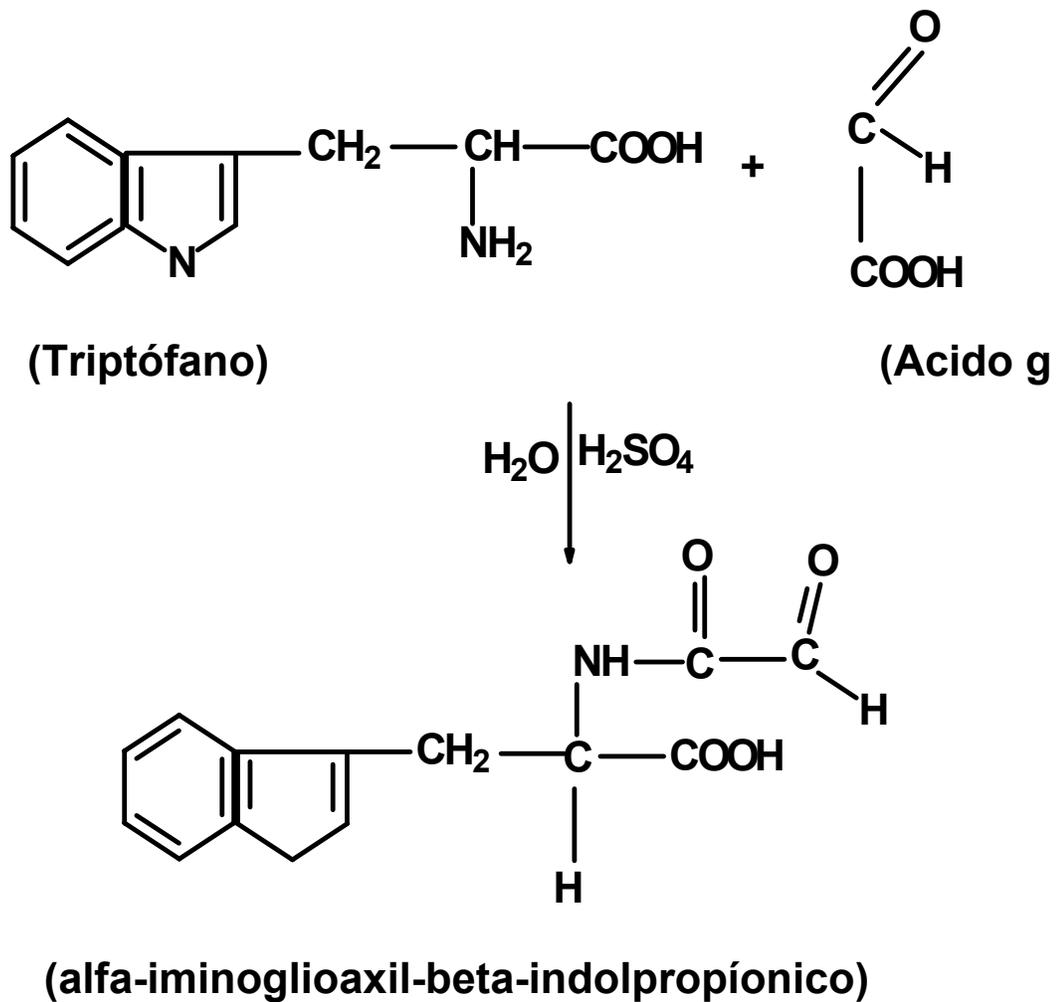
Figura 4 Grupo guanidina



1.1.8 Prueba de Hopkins-Cole:

Es para identificar el triptófano y las proteínas que lo contienen. La positividad se reconoce por la aparición de un anillo color violeta-rojizo. La reacción es la siguiente (figura 4)

Figura 5 Reacción de la prueba de Hopkins-Cole



1.1.9 Prueba de Millón:

La reacción es debida a la presencia del grupo hidroxifenílico ($-\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$) en la molécula proteica. Cualquier compuesto fenólico no sustituido en la posición 3,5, como la tirosina, fenol y timol, dan positiva la reacción. El mecanismo de la reacción es poco conocido, posiblemente se deba a la formación del complejo oxido de mercurio y fenol.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

Tubos de ensayo, mechero y pinzas de madera

2.2 Métodos

Prueba	Procedimiento En un tubo de ensayo colocar:	Volumen
2.21. P. Ninhidrina: (Hidrato de tricetohidrindeno al 0.1 %)	Sustancia problema	1 ml
	Reactivo ninhidrina	1 ml
	Calentar hasta ebullición por 1 min.	
	Deje enfriar y observe	
2.2.2. P. Biuret:	Sustancia problema	1 ml
	NaOH al 10 %	1 ml
	Mezclar e ir añadiendo gota a gota el sulfato cúprico al 0.5 % (CuSO ₄), agitando después de cada adición, hasta la aparición de un color violeta, azul o amarillo. El color violeta indica la reacción positiva.	
2.2.3. P. Coagulación	Sustancia problema	2 ml
	Ácido acético al 30 % (CH ₃ COOH)	4 gotas
	Solución saturada de Cloruro de sodio (NaCl)	1 ml
	Mezclar bien y calentar a la llama por 1 min. En el caso de la albúmina o la globulina se presenta un enturbamiento mas o menos intenso que persiste al enfriamiento, también puede observarse pequeños grumos en las paredes del tubo. Observe el tubo sobre un fondo oscuro.	
2.2.4. P. Sulfato de amonio (NH₄SO₄)	Sustancia problema	1 ml
	Solución de Sulfato de amonio al 50 %	1 ml
	Mezclar bien	
	Dejar en reposo durante 10 min.. Observe si se forma un precipitado. Centrifugar a 3000 r.p.m. por 10 min., observar. La reacción positiva se manifiesta por la formación de un precipitado, dependiendo directamente de la concentración de albúmina presente en la muestra.	
2.2.5. P. Xantoprotéica	Sustancia problema	1 ml
	Ácido nítrico concentrado (HNO ₃)	0.5 ml
	Mezclar bien	
	Calentar a la llama y observar	

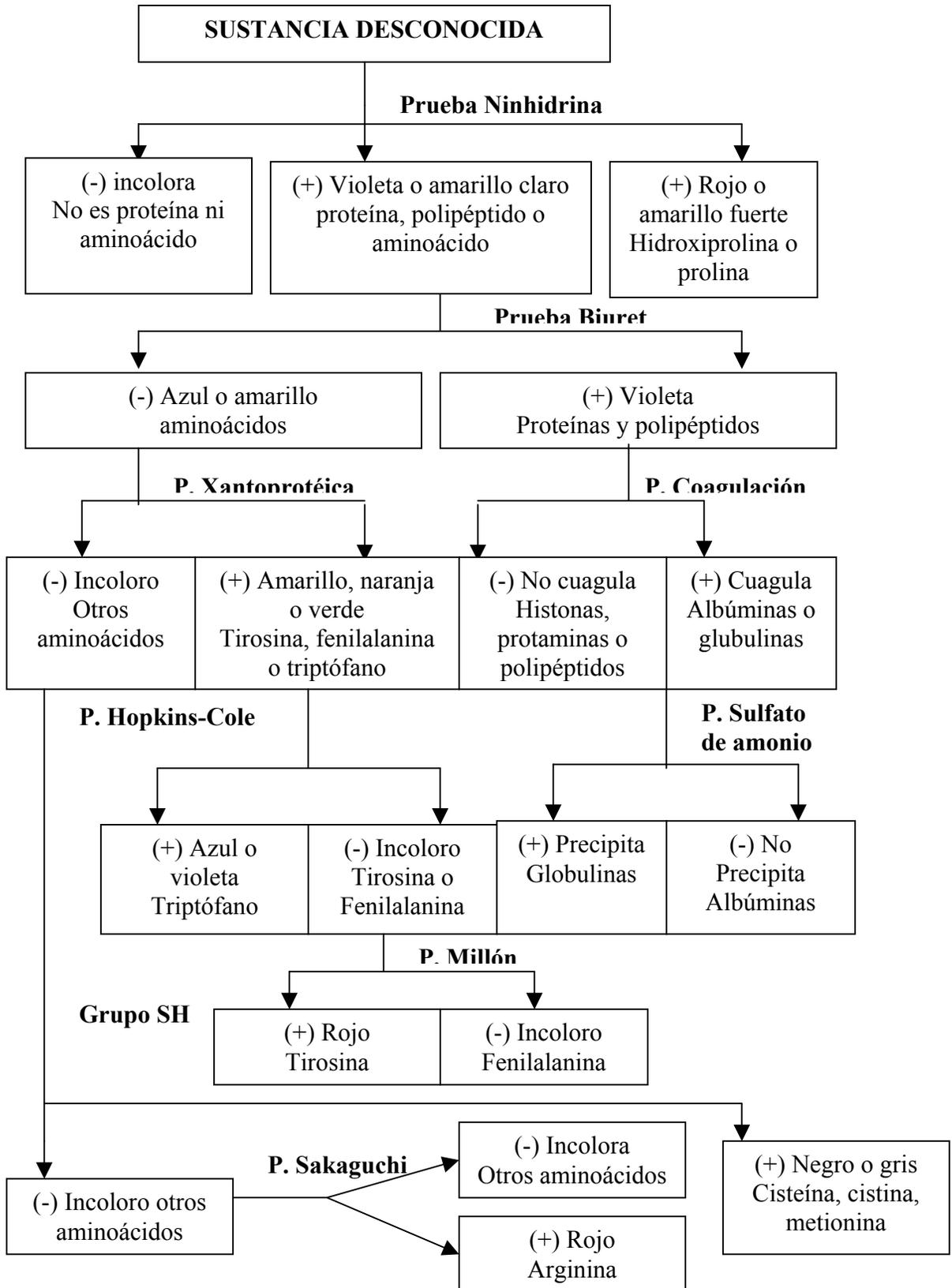
Prueba	Procedimiento En un tubo de ensayo colocar:	Volumen
2.2.6. P. Grupos SH	Sustancia problema	1 ml
	Hidróxido de sodio al 40 % (NaOH)	1 ml
	Acetato de Plomo	1 ml
	Mezclar bien	
	Calentar a la llama por 4 min. Mezclando continuamente y observar	
2.2.7. P. Sakaguchi	Sustancia problema	2 ml
	Hidróxido de sodio al 40 % (NaOH)	5 gotas
	Naftol	8 gotas
	Hipoclorito de sodio al 2 %	10 gotas
	Mezcal bien y observar.	
2.2.8. P. Hopkins-Cole	Sustancia problema	1 ml
	Reactivo de Hopkins- Cole (Preparación: 10 mg de magnesio en 250 ml de ácido oxálico, se completa a 1 litro con agua destilada)	3 ml
	Ácido sulfúrico concentrado (H ₂ SO ₄), se deja caer lentamente por las paredes del tubo, observar.	1 ml
2.2.9. P. Millón	Sustancia problema	2 ml
	Reactivo de Millón (Preparación: Hg y HNO ₃ En una proporción de 1:3, diluir con 2 volúmenes de agua la solución resultante.	4 gotas

3. AUTO-EVALUACIÓN.

1. Diga cuáles son los fundamentos químicos de las pruebas estudiadas.
2. Cuales son las aplicaciones prácticas de las pruebas.
3. Para el siguiente pentapéptido, diga cuales pruebas y porque serán positivas. (ALA-VAL-GLY-GLU-LYS)
4. Defina los siguientes términos: aminoácidos, proteínas, análisis cualitativo, cuantitativo.
5. Dibuje los 20 L- α - AA y clasifiquelos según la polaridad de sus grupos -R.
6. Efectué un enlace peptídico.

2.3

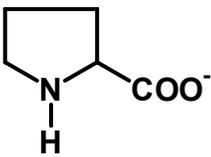
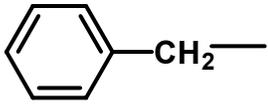
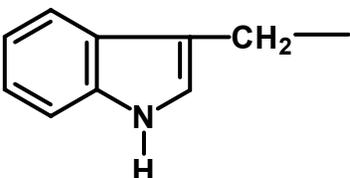
Marcha analítica



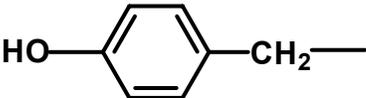
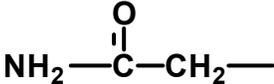
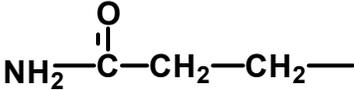
4. ANEXO

ESTRUCTURA Y ALGUNAS PROPIEDADES DE LOS AMINOACIDOS

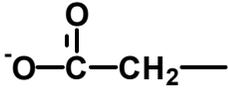
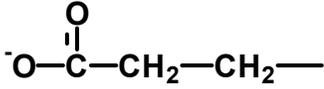
4.1 Aminoácidos no polares:

Nombre Abreviación PM	Grupo R	pKa' α-COOH	pKa' α-NH ₃ ⁺	pKa' R	PI
Alanina, Ala (A) 89	CH ₃ —	2,34	9,69		6,00
Valina, Val (V) 117	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}— \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	2,32	9,62		5,96
Leucina, Leu (L) 131	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}—\text{CH}_2— \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	2,36	9,60		5,98
Isoleucina, Ile (I) 131	$\text{CH}_3—\text{CH}_2—\text{CH}— \\ \\ \text{CH}_3$	2,36	9,60		6,02
Prolina, Pro (P) 115		1,99	10,60		6,30
Metionina, Met (M) 149	CH ₃ —S—CH ₂ —CH ₂ —	2,28	9,21		5,74
Fenilalanina, Phe F 165		1,83	9,13		5,48
Triptofano, Trp (W) 204		2,83	9,39		5,89

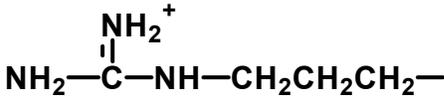
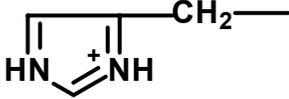
4.2 Aminoácidos polares:

Nombre Abreviación PM	Grupo R	pKa' α -COOH	pKa' α -NH ₃ ⁺	pKa' R	pI
Glicina, Gly (G) 75	H—	2,34	9,60		5,97
Serina, Ser (S) 105	CH ₂ —OH—	2,21	9,15		5,68
Treonina, Thr (T) 119	CH ₃ —CH ₂ —OH—	2,63	10,43		5,0
Cisteina, Cys (C) 121	CH ₂ —SH—	1,71	10,78	8,33	5,07
Tirosina, Tyr (Y) 181		2,20	9,11	10,07	5,66
Asparagina, Asn (N) 132		2,02	8,80		5,41
Glutamina, Gln (Q) 146		2,17	9,13		5,65

4.3 Aminoácidos ácidos:

Nombre Abreviación PM	Grupo R	pKa' α-COOH	pKa' α-NH ₃ ⁺	pKa' R	pH _I
Acido Aspártico, Asp (D) 133		2,09	9,82	3,86	2,7
Acido Glutámico, Glu (E) 147		2,19	9,67	4,25	3,22

4.4 Aminoácidos Básicos:

Nombre Abreviación PM	Grupo R	pKa' α-COOH	pKa' α-NH ₃ ⁺	pKa' R	pI
Lisina, Lys (K) 146		2,18	8,95	10,53	9,74
Arginina, Arg (R) 174		2,17	9,04	12,48	10,76
Histidina, His (H) 155		1,82	9,17	6,00	7,8

5. INFORME 2 (PRUEBAS CUALITATIVAS PARA AMINOÁCIDOS Y PROTEINAS)

Apellidos

Grupo de prácticas

Fecha

Calificaciones

Nombres

Nº del mesón

Nº del estudiante

Entrada		Desarrollo		Informe		Definitiva	
---------	--	------------	--	---------	--	-------------------	--

1. Complete el siguiente cuadro con la información deseada. En la casilla “N⁰ Muestra”, coloque el numero de cada tubo de las muestras problemas que se le entrego. Use los signos (+) o (-), para reportar la positividad o negatividad de la reacción. Sobre la base de los resultados de sus pruebas, Ud. puede identificar la muestra problema y escribir la composición mas resaltante en las casillas correspondientes.

N⁰ Muestra								
P. Ninhidrina								
P. Biuret								
P. Coagulación								
P. Sulfato amonio								
P. Xantoprotéica								
P. Grupos SH								
P. Sakaguchi								
P. Hopkins-Cole								
P. Millón								
Nombre de la muestra problema								
Composición de la sustancia identificada								

Nota: El informe debe ser entregado al finalizar la práctica, sin anexar hojas.