

TRABAJO PRACTICO N° 3.

PROTEÍNAS, PÉPTIDOS Y AMINOÁCIDOS.

OBJETIVOS

- Aplicar metodologías de análisis de aminoácidos a partir de patrones y de extractos vegetales.
- Reconocer la importancia farmacéutica de este grupo de metabolitos.

INTRODUCCION

Aunque se conocen alrededor de 300 aminoácidos biosintetizados en los vegetales, muy poco son constituyentes normales de proteínas, por lo que la gran mayoría de estos compuestos son considerados metabolitos secundarios. Existen muchos en forma libre, y otros se hallan formando pequeños péptidos. Originan gran variedad de metabolitos secundarios como aminas, ácidos de cadena corta, glucosilanos y betalainas, así como alcaloides y por desaminación, todos los compuestos fenilpropánicos.

La mayoría de los aminoácidos que ingerimos se encuentran en forma de proteínas, sin embargo sólo los aminoácidos pueden incorporarse a las diferentes rutas metabólicas. Para ello, las proteínas y péptidos ingeridos deben ser hidrolizados por medio de enzimas proteolíticas (proteasas). Después de la acción de las enzimas, los aminoácidos quedan libres y son absorbidos y transportados al torrente sanguíneo.

Estudios epidemiológicos destacan la importancia de los antioxidantes naturales, en especial en la prevención del cáncer y de enfermedades cardiovasculares. Entre estos se encuentran grupos químicos tales como polifenoles, vitaminas (C, E), β -carotenos y péptidos antioxidantes. Dichos péptidos pueden obtenerse a partir de la digestión de las proteínas de origen animal o vegetal, ya sea empleando enzimas endógenas o exógenas, fermentación microbiana u otros procesos.

Clasificación farmacognóstica

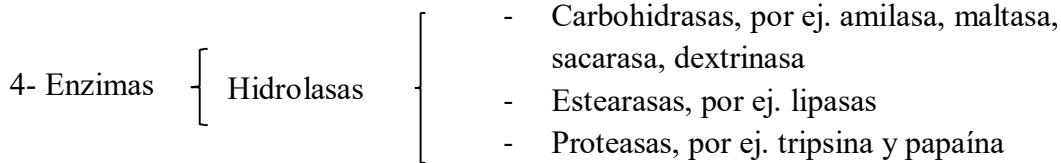
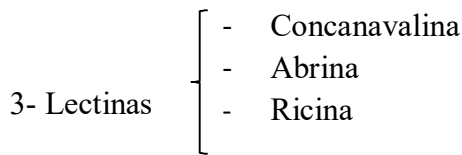
1- Proteínas
propiamente
dichas y
derivados

Origen animal

Origen vegetal

- Gelatina
- Sutura quirúrgica reabsorbible
- Heparina
- Protamina
- L-dopa
- Hidrolizado de péptidos y aminoácidos
- Proteínas endulzantes o edulcorantes, por ej. taumatina, monelina, miraculina
- Proteínas de semillas de valor nutritivo, por ej. soja y girasol

2- Péptidos bioactivos



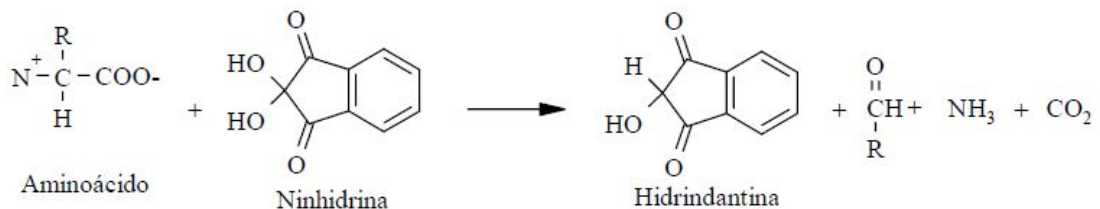
ACTIVIDADES PRÁCTICAS

1- Reacciones de Reconocimiento de Aminoácidos

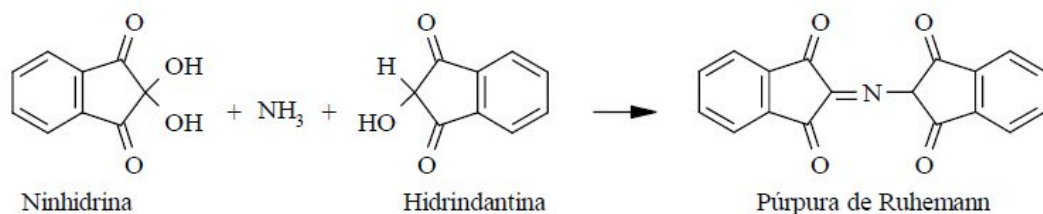
Efectuar las siguientes reacciones sobre el infuso (I), la **Fracción A** de las drogas vegetales en estudio y los patrones proporcionados por la cátedra.

1.1- Reacción de la Ninhidrina

El hidrato de tricetohidrindeno (ninhidrina) es el reactivo más usado para la identificación y cuantificación de aminoácidos. En una primera etapa de la reacción, el aminoácido se oxida, descarboxilándose y liberando amoníaco, mientras que una de las moléculas de ninhidrina se reduce a hidrindantina.



En el segundo paso de la reacción, la hidrindantina formada con una segunda molécula de ninhidrina, reaccionan con el amoníaco formando un complejo de color púrpura (Púrpura de Ruhemann).



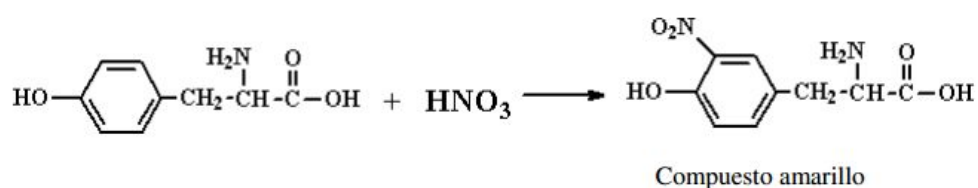
Procedimiento

- Sobre un papel de filtro, colocar una gota de las muestras y los patrones.

- Sobre cada una de las muestras, colocar una gota de una solución 0,2 % de ninhidrina en etanol.
- Llevar el papel a la estufa (entre 110 y 120 °C) hasta la aparición de color en las muestras.

1.2- Reacción xantoproteica (para aminoácidos con grupos aromáticos)

Aminoácidos como la fenilalanina, la tirosina y el triptófano, tienen anillos aromáticos derivados del benceno y por lo tanto, las propiedades químicas de esta molécula, como por ejemplo, la nitración del anillo bencénico en presencia de ácido nítrico. La reacción positiva se observa por la formación de un compuesto amarillo, al adicionar un grupo nitro al anillo bencénico, como se representa a continuación:



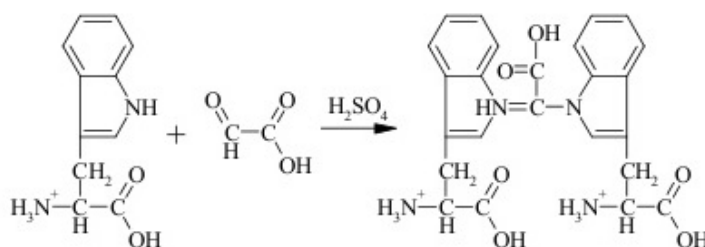
Procedimiento

- En un tubo de ensayo, agregar 2 o 3 ml de la solución a probar.
- Añadir 1 ml de ácido nítrico concentrado.
- Observar el color.

1.3- Reacción del ácido glioxílico o Reacción de Hopkins-Cole (para proteínas con aminoácidos con grupos indólicos)

Es específica para el grupo indol, característico del triptófano. El anillo indol reacciona con el ácido glioxálico en presencia de ácido sulfúrico concentrado para formar un compuesto violeta en la interfase entre la solución del aminoácido y del ácido sulfúrico. La estructura exacta del compuesto formado no se conoce, pero parece estar relacionado con el producto de condensación del aldehído del ácido glioxálico con los nitrógenos de dos anillos indólicos.

El triptófano puro en solución no da positivo a menos que se agreguen oxidantes, por lo que es de suponer que el triptófano de las proteínas no se libera como tal, por lo cual la reacción presentada es sólo parcialmente correcta.



Procedimiento

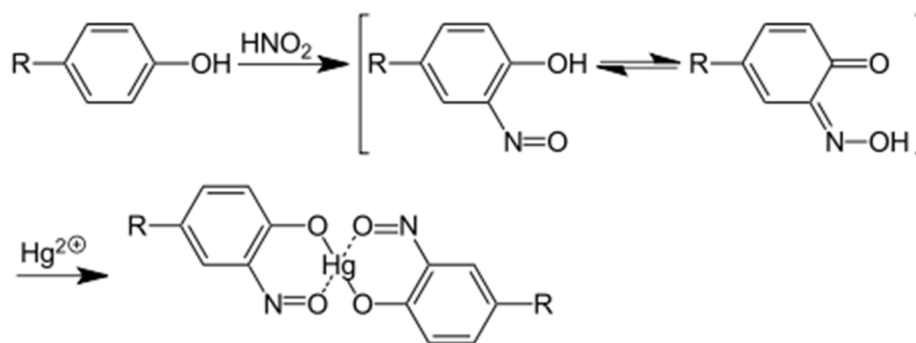
- Colocar 2 ml de la muestra en un tubo de ensayo y adicionar igual volumen de ácido acético, mezclar.

- Inclinar el tubo y permitir que 5 ó 6 ml de ácido sulfúrico concentrado resbale por las paredes del tubo, formándose dos fases.
- Ver la coloración entre las fases; un anillo violeta evidencia la presencia de grupos indólicos.

1.4- Reacción de Millon (para aminoácidos fenólicos)

Es específica para grupos fenólicos, por lo tanto dan positivo todas las sustancias que poseen esta estructura, por ejemplo, la tirosina. En una primera instancia se procede a la nitración del anillo fenólico con el ácido nítrico del reactivo. La tirosina nitrada forma complejos con los iones mercurio Hg (I) y Hg (II) del reactivo produciendo un precipitado rojo o una solución roja, ambos resultados positivos (a veces se observa un precipitado blanco, que debe calentarse para que vire a la coloración roja).

Reactivo de Millon (preparación según *Farmacopea Nacional Argentina 7° Ed.*): transferir 2 ml de mercurio a un erlenmeyer, agregar 20 ml de ácido nítrico. Agitar el erlenmeyer bajo campana extractora para deshacer el mercurio en pequeños glóbulos. Luego de aproximadamente 10 minutos agregar 35 ml de agua destilada y, si aparece un precipitado o cristales, agregar ácido nítrico diluido (1 en 5, preparado a partir de ácido nítrico al que se le hayan retirado los óxidos haciendo pasar aire a través de él hasta que se torne incoloro) en cantidad suficiente para disolver el sólido separado. Agregar una solución de hidróxido de sodio (1 en 10) gota a gota, mezclando minuciosamente, hasta que el precipitado grumoso que se forma luego del agregado de cada gota ya no se redisuelva, pero se disperse para formar una emulsión. Agregar 5 ml de ácido nítrico diluido y mezclar. Preparar esta solución al momento de usar.

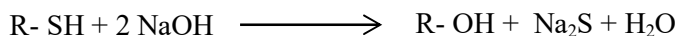


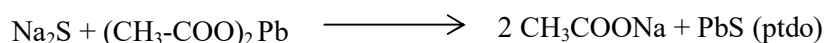
Procedimiento

- A 2 ml de la solución problema agregar 1 ml del reactivo de Millon.
- Calentar por 10 minutos a Baño María (100 °C) y observar el precipitado y/o color.

1.5- Reacción del acetato de plomo (para aminoácidos azufrados)

Esta reacción es específica para aminoácidos con azufre presente en la molécula, como la cisteína. Se produce la hidrólisis alcalina del grupo sulfidrido, formándose sulfuro de sodio. Posteriormente, el plomo desplaza al sodio, dando como resultado sulfuro de plomo, un precipitado de color gris o negro.





Procedimiento

- En un tubo, agregar 2 a 3 ml de la muestra; proceder igual con cisteína.
- Adicionar 2 ml de NaOH al 20 % y 10 gotas de acetato de plomo al 5 %.
- Calentar hasta ebullición sobre una llama moderada por 30 segundos y observar la formación del precipitado y su coloración.

2- Análisis de aminoácidos mediante cromatografía analítica planar

Sistema cromatográfico

Cromatofolio de altura y ancho necesarios según la cantidad de muestras.

Fase estacionaria: papel Whatman N° 1.

Fase móvil: etanol – hidróxido de amonio – agua (8:1:1).

Sustancia patrón: proporcionados por la cátedra.

Muestras: se usará el infuso (**I**) y la **Fracción A** preparados en el TP 2.

Procedimiento: sembrar 10 gotas de las muestras y 3 gotas de las sustancias patrón a 1 cm de cada borde y dejando 1 cm entre cada una. Dejar secar luego de cada siembra y efectuar el desarrollo ascendente con la fase móvil. Finalizada la cromatografía, secar a temperatura ambiente.

Revelado: con vapores de Iodo (revelador universal no destructivo).

Revelado específico: solución de ninhidrina al 0,2 % en etanol, aplicada por rociado. Luego llevar a estufa (110 - 120° C), hasta la aparición de color en las corridas.

Los aminoácidos serán identificados mediante el cálculo de los Rf correspondientes.

3- Reconocer la importancia farmacéutica de estos metabolitos, para lo cual se proponen las siguientes actividades:

a) Consultar en diferentes fuentes bibliográficas generales que se utilizan en las Farmacias tales como Manual farmacéutico y P.R. Vademécum entre otros, acerca de la importancia en farmacia del grupo fitoquímico en estudio. Para ello, seleccionar un producto que contenga proteínas o derivados de origen vegetal, otro que contenga péptidos y otro que contenga aminoácidos, y analizar la relación entre la composición química y el uso o importancia farmacéutica.

b) A partir de la lectura del **Trabajo 1** que se incluye en el apartado Material de Lectura, clasificar y señalar cuál es la relación estructura - actividad de los péptidos antioxidantes.

BIBLIOGRAFIA

- Bruneton, J. Fitoquímica Plantas Medicinales, 2nd ed.; ACRIBIA, S.A: España, 2001; pp. 185.

- Gallegos Tintoré, S.; Chel Guerreño, L.; Corzo Ríos, L.J.; Martínez Ayala, A. L. Péptidos con actividad antioxidante de proteínas. En Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias. Segura Campo, M: Chel Guerrero; Betancur Ancona, D. Eds; OmniaScience: Barcelona, 2013; pp. 111-112.

- Blanco-Labra, A.; Aguirre Manzilla, C. Proteínas involucradas en los mecanismos de defensa de plantas. Acta Universitaria. 2002, 12 (3).

- *Farmacopea Argentina*, 7° Ed., 2003. www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/fna.asp