REACCIONES DE IDENTIFICACION DE AMINOACIDOS Y PROTEINAS

INTRODUCCION

Un gran número de reacciones son utilizadas para la detección de proteínas. Debido a la compejidad de las moléculas proteicas y a la dificultad de obtenerlas en forma pura y aislada, estas pruebas son usadas sabiendo que identifican grupos químicos específicos de la molécula de proteína, ó más general todavía, para las cadenas laterales de los aminoácidos encontrados en todas las proteinas. Así, el reactivo de Millon da una reacción positiva cuando reacciona con los grupos fenólicos de los aminoácidos presentes en las proteínas.

Las reacciones de aminoacidos libres, son en general, las que podrían esperarse para los compuestos que contienen grupos aminos y grupos carboxilo, además cualquier otro grupo que pueda estar presente, sufre sus propias reacciones características.

OBJETIVO

Estimar químicamente la presencia de algunos aminoácidos, y tratar de determinar si estos mismos están presentes en las proteínas utilizadas.

FUNDAMENTO

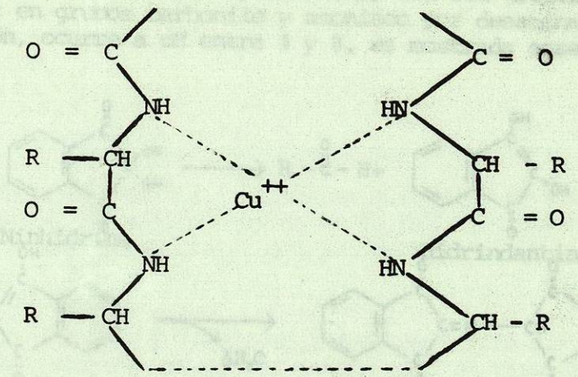
PRUEBA DE MILLON: Esta prueba nos permite detectar compuestos con radical hidroxibenceno como el aminoácido tirosina ó sus derivados; así como proteínas que lo contengan (albúmina). El reactivo de Millon es una mezcla de nitritos y nitratos mercúricos los cuales ocasionan la mercuración y nitración ó nitrosación del grupo fenólico de los aminoácidos libres ó presentes en proteinas, generando un precipitado blanco que por la acción del calor, toma un color rosado ó rojo ladrillo.

PRUEBA XANTOPROTEICA: Mediante esta prueba cualitativa podemos identificar aminoacidos que contienen anillos aromáticos ó heterociclicos en su molécula ó proteinas que los contengan; aunque el anillo bencénico de la fenilalanina no tiene suficiente capacidad para tornar positiva la prueba.

Cuando los aminoácidos con la característica estructural ya mencionada, se calientan en presencia de ácido nítrico concentrado, producen compuestos nitrados de color amarillo, a los cuales el álcali como el NaOH ó NH_4OH, convierten en sus sales respectivas de color naranja.

PRUEBA DE BIURET: Este ensayo nos permite detectar compuestos que poseen dos ó mas enlaces peptídicos. Cuando estas sustancias se tratan con soluciones de sulfato de cobre disuelto en solución alcalina (Reactivo de Biuret), dan un color violeta característico.

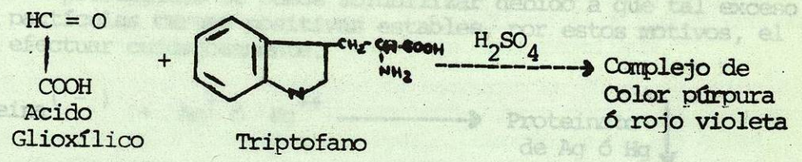
El color desarrollado es debido aparentemente al complejo de coordinación formado entre el átomo de cobre del Reactivo de Biuret, y cuatro átomos de nitrogeno peptídicos presentes en las cadenas polipeptídicas como se ejemplifica enseguida:



La intensidad del color generado es una medida cuantitativa del número de enlaces peptídicos presentes en la molécula. Esta prueba no es específica exclusivamente para detectar enlaces peptídicos, ya que cualquier compuesto que contenga dos grupos carbonilos unidos por un átomo de nitrogeno o de carbono, da también un resultado positivo, Asi, el compuesto conocido como biuret (H_2NCO- NH-$CONH_2$) da una reacción positiva .

REACCION DE HOPKINS-COLE: Esta prueba es específica para la identificación de triptofáno libre ó presente en proteínas. El reactivo de Hopkins Cole es una disolución de ácido glióxilico en agua, aunque el ácido acético glacial expuesto a la luz contiene también ácido glioxílico y se puede emplear en la prueba.

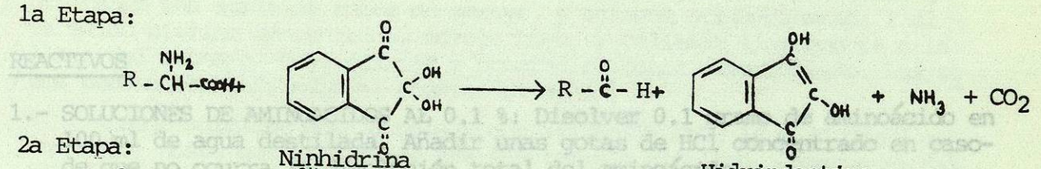
Cuando una solución de triptofano ó de proteína se trata con el Reactivo anterior, y luego se permite la estratificación de ácido sulfúrico; en la zona de interfase se genera un anillo púrpura ó rojo violeta resultante de la condensación del grupo carbonilo del ácido glioxílico y al anillo indol del triptofáno:



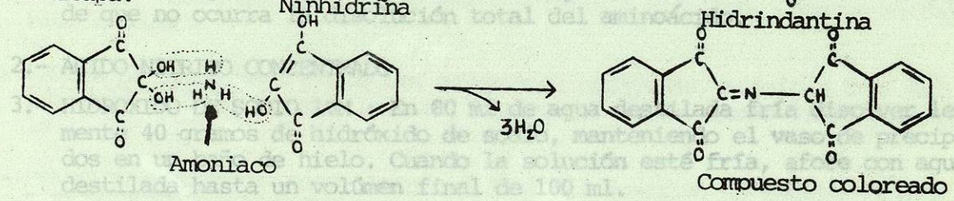
REACCION DE LA NINHIDRINA: Esta prueba permite identificar compuestos que poseen grupos amino libres como son todos los alfa-aminoacidos, aminas primarias y amoniaco.

Al añadir ninhidrina a una solucion que contenga aminoácidos, experimenta una reacción de oxidación y reducción con los grupos amino libres, desdoblandolos en grupos carbonilo y amoniaco por desaminación oxidativa. Esta reacción, ocurre a pH entre 4 y 8, es mostrada enseguida:

1a Etapa:



2a Etapa:



El compuesto final producido por los aminoácidos varía de color azul a violeta. Los péptidos ó proteinas dan una reacción positiva débil debido a que presentan menos grupos amino libres que los aminoácidos. Las aminas primarias y el amoníaco dan positiva la prueba, pero sin desprendimiento de CO_2. Los iminoácidos como la prolina y la hidroxiprolina también reaccionan con la ninhidrina, pero el color desarrollado es amarillo y no violeta.

PRECIPITACION CON SALES DE METALES PESADOS (PRECIPITANTES CATIONICOS): Las proteinas a pH 7 ó superiores a éste se encuentran en forma aniónica, es decir cargados negativamente, por lo que al adicionar iones de metales pesados cargados positivamente se neutraliza la carga de la proteína y ésta precipita de la solución débilmente alcalina. Un exceso de álcali ocasiona la precipitación de hidróxidos metálicos. Y cuando hay un excedente de iones de metal pesado el precipitado se puede solubilizar debido a que tal exceso confiere a las partículas cargas positivas estables, por estos motivos, el ensayo se debe efectuar cuidadosamente.

$$\text{Proteina}^{(-)} + Ag^{+} \text{ ó } Hg^{++} \longrightarrow \text{Proteinato de Ag ó Hg} \downarrow$$

MATERIAL POR EQUIPO DE CUATRO PERSONAS

20 tubos de ensaye de 18 x 150
6 pipetas de 5 ml
2 pipetas de 10 ml
1 mechero
2 gradillas
1 pinzas para tubos de ensaye
masking-tape ó etiquetas

REACTIVOS

1.- SOLUCIONES DE AMINOACIDOS AL 0.1 %: Disolver 0.1 gramo de aminoácido en 100 ml de agua destilada. Añadir unas gotas de HCl concentrado en caso de que no ocurra la disolución total del aminoácido.

2.- ACIDO NITRICO CONCENTRADO

3.- HIDROXIDO DE SODIO 10M : En 80 ml de agua destilada fría disolver lentamente 40 gramos de hidróxido de sodio, manteniendo el vaso de precipitados en un baño de hielo. Cuando la solución esté fría, afore con agua destilada hasta un volúmen final de 100 ml.

4.- CLORURO MERCURICO 0.2M : Disolver 54.428 gramos de $HgCl_2$ en agua destilada y luego aforar hasta un litro con agua destilada.

5.- ACIDO SULFURICO CONCENTRADO

6.- ACETATO DE PLOMO 0.2M: Disolver 75.842 gramos de $PbOAc \cdot 3\ H_2O$ en agua destilada, y luego aforar a un litro.

7.- NINHIDRINA AL 0.1%: Disolver 0.100 gramos de ninhidrina en n-butanol, y luego completar a un litro con n-butanol.

8.- REACTIVO DE BIURET: Disolver 1.50 gramos de $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ y 6 gramos de Tartrato de sodio y potasio ($NaKC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$) en 500 ml de agua destilada, enseguida, adicionar 300 ml de NaOH al 10%, y aforar a un litro con agua destilada.

9.- REACTIVO DE HOPKINS-COLE: Colocar 10 gramos de polvo de magnesio en un matraz Erlenmeyer de 1 litro, y añadir agua destilada hasta que cubra completamente al magnesio. Enseguida, agregar lentamente 250 ml de una solución saturada en frío de ácido oxálico y agitar bien el conjunto, enfriando si es necesario. Luego filtre y acidifique el filtrado con ácido acético glacial y diluyendo a un litro con agua destilada.

10.-REACTIVO DE MILLON: Disolver 10 gramos de mercurio en 20 ml de Acido Nítrico frío. Cuando la disolución sea completa y haya cesado de desprenderse humos pardos, adicione 60 ml de agua. Después de varias horas, decante el sobrenadante y guardelo en frasco oscuro.
PREPARACION ALTERNATIVA: Prepare una solución de sulfato mercurico al 15% en H_2SO_4 al 15% v/v.