



Universidad Autónoma de San Luis Potosí

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS

Identificación Cromatográfica
de los Aminoácidos Presentes en la Alfalfa
(Medicago sativa L.) Leguminosae

TRABAJO RECEPCIONAL
que para obtener el título de
QUIMICO - FARMACOBIOLOGO

Presenta:

Gloria Sánchez Avila

SAN LUIS POTOSI, S. L. P.

- 1977 -

898

5

1

C. S. i. i. K. H. 14

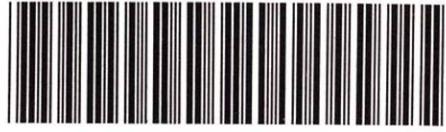
1898

0898

15

3

1



1080076920



Universidad Autónoma de San Luis Potosí

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS

Identificación Cromatográfica
de los Aminoácidos Presentes en la Alfalfa
(Medicago sativa L.) Leguminosae

TRABAJO RECEPCIONAL
que para obtener el título de
QUIMICO - FARMACOBIOLOGO
p r e s e n t a :

Gloria Sánchez Avila

SAN LUIS POTOSI, S. L. P.

- 1 9 7 7 -

T
QK495
257
52
53



Con gratitud y cariño.

A mis padres:

Sr. Juan Sánchez Ramírez.

Sra. Alberta Avila de Sánchez.

A mis hermanos:

Ma. del Rosario.

Ma. del Pilar.

Josefina.

Ma. Milagros.

J. Antonio.

A la Escuela de Ciencias Químicas.

A mis Maestros.

A mis compañeros de estudio.

A mis compañeros del Laboratorio de Fitoquímica del
I.I.Z.D.

Deseo expresar mi agradecimiento: al Sr. Dr. Aldo TORRE-FLORENZANO, jefe del Laboratorio de Fitoquímica del I. I. Z. D. por su valiosa ayuda en la realización del presente trabajo.

I N D I C E

	P.
INTRODUCCION	2
MATERIAL Y METODOS	5
IDENTIFICACION	9
INTERPRETACION DE RESULTADOS	24
DISCUSION Y CONCLUSIONES	26
BIBLIOGRAFIA	29

INTRODUCCION.

INTRODUCCION.

El presente trabajo "Identificación Cromatográfica de los Aminoácidos presentes en la Alfalfa" (Medicago sativa L.), tiene como objeto, el de contribuir al conocimiento de este grupo químico existente en la Alfalfa.

Desde el punto de vista nutritivo, es de gran importancia la calidad de una proteína, la que depende de los aminoácidos que se encuentren formándola.

Aquí, se pretende conocer cuales son los aminoácidos presentes en la Alfalfa y por consiguiente poder señalar la calidad óptima de esta Leguminosa como forraje.

En investigaciones bibliográficas, por nosotros -- efectuadas, se cita a la Alfalfa, como planta forrajera de un gran valor nutritivo para el ganado, -- (AGRICULTURA De las AMERICAS, 1961; FOLLETO de DIVULGACION, S.A.G., 1957; FONT QUER, P., 1962; SAN MARTIN CASAMADA, R., 1968; SCHAUENBERG, Paul, 1972; WALLIS, T.E., 1966).

El valor nutritivo que se le atribuye a la Alfalfa es debido a las proteínas, vitaminas y sales minerales que en ella se encuentran.

Este trabajo que se efectuó en el Laboratorio de Fitoquímica del Instituto de Investigación de Zonas Desérticas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, deseamos sea una contribución más, al mejor conocimiento de los productos naturales de origen vegetal.

MATERIAL Y METODOS.

MATERIAL.

El material utilizado en este trabajo, fueron, hojas y tallos de Alfalfa (Medicago sativa L.), la planta, fué recolectada en cultivos que se encuentran localizados en la zona periférica a la ciudad de San Luis-Potosí.

Una vez recolectado el material, se secó por la acción directa de los rayos solares, siendo posteriormente molido, con ayuda de un molino de mano.

METODOS.

El método utilizado para la purificación de los aminoácidos, fué el de pasaje sobre resina intercambiadora de iones. Una vez purificados éstos, se analizaron por medio de la cromatografía ascendente bidimensional en capa delgada de gel de Sílice "G".

PREPARACION DEL EXTRACTO.

20 g. de muestra, fueron colocados en un matraz con-
200 ml. de Alcohol de 60^o previamente neutralizado.-
Se agitó, posteriormente se dejó reposar 24 horas, -
una vez transcurrido este tiempo, se filtró; el resí-
duo fué agotado 4 veces más, con 150 ml. de Alcohol-
de 60^o previamente neutralizado.

Las soluciones extractivas, fueron concentradas bajo
presión reducida utilizando un aparato rotavapor - -
R-BÜCHI, hasta obtener 20 ml., teniendo así una con-
centración de 1 g. de alfalfa molida en 1 ml. de ex-
tracto. (TORRE-FLORENZANO, A., 1969).

PURIFICACION.

El extracto obtenido, es pasado por una columna de -
resina intercambiadora de cationes fuertemente ácida.
Una vez colocada la resina en la columna se le pasó-
Agua destilada (aproximadamente 500 ml.) gota a gota

para eliminar colorantes y sedimentar bien ésta. Enseguida se le pasaron gota a gota 500 ml. de HCl 2N. la columna se lavó nuevamente, hasta ausencia total de cloruros (hasta que el agua del lavado no presentó precipitado o enturbiamiento en presencia de - - - - - AgNO_3).

Los 20 ml. del extracto, fueron pasados gota a gota, y de la misma manera una solución de NH_4OH 2N. (aproximadamente 250 ml.). Esta solución fué evaporada con la ayuda de un aparato rotavapor R-BÜCHI hasta obtener 20 ml. evitando que la temperatura fuera superior a los 40°C (FIESER, L., 1967).

Preparación de la columna.

Se utilizó una columna de vidrio de 22 cm. de largo - por 3 cm. de diámetro y provista en su parte inferior de un sifón para evitar el secamiento de la misma. En la parte inferior de la columna se colocó una capa de algodón, enseguida la resina y sobre de ésta otra capa de algodón; quedando así en condiciones de utilizarse.

IDENTIFICACION.

IDENTIFICACION DE AMINOACIDOS.

La identificación y separación de los aminoácidos, - se llevó a cabo utilizando la cromatografía ascen--- dente bidimensional en capa delgada.

Separación cromatográfica.

Se utilizaron placas de vidrio de 20 x 20 cm. impreg nadas de gel de Sílice "G", el material extendido -- se preparó con 30 g. de gel de Sílice "G" y 60 ml. - de agua, el espesor de la capa fué de 250 micras. -- Las placas fueron activadas en la estufa a 110°C. du rante 15 minutos.

También se utilizaron cromatofolios "Al Silicagel -- 60 F₂₅₄", para cromatografía en capa delgada 20 x 20 cm., y de espesor de capa 250 micras.

La muestra fué colocada en la parte inferior izquier da de la placa con ayuda de una micropipeta.

El desarrollo de las placas se efectuó en las cubas saturadas correspondientes. (RANDERATH, Kurt, 1964).

Sistemas solventes empleados.

Para la primera dimensión el sistema:

Metanol-Cloroformo-Amoníaco al 17% (2-2-1 v/v).

Tiempo de desarrollo: 75 - 100 minutos.

Distancia emigrada: 15 cm.

Temperatura: $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Para la segunda dimensión el sistema:

Fenol-Agua (3-1 p/p).

Tiempo de desarrollo: 180 - 230 minutos.

Distancia emigrada: 15 cm.

Temperatura: $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Revelador empleado.

Las cromatoplacas fueron reveladas con solución de-
Ninhidrina al 0.2% en Acetona. (PUECH, A., DURU, C.
et PRIEUR, D., 1968).

PREPARACION DE CROMATOGRAMAS TESTIGO.

Para identificar los aminoácidos presentes en el extracto, se prepararon soluciones al 0.1 % de 16 aminoácidos testigo; 12 en solución acuosa y 4 en - - - HCl 0.5N.

Los aminoácidos solubilizados en HCl fueron: Tiro^sina, Acido Aspártico, Acido Glutámico y Leucina.

(PUECH, A., DURU, C. et PRIEUR, D., 1968).

Aminoácidos testigo.

Los aminoácidos testigo utilizados fueron: Arginina, Lisina, Valina, Serina, Acido Aspártico, Acido Glutámico, Fenilalanina, Histidina, Alanina, Metionina, - Glicina, Cisteína, Tiro^sina, Treonina, Leucina y Prolina.

Se efectuó una cromatografía con cada uno de los aminoácidos testigo, para tener una referencia y localizar así a cada aminoácido presente en la solución --

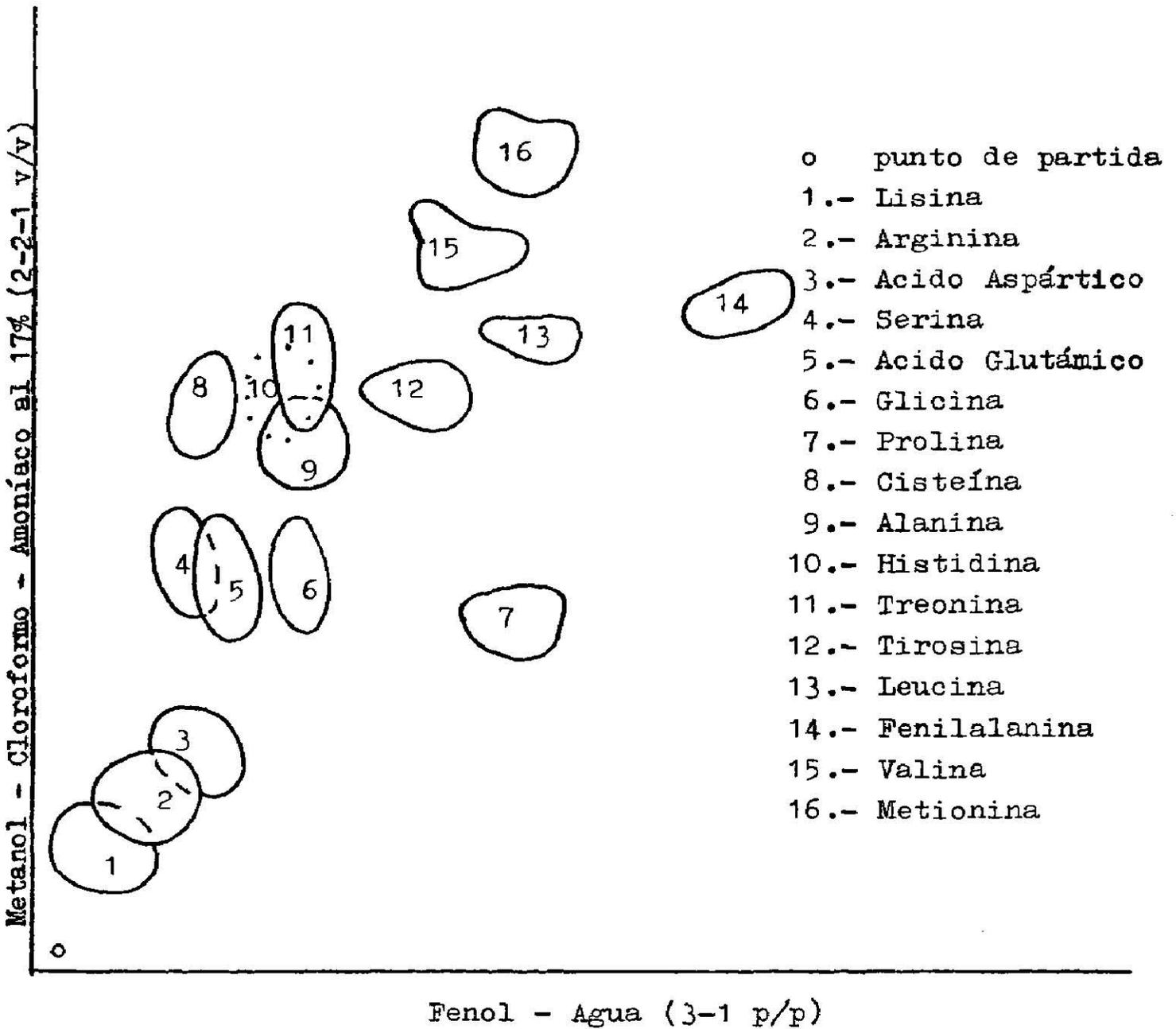
problema. Se hizo además un cromatograma con una mezcla de las soluciones de los 16 aminoácidos testigo.

Revelado de las cromatoplacas.

La solución de Ninhidrina al 0.2 % en Acetona reveló la presencia de los aminoácidos como manchas de color rosa o violeta a excepción de la Prolina que se observó de color amarillo naranja. (SHRINER, - - Ralph., FUSON, Reynold et CURTON, D., 1972).

Para detectar Cisteína y Metionina se añadió Peróxido de Hidrógeno para formar compuestos más estables, siendo oxidada la Cisteína a Acido Cistéico y la -- Metionina a Sulfon-Metionina. (RANDERATH, Kurt., -- 1964).

CROMATOGRAMA OBTENIDO CON LOS AMINOACIDOS TESTIGO EMI
GRADOS INDIVIDUALMENTE.



CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA DE AMINOACIDOS TESTIGO
EMIGRADOS INDIVIDUALMENTE, REVELADOS CON NINHIDRINA-
AL 0.2 % EN ACETONA.

Aminoácidos.	Color.
1.- Lisina	Violeta
2.- Arginina	Violeta
3.- Acido Aspártico	Violeta
4.- Serina	Rosa obscuro
5.- Acido Glutámico	Rosa obscuro
6.- Glicina	Rosa naranja
7.- Prolina	Amarillo naranja
8.- Cisteína	Rosa pálido
9.- Alanina	Rosa obscuro
10.- Histidina	Rosa
11.- Treonina	Rosa obscuro
12.- Tirosina	Rosa
13.- Leucina	Rosa obscuro
14.- Fenilalanina	Rosa obscuro
15.- Valina	Rosa naranja
16.- Metionina	Rosa naranja

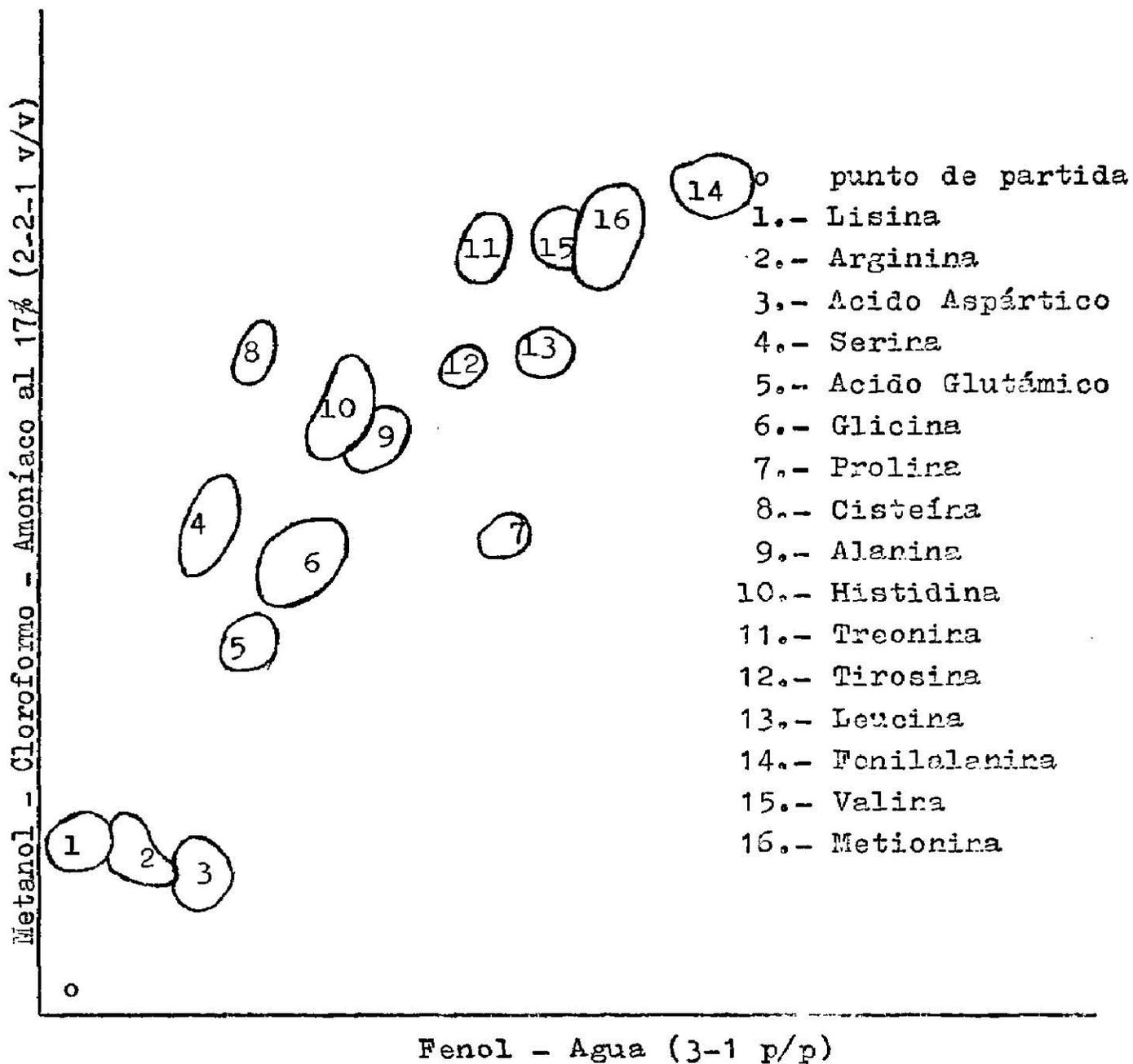
R_f DETERMINADOS EN LOS AMINOACIDOS TESTIGO EMIGRADOS
INDIVIDUALMENTE.

Aminoácidos.	R _f (I).	R _f (II).
1.- Lisina	0.120	0.032
2.- Arginina	0.165	0.072
3.- Acido Aspártico	0.209	0.123
4.- Serina	0.423	0.128
5.- Acido Glutámico	0.397	0.152
6.- Glicina	0.393	0.222
7.- Prolina	0.360	0.453
8.- Cisteína	0.503	0.131
9.- Alanina	0.546	0.241
10.- Histidina	0.582	0.213
11.- Treonina	0.620	0.226
12.- Tirosina	0.567	0.342
13.- Leucina	0.636	0.449
14.- Fenilalanina	0.677	0.631
15.- Valina	0.758	0.377
16.- Metionina	0.835	0.440

(I).- Metanol-Cloroformo-Amoníaco al 17 % (2-2-1
v/v).

(II).- Fenol-Agua (3-1 p/p).

CROMATOGRAMA OBTENIDO A PARTIR DE LA MEZCLA DE AMINO-
ACIDOS TESTIGO.



CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA DE LA MEZCLA DE AMINO-
ACIDOS TESTIGO, REVELADOS CON NINHIDRINA AL 0.2 % EN
ACETONA.

Aminoácidos.	Color.
1.- Lisina	Rosa violeta
2.- Arginina	Rosa violeta
3.- Acido Aspártico	Rosa violeta
4.- Serina	Rosa pálido
5.- Acido Glutámico	Rosa violeta
6.- Glicina	Rosa
7.- Prolina	Amarillo naranja
8.- Cisteína	Rosa
9.- Alanina	Rosa obscuro
10.- Histidina	Rosa naranja
11.- Treonina	Rosa pálido
12.- Tirosina	Rosa
13.- Leucina	Rosa obscuro
14.- Fenilalanina	Rosa obscuro
15.- Valina	Rosa pálido
16.- Metionina	Rosa naranja

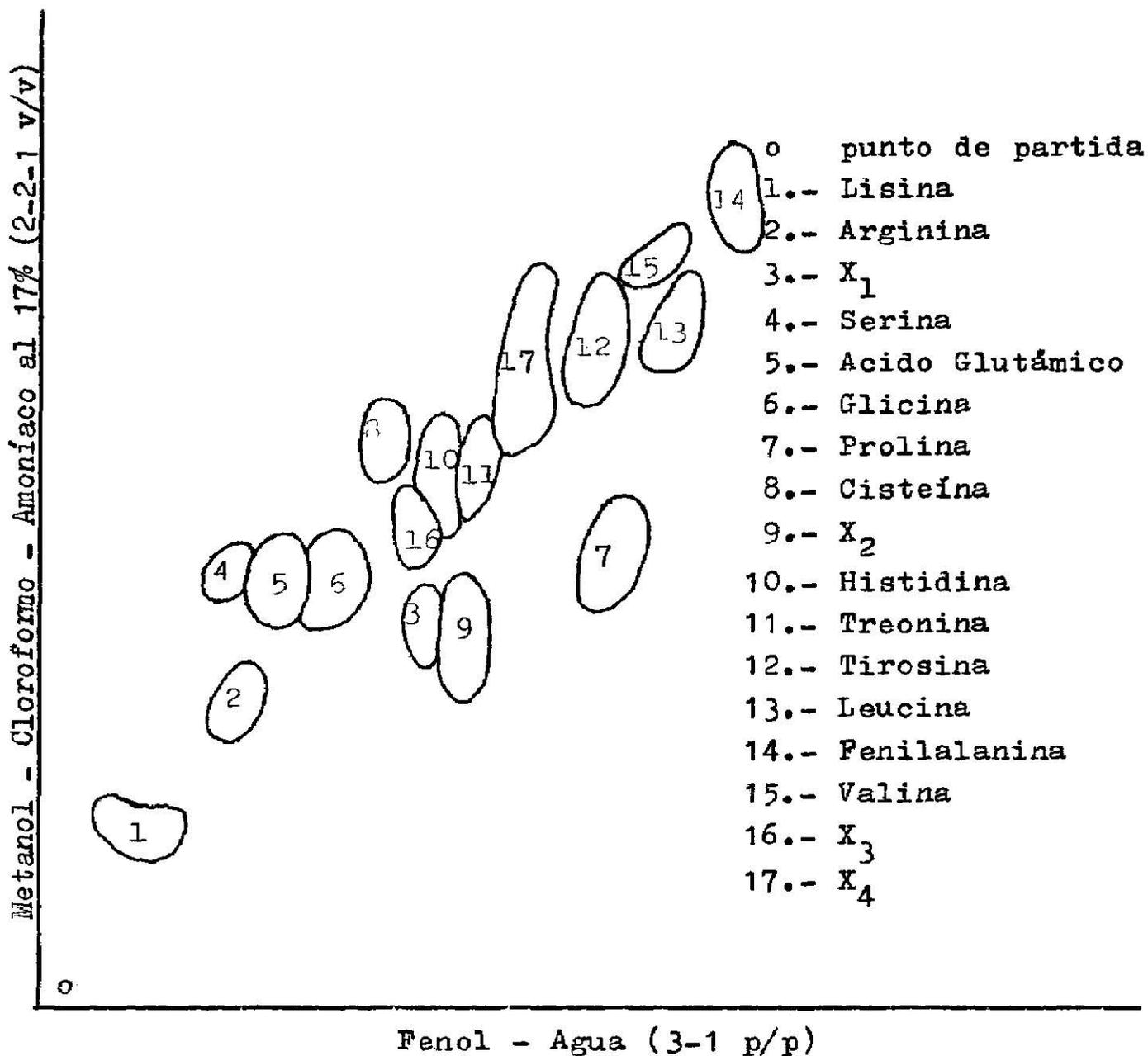
R_f DETERMINADOS EN LA MEZCLA DE AMINOACIDOS TESTIGO.

Aminoácidos.	R _f (I).	R _f (II).
1.- Lisina	0.166	0.020
2.- Arginina	0.153	0.073
3.- Acido Aspártico	0.146	0.126
4.- Serina	0.486	0.133
5.- Acido Glutámico	0.373	0.173
6.- Glicina	0.453	0.220
7.- Prolina	0.486	0.413
8.- Cisteína	0.660	0.180
9.- Alanina	0.580	0.286
10.- Histidina	0.606	0.260
11.- Treonina	0.733	0.393
12.- Tirosina	0.653	0.373
13.- Leucina	0.666	0.446
14.- Fenilalanina	0.840	0.600
15.- Valina	0.780	0.460
16.- Metionina	0.786	0.500

(I).- Metanol-Cloroformo-Amoníaco al 17 % (2-2-1 v/v).

(II).- Fenol-Agua (3-1 p/p).

CROMATOGRAMA OBTENIDO A PARTIR DEL EXTRACTO DE ALFALFA.



CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA DE LOS AMINOACIDOS - -
IDENTIFICADOS EN EL EXTRACTO DE ALFALFA, REVELADOS - -
CON NINHIDRINA AL 0.2 % EN ACETONA.

Aminoácidos.	Color.
1.- Lisina	Violeta
2.- Arginina	Violeta
3.- X ₁	Azul violeta
4.- Serina	Rosa pálido
5.- Acido Glutámico	Rosa obscuro
6.- Glicina	Rosa naranja
7.- Prolina	Amarillo naranja
8.- Cisteína	Rosa
9.- X ₂	Rosa
10.- Histidina	Rosa obscuro
11.- Treonina	Rosa
12.- Tirosina	Rosa
13.- Leucina	Rosa
14.- Fenilalanina	Rosa pálido
15.- Valina	Rosa pálido
16.- X ₃	Amarillo naranja
17.- X ₄	Rosa obscuro

R_f DETERMINADOS EN LOS AMINOACIDOS PRESENTES EN EL -
EXTRACTO DE ALFALFA.

Aminoácidos.	R _f (I).	R _f (II).
1.- Lisina	0.153	0.065
2.- Arginina	0.280	0.151
3.- X ₁	0.366	0.315
4.- Serina	0.413	0.144
5.- Acido Glutámico	0.403	0.177
6.- Glicina	0.420	0.230
7.- Prolina	0.426	0.480
8.- Cisteína	0.540	0.282
9.- X ₂	0.353	0.348
10.- Histidina	0.473	0.322
11.- Treonina	0.520	0.361
12.- Tirosina	0.646	0.467
13.- Leucina	0.666	0.539
14.- Fenilalanina	0.786	0.592
15.- Valina	0.733	0.506
16.- X ₃	0.460	0.302
17.- X ₄	0.620	0.401

(I).- Metanol-Cloroformo-Amoniaco al 17 % (2-2-1
v/v).

(II).- Fenol-Agua (3-1 p/p).

DETERMINACION CROMATOGRAFICA DEL TRIPTOFANO.

La identificación del Triptofano se llevó a cabo con ayuda del Acido Glioxílico (0.5 g. de Acido Glioxílico, 50 ml. de Acido Acético, 10 ml. de Agua destilada, 40 ml. de Acido Sulfúrico).

Las cromatoplasmas se prepararon y emigraron en la forma ya descrita. Una vez secas se revelaron con el reactivo del Acido Glioxílico y se llevaron a la estufa a 100°C. durante 5 minutos. (PUECH, A., DURU, C. et PRIEUR, D., 1968).

Con este método se revela la presencia del Triptofano como mancha redonda de color violeta intenso. Ninguna mancha con las características antes descritas se observó en los cromatogramas efectuados.

INTERPRETACION DE RESULTADOS.

INTERPRETACION DE RESULTADOS.

La presencia de los aminoácidos siguientes: Lisina, Arginina, Serina, Acido Glutámico, Glicina, Prolina, Cisteína, Histidina, Treonina, Tirosina, Leucina, -- Fenilalanina y Valina ha sido identificada por la coloración y posición de sus manchas.

La intensidad del color y las dimensiones de las manchas de: Acido Glutámico, Glicina, Prolina, Cisteína, Histidina y Tirosina permiten notar su presencia en mayor concentración.

En concentración también importante se encuentran -- los aminoácidos Lisina, Arginina, Treonina, Leucina y Fenilalanina; y en menor proporción Serina y Valina.

Se detectaron también 4 manchas que no fueron identificadas por carecer de un número mayor de aminoáci-- dos testigo, las cuales se designaron como X_1 , X_2 , - X_3 y X_4 .

Por bibliografía consultada (RANDERATH, Kurt., SHRI-
NER, Ralph., FUSON, Reynold et CURTON, D., 1964) la
mancha X_3 puede corresponder a la Hidroxiprolina.

DISCUSION Y CONCLUSIONES.

DISCUSION Y CONCLUSIONES.

Por los resultados obtenidos podemos decir:

La identificación de una mezcla compleja de aminoácidos es posible, utilizando métodos rápidos y sencillos como los citados en este trabajo.

Además la utilización de la cromatografía ascendente bidimensional en capa delgada, para la identificación de aminoácidos se ve ampliamente favorecida - - cuando: la mezcla de aminoácidos es previamente purificada en una columna de resina intercambiadora de iones pues se eliminan así otros principios que interfieren y dificultan la interpretación de los cromatogramas; y cuando el desarrollo de las cromatoplas se lleva a cabo en los solventes: Metanol-Cloroformo-Amóníaco al 17 % (2-2-1 v/v) para la primera dimensión y Fenol-Agua (3-1 p/p) para la segunda dimensión, se obtienen buenas separaciones.

En el extracto de Alfalfa detectamos 17 manchas, de las cuales se lograron identificar: Lisina, Arginina, Serina, Acido Glutámico, Glicina, Prolina, Cisteína, Histidina, Treonina, Tirosina, Fenilalanina, Leucina y Valina.

Las 4 manchas restantes designadas como X_1 , X_2 , X_3 y X_4 no se lograron identificar por carecer de un número mayor de aminoácidos testigo, pero quedan dentro del rango de color que dan los aminoácidos al reaccionar con la Ninhidrina. Según bibliografía consultada y, por el color y R_f obtenidos en la mancha X_3 , ésta puede corresponder a la Hidroxiprolina.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la Alfalfa es una planta de un gran valor nutritivo ya que en ella existen los aminoácidos Histidina, Lisina, Leucina, Fenilalanina, Treonina, Arginina y Valina, mismos -- que son considerados como esenciales en la dieta animal.

BIBLIOGRAFIA.

BIBLIOGRAFIA.

AGRICULTURA de las AMERICAS.

IMPLEMENT & TRACTOR INTERNATIONAL CORP.

Kansas City, U.S.A., 1961, 10, p. 21-23, 48.

AGRICULTURA de las AMERICAS.

IMPLEMENT & TRACTOR INTERNATIONAL CORP.

Kansas City, U.S.A., 1961, 11, p. 38-39, 46, 48-50.

AGRICULTURA de las AMERICAS.

IMPLEMENT & TRACTOR INTERNATIONAL CORP.

Kansas City, U.S.A., 1961, 12, p. 20-21, 35.

FIESER, L.

Experimentos de Química Orgánica.

Editorial Reverté, S.A., Barcelona, 1976, p. 274-275.

FOLLETO de DIVULGACION, S.A.G.

Oficina de Estudios Especiales.

México, D.F., 1957, 25, p. 5, 11.

FONT QUER, P.

Plantas Medicinales. El Dioscórides Renovado.

Editorial Labor, S.A., Barcelona, 1962, p. 367.

PUECH, A., DURU, C. et PRIEUR, D.

Travaux de la Société de Pharmacie de Montpellier.

Montpellier, 1968, 28, 4, p. 247-255.

RANDERATH, Kurt.

Chromatographie sur Couches Minces.

Gauthier-Villars, Paris, 1964, p. 26-27, 110-115.

SAN MARTIN CASAMADA, R.

Farmacognosia con Farmacodinamia.

Editorial Científico-Médica, Barcelona, 1968, p.996.

SCHAUENBERG, Paul.

Guía de las plantas Medicinales.

Ediciones Omega, S.A., Barcelona, 1972, p. 68-69.

SHRINER, Ralph., FUSON, Reynold et CURTON, D.
Identificación Sistemática de Compuestos Orgánicos.
Editorial Limusa-Wiley, México, D.F., 1972, p. 286.

TORRE-FLORENZANO, A.
These Doct., Pharm.
Montpellier, 1969, p. 53-54.

WALLIS, T.E.
Manual de Farmacognosia.
Compañía Editorial Continental, S.A., México, D.F.,
1966, p. 350-352.

