



1-Título práctica de laboratorio: PROPIEDADES DE AMINOÁCIDOS Y PROTEÍNAS

2-OBJETIVOS

Generales:

- Realizar pruebas de identificación de aminoácidos y proteínas a sustancias conocidas.

Específicos:

- Diferenciar las pruebas para identificar aminoácidos, péptidos y proteínas.

3-REFERENTES CONCEPTUALES

Las Proteínas son biomoléculas grandes que se encuentran en todo organismo vivo. Son el material principal de la piel, los músculos, tendones, nervios y la sangre, enzimas (catalizan miles de reacciones biológicas) anticuerpos y muchas hormonas. La queratina de la piel y las uñas, la fibroína de la seda y telarañas, la caseína de la leche, la hemoglobina de la sangre, el colágeno de los tendones y la piel, la miosina y la actina de los músculos, todas son Proteínas.¹

Sea cual sea su función, todas las Proteínas están construidas de muchas subunidades llamadas aminoácidos.

Un aminoácido es un ácido carboxílico con un grupo amino en el carbono, los cuales están unidos entre sí mediante enlaces "Peptídicos" en una cadena larga llamada polipéptido (Figura 1).

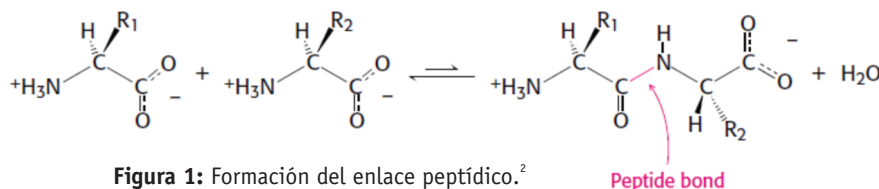


Figura 1: Formación del enlace peptídico.²

Un dipéptido contiene dos residuos de aminoácidos, un tripéptido contiene tres y un polipéptido contiene muchos residuos de aminoácidos. Las proteínas son polipéptidos que se presentan de forma natural y están formadas de 40 a 4000 residuos de aminoácidos. Las proteínas y los péptidos desempeñan muchas funciones en los sistemas biológicos. Por ejemplo en la figura 2 se muestra la estructura de un pentapéptido (Try- Gly- Gly-Phe-Leu), que muestra la secuencia desde el amino terminal al carboxilo terminal. Este pentapéptido, Leu-encefalina, es un péptido opioide que modula la percepción de dolor. El pentapéptido inverso, Leu-Phe Gly-Gly-Tyr, es una molécula diferente y no muestra tales efectos.²

Cuatro jerarquías de estructura se pueden detectar en el cadenas de polipéptidos: (a) **estructura primaria:** es del orden específico de residuos de amino-ácidos; (b) **estructura**

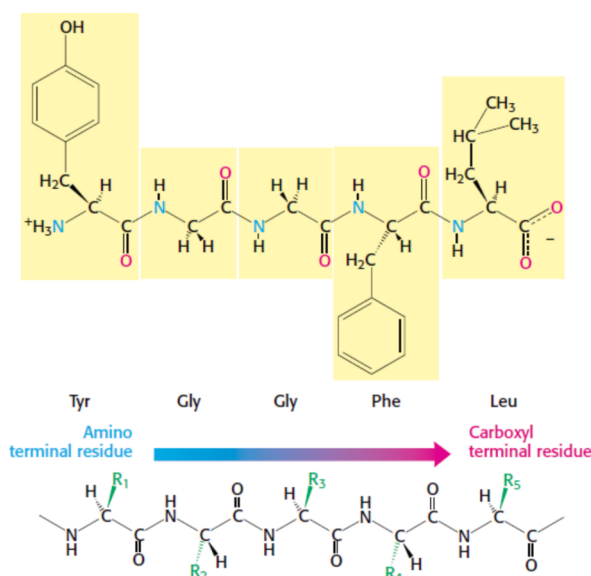


Figura 2: Estructura de un pentapéptido.²



secundaria: es la forma en que los residuos de aminoácidos interactúan dentro de una cadena para formar estructuras tales como la hélice alfa y la beta; **(c) estructura terciaria:** la forma en que una sola cadena polipeptídica entera (o cadenas unidas por enlaces disulfuro) se pliega para formar una estructura tridimensional; y **(d) estructura cuaternaria:** es la interacción entre cadenas para formar proteínas de múltiples subunidades³ como se muestra en la figura 3.

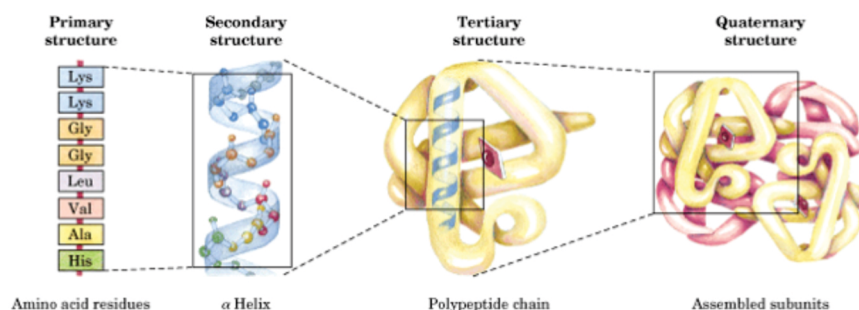


Figura 3: Estructuras de las proteínas.⁴

Las proteínas se clasifican, a grandes rasgos, en dos clases. Las proteínas fibrosas contienen cadenas largas de polipéptidos que se presentan en forma de haz; estas proteínas son insolubles en agua. Todas las proteínas estructurales son fibrosas. Las proteínas globulares tienden a tener formas esféricas y son solubles en agua. Todas las enzimas son en esencia proteínas globulares.⁵

4 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

Materiales y equipos

- 10. Tubo de ensayo
- 1. Gradilla
- 5. Pipeta Pasteur
- 2. Beaker de 100 mL
- 1. Beaker de 250 mL
- 1. Agitador de Vidrio
- 1. Pipeta de 10 mL
- 1. Pipeteador
- 1. Placa de calentamiento
- 1. Trípode
- 1. Pinzas para tubo de ensayo
- 1. Balanza digital

Reactivos

- 5g Albúmina de huevo
- 50 mL Agua destilada
- 2 mL Etanol al 95 %
- 1 mL AgNO_3 al 5%
- 1 mL HgCl_2 al 2%
- 2 mL Ácido tricloroacético al 10 %
- 3 mL NaOH 0,1 N
- 15 mL Reactivo de Biuret
- 15 mL Reactivo de Millon
- 6 mL HNO_3 concentrado
- 2 mL NaOH 10%
- 7 mL Ninhidrina
- 15 mL CH_3COOH concentrado
- 8 mL Reactivo de Esbach
- 20 mL Aminoácidos al 5%
(7 diferentes: tirosina, fenilamina, triptófano, Leucina, Cisteína, Arginina, Glutamato)
- Papel indicador Universal

Materiales que debe traer el estudiante

- Elementos de bioseguridad (Bata, guantes de nitrilo, monogafas).
- Toallas absorbentes.
- Sharpie.
- Algodón.



5-PROCEDIMIENTO

PARTE I: Cambios estructurales en la albúmina de huevo (Precipitación de la proteína)

- Preparar 20 mL de una solución acuosa de albúmina de huevo disolviendo la albúmina de huevo (clara del huevo) 1:5 en agua destilada.
- En 4 tubos de ensayo agregue 1 mL de disolución de clara de huevo (1:5), a cada uno de estos adicione las siguientes sustancias en las cantidades indicadas:
 - Tubo 1: 2 mL de etanol al 95 %.
 - Tubo 2: 5 gotas de nitrato de plata (AgNO_3) al 5 %.
 - Tubo 3: 5 gotas de cloruro de mercurio (HgCl_2) al 2 %, agite y observe lo ocurrido.
 - Tubo 4: 1 mL de ácido tricloroacético al 10%.
- En un tubo de ensayo adicione 2 mL de disolución de clara de huevo (1:5) y caliente a baño de maría durante 5-10 minutos, registre los cambios se observan en la mezcla.
- Agite la disolución de albumina de huevo (1:5), tome una gota de esta disolución y dispóngala en un vidrio de reloj. Determine el pH con papel indicador universal.
- Tome una gota de esta mezcla y dispóngala en el vidrio de reloj. Determine el pH con papel indicador universal.
- A la misma mezcla anterior, adicione gota a gota NaOH 0,1N hasta que la disolución se torne transparente como estaba inicialmente.

PARTE II. Pruebas de Identificación de aminoácidos, péptidos y proteínas.

REACCIÓN DE BIURET

- En tubos de ensayo diferentes adicione: 1 mL de disolución de clara de huevo (1:5) y 1 mL de disoluciones de aminoácidos 5%.
NOTA: Utilice las disoluciones de aminoácidos disponibles.
- Prepare una disolución de gelatina sin sabor al 5% (0,5g de gelatina en 10 mL de H_2O).
- Adicione 2 mL de la disolución anterior (gelatina 5%) a un tubo de ensayo.
- Adicione 2 mL de Leche en otro tubo de ensayo.
- A cada tubo de ensayo adicionar 1 mL de reactivo de Biuret.
- Observe y registre los resultados.



Disponga los residuos en el recipiente rotulado como "Disoluciones de metales pesados"

REACCIÓN DE MILLON

- En tubos de ensayo diferentes adicione: 1 mL de disolución de clara de huevo (1:5), 1 mL de disolución de gelatina 5% y 1 mL de disoluciones de aminoácidos 5%.
NOTA: Utilice las disoluciones de aminoácidos disponibles.
- A cada tubo de ensayo adicionar 1 mL de reactivo de Millon.
- Agite. Deje en reposo 10 minutos.
- Observe y registre los resultados.



Disponga los residuos en el recipiente rotulado como "Disoluciones de metales pesados"



REACCION XANTOPROTEICA

- En tubos de ensayo diferentes adicione: 1 mL de disolución de clara de huevo (1:5), 1 mL de disolución de gelatina 5% y 1 mL de disoluciones de aminoácidos 5%.

NOTA: Utilice las disoluciones de aminoácidos disponibles.

- Adicionar a cada uno 5 gotas de HNO_3 concentrado. Calentar suavemente (Baño María). Enfriar el tubo y agregar 1 mL de NaOH al 10 %. Observar y describir.



Disponga los residuos en el recipiente rotulado como "Disoluciones ácidas"

REACCION CON NINHIDRINA

- En tubos de ensayo diferentes adicione: 1 mL de disolución de clara de huevo (1:5), 1 mL de disolución de gelatina 5% y 1 mL de disoluciones de aminoácidos 5%.

NOTA: Utilice las disoluciones de aminoácidos disponibles.

- A cada tubo agregar dos gotas de ninhidrina y calentar. Observar la coloración que toman y compararla entre ellos.



Disponga los residuos en el recipiente rotulado como "Disoluciones de compuestos nitrogenados"

REACCION DE ESBACH

- En tubos de ensayo diferentes adicione: 1 mL de disolución de clara de huevo (1:5), 1 mL de disolución de gelatina 5% y 1 mL de leche.
- Agregue 2 mL de reactivo de Esbach. Anote el color del precipitado. Caliente y anote el cambio que se observa.



Disponga los residuos en el recipiente rotulado como "Disoluciones ácidas"

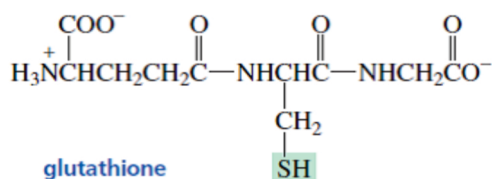
6 Preguntas de profundización

Para entregar resueltas en el pre-informe

- Consultar en que consiste y cuál es el fundamento teórico (para qué se utilizan y las características) de las siguientes pruebas de identificación de aminoácidos, péptidos y proteínas (Escriba ecuaciones químicas):
 - Reacción de Biuret
 - Reacción de Millon
 - Reacción Xantoproteíca
 - Reacción con Nihidrina
 - Reacción de Adamkevich o Hopkins- Cole
 - Reacción de Esbach
- Describa cómo se da el proceso de desnaturalización de las proteínas por cambios de temperatura, de pH y la adición de otras sustancias (reactivos).



- ¿Por qué los grupos carboxilo de los aminoácidos son mucho más ácidos que los carboxilos de un ácido carboxilo como el ácido acético?
- El glutatión es un tripeptido que destruye los agentes nocivos del organismo, compuestos que se piensa son causantes de algunos efectos del envejecimiento. El glutatión reduce los agentes oxidantes y los destruye como consecuencia, se oxida el glutatión: Identifique los enlaces peptídicos en la estructura y diga si se presenta algo inusual. Explique.



- Si se tienen tres muestras biológicas no etiquetadas, en la cual una de ellas es un carbohidrato, otra un lípido y otra una proteína; ¿Cuál prueba se usaría para identificar rápidamente cual es la proteína? Explique

Para entregar en el informe

- Para el procedimiento realizado en la PARTE I: Explique en cada caso que efecto tuvo la adición de los reactivos a la solución de albumina, escriba las reacciones.
- Describa cada una de las reacciones realizadas en la práctica. Escriba la ecuación que describe la reacción química correspondiente.
- Describa las propiedades químicas de los aminoácidos teniendo en cuenta: el grupo carboxilo (formación de sales, reducción hasta alcoholes, esterificación, descarboxilación, formación de cloruros de aminoácidos).
- Describa las propiedades químicas de los aminoácidos teniendo en cuenta: el grupo amino (formación de sales, reacción con el ácido nítrico, reacción de Van-Slyke, alquilación, formación de bases de Schiff, reacción de Sanger).
- Describa las propiedades químicas de los aminoácidos teniendo en cuenta: el radical (reacción xantoproteíca, reacción de Pauly, reacción de Sakaguchi, reacción del nitroprusiato, reacción del Millon, reacción de Adamkevich (Hopkis Cole), reacción de Folin).
- Resuma las principales propiedades químicas de los peptidos y las proteínas.

7-BIBLIOGRAFÍA

- Horton, H. Robert; Moran, Laurence A.; Scrimgeour, K. Gray; Perry, Mark D.; Raw, J. David. (2008) .Principios de Bioquímica. 4ª Edición, Editorial Pearson Educación, México
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2002). Biochemistry, ; W. H.
- Smith, A., Datta, S. P., Smith, G. H., Campbell, P. N., Bentley, R., & McKenzie, H. A. (2000). Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology. Oxford University Press (OUP).
- Nelson, D. L., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2008). Lehninger principles of biochemistry. Macmillan.
- Voet D, Voet JG, Pratt C. (1999). Fundamentals of biochemistry. USA: John Wiley and Sons.