

77
2g



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

DETERMINACION DE METIONINA Y CISTINA POR
MEDIO DE SUS DERIVADOS OXIDADOS



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

T E S I S

Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

presenta

JUAN CARLOS ROMERO TORRES

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1988



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

I INTRODUCCION.....	1
II OBJETIVO.....	1
III GENERALIDADES	
1.0 AMINOACIDOS.....	2
1.1 CLASIFICACION.....	5
1.2 REACTIVIDAD.....	6
1.3 PROPIEDADES IONICAS.....	7
1.4 PROTEINAS.....	10
2.0 AMINOACIDOS AZUFRADOS.....	11
2.1 CISTINA Y CISTEINA.....	12
2.2 METIONINA.....	15
3.0 DETERMINACION DE AMINOACIDOS MEDIANTE UN AUTOANALIZADOR DE AMINOACIDOS.....	17
3.1 CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO.....	17
3.2 ELEMENTOS ESENCIALES DE UN AUTOANALIZADOR DE AMINOACIDOS.....	19
3.3 ESTRUCTURA GENERAL DE LA RESINA DE UN AUTO- ANALIZADOR DE AMINOACIDOS.....	20
3.4 SISTEMA DE DETECCION.....	22
IV PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	
1.0 DIAGRAMA DE TRABAJO.....	24
1.1 MUESTRAS.....	25
1.2 OXIDACION.....	25
1.3 HIDROLISIS.....	26
1.4 CUANTIFICACION.....	27
V RESULTADOS Y DISCUSION	
1.0 OXIDACION.....	31
1.1 CUANTIFICACION.....	31
1.1.1. METIONINA.....	33
1.1.2. CISTINA.....	35
1.1.3. AMINOACIDOS AZUFRADOS TOTALES.....	37
VI CONCLUSIONES.....	38
VIII BIBLIOGRAFIA.....	39

I INTRODUCCION

Uno de los principales problemas que se han detectado al analizar el contenido de aminoácidos en alimentos, por medio de la hidrólisis proteica, es la baja concentración de los aminoácidos azufrados, encontrados debido a su inestabilidad a las condiciones en que se desarrolla la hidrólisis, lo que conduce a una deficiente estimación de los requerimientos de metionina y cistina en la nutrición animal.

Si consideramos la importancia económica que tienen estos aminoácidos en la formulación alimentaria, es importante tener una técnica que nos permita cuantificar adecuadamente la cantidad de metionina y cistina presentes en alimentos.

Para evitar el problema de la inestabilidad de estos aminoácidos, se han utilizado diversas técnicas que nos permiten proteger adecuadamente a los aminoácidos azufrados:

La oxidación de cistina a ácido cisteico, con ácido per fórmico, antes de la hidrólisis de la proteína es apropiada al momento de cuantificar la cistina en alimentos. Del mismo modo, para tener una buena recuperación de metionina al momento de cuantificarla en alimentos es necesario oxidarla a sulfonina de metionina. Igualmente se ha utilizado una hidrólisis a temperatura elevada y tiempo corto (ATTC), para evitar la destrucción de la metionina.

Para el desarrollo del presente trabajo se utilizó una técnica conjunta de la metodología propuesta por Moore en 1963 con la de Kaiser et al. propuesta en 1974. Estas técnicas, además de haber demostrado ser eficientes, son adecuadas, pues nos ofrecen una aceptable confiabilidad con una buena ganancia de tiempo (Comparandola con la hidrólisis normal que necesita un tiempo de 24 horas para llevarse a cabo).

II OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo fué el desarrollo de una técnica para cuantificar a los aminoácidos azufrados presentes en cualquier tipo de alimentos, utilizando una oxidación con ácido per fórmico, seguida de una hidrólisis de mayor temperatura y menor tiempo, para evitar al máximo la destrucción de éstos aminoácidos azufrados.

III GENERALIDADES

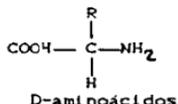
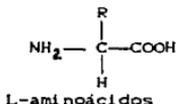
1.0 AMINOACIDOS.

Extrictamente definido, un aminoácido es un ácido orgánico el cual tiene uno o más grupos amino sustituyentes. El más común de los aminoácidos tiene una estructura general con un grupo amino primario y un grupo carboxilo, tales grupos se encuentran unidos a un solo átomo de carbono. Otro de los enlaces de este carbono esta unido a un átomo de hidrógeno, y el grupo que se encuentra unido por la cuarta valencia es el llamado radical orgánico (grupo R). El grupo R es el que confiere a cada uno de los aminoácidos sus propiedades específicas, así como la distribución de la carga en él.

A diferencia de los aminoácidos, los iminoácidos, prolina e hidroxiprolina, carecen de un grupo amino primario. El nitrógeno reacciona con el grupo R para formar un anillo pirrólico de 5 miembros. Esta diferencia con los aminoácidos es lo que permite que los iminoácidos den una coloración diferente al reaccionar con la ninhidrina.

Es evidente el gran número de aminoácidos que pueden existir debido a las numerosas posibilidades de variación, ya sea en la longitud de la cadena hidrocarbonada, a la posición y el número del grupo aminocarboxílico, o al radical orgánico en la molécula.

Con excepción de la glicina que tiene un átomo de hidrógeno como radical R, todos los aminoácidos presentan un carbono asimétrico, y por lo tanto existen en dos formas ópticamente activas: D y L isómeros. De acuerdo con la estructura química del gliceraldehído, los aminoácidos que se encuentran en la naturaleza, y que tienen actividad biológica son los de configuración L. Los de la serie D se encuentran en mezclas racémicas de aminoácidos producidos a través de distintos procesos químicos y no son aprovechados por el organismo humano en la síntesis de proteínas, sino que en la mayoría de los casos sirven únicamente como fuente de energía.



En la naturaleza se encuentran varios aminoácidos; sin embargo, la mayoría de las proteínas varían considerablemente respecto al contenido de los 21 aminoácidos aceptados (Cuadro I). El número de posibles polímeros que se pueden formar con 21 aminoácidos llega a ser muy grande, ya que, por ejemplo, una proteína que tenga 100 aminoácidos alcanza hasta 21^{100} secuencias diferentes

de aminoácidos y, por lo tanto, de proteínas. Generalmente no hay tantas combinaciones, sino que cada proteína tiene una secuencia de aminoácidos muy establecida y bien definida, lo que repercute en sus propiedades y funciones biológicas. Esto se puede ver claramente en la anemia de células falciformes, que se presentan normalmente en la raza negra y que se debe al cambio de una molécula de ácido glutámico en posición 6, de la cadena β de la hemoglobina, por una valina o lisina. Esta diferencia tan pequeña trae consigo problemas que pueden ser muy graves, como la hemólisis o rompimiento de los glóbulos rojos.

En ciertas proteínas estos α -aminoácidos se encuentran tan sólo en trazas, en cambio en otras proteínas la proporción de estos aminoácidos es relativamente alta. Los siguientes ejemplos ilustran esta variable distribución. La glicina está ausente en albuminas; y presente en pequeñas cantidades en las globulinas, caseína, y en proteínas vegetales solubles en alcohol; y es relativamente abundante en gelatina. Las proteínas solubles en alcohol contienen relativamente altos porcentajes de prolina y ácido glutámico; en tanto que las queratinas, las proteínas del cabello y tipos similares de tejido de epidermis son caracterizados por su alto contenido de cistina. La gelatina es deficiente en cisteína y en aminoácidos aromáticos.

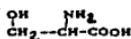
Además de los 21 aminoácidos mencionados, existen más de 100 que se encuentran en diferentes tejidos en forma libre o combinada, pero nunca en las proteínas. Algunos de estos son no proteicos, pero actúan como importantes precursores de otras moléculas, o bien como intermediarios en el metabolismo humano. Por ejemplo, la β -alanina es el precursor del ácido pantoténico; la homocisteína y la homoserina intervienen en el metabolismo de varios aminoácidos; la citrulina y la ornitina son intermediarios en la síntesis de la arginina, entre otros.¹⁶

cuadro I Aminoácidos de configuración L comunmente encontrados en las proteínas.

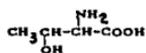
Grupo	Nombre trivial	Abreviatura	Fórmula
A.	Glicina	Gly	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{COOH} \end{array}$
	Alanina	Ala	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{CH}_3-\text{C}-\text{COOH} \end{array}$
	Valina	Val	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \\ \quad \\ \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$
	Leucina	Leu	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \\ \quad \\ \text{CH}_3-\text{CHCH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$
	Isoleucina	Ile	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \\ \quad \\ \text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$

B.

Serina Ser

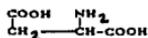


Treonina Thr

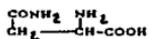


C.

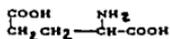
Ac. aspártico Asp



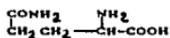
Asparagina Asn



Ac. glutámico Glu

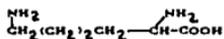


Glutamina Gln

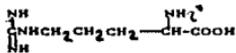


D.

Lisina Lys

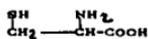


Arginina Arg

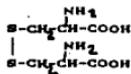


E.

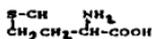
Cisteína Cys



Cistina CySS

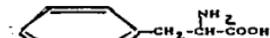


Metionina Met

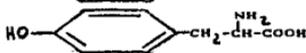


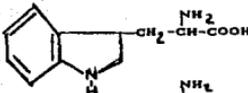
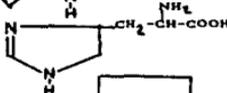
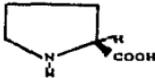
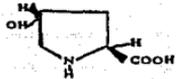
F.

Fenilalanina Phe



Tirosina Tyr



Triptofano	Try	
Histidina	His	
Prolina	Pro	
Hidroxi prolina	Hypro	

(3)

1.1 CLASIFICACION.

Existen diferentes formas de clasificación de los aminoácidos pero todas se refieren a la naturaleza del grupo R. Algunos aminoácidos como la glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina son del tipo monoaminocarboxílico; la lisina y arginina son del tipo diaminocarboxílico y a su vez la alanina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, triptófano y la metionina, tienen un carácter hidrófobo debido a la estructura química de su radical, mientras que otros son polares como la glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, lisina, glutamina y los ácidos aspártico y glutámico. Los aminoácidos también se pueden clasificar desde el punto de vista nutricional como indispensables y no indispensables dependiendo de la capacidad que tiene el cuerpo humano para sintetizarlos. Los indispensables son aquellos que forzosamente se deben de obtener de la dieta, ya que bioquímicamente no se sintetizan en las cantidades requeridas por el hombre, mientras que los no indispensables son normalmente producidos en concentraciones suficientes para el organismo humano de tal manera que no es tan necesaria su presencia en las proteínas de los alimentos.⁵

De las anteriores y otras formas más son clasificados generalmente los aminoácidos, éstos presentan propiedades que dependen de la naturaleza de su grupo R. A continuación se presenta en el cuadro II una forma muy común de clasificación de aminoácidos.

CUADRO II Clasificación de aminoácidos

DIVISION DE AMINOACIDOS		ABREVIATURA
I. -	Aminoácidos ácidos	
	- ácido aspártico	asp
	- ácido glutámico	glu
II. -	Aminoácidos neutros	
	- alanina	ala
	- asparagina	asp
	- cisteína	cys
	- cistina	cysc
	- glutamina	gln
	- glicina	gly
	- isoleucina	ile
	- leucina	leu
	- metionina	met
	- fenilalanina	phe
	- serina	ser
	- treonina	thr
	- triptofano	try
	- tirosina	tyr
	- valina	val
III. -	Aminoácidos básicos	
	- arginina	arg
	- histidina	his
	- lisina	lys
	- ornitina	orn
IV. -	Aminoácidos	
	- prolina	pro
	- 4-hidroxiprolina	hypro

(14)

1.2 REACTIVIDAD QUÍMICA.

Como se ha comentado con anterioridad el radical orgánico de los aminoácidos es el que confiere a éste sus propiedades específicas, de tal forma que la reactividad química que presente va a estar en función de que tan activo sea el grupo R. Los aminoácidos derivados de hidrocarburos alifáticos son prácticamente inertes, mientras que la cisteína con su grupo sulfhidrilo es altamente reactiva, pudiendo intervenir en una gran variedad de reacciones. El imidazol de la histidina, además de que favorece muchas reacciones, se puede romper por la acción de varios agentes químicos con el consecuente desprendimiento de subproductos que a su vez tienen un alto grado de reactividad.

Los grupos amino de la asparagina, la glutamina y la lisina son también muy reactivos. El tioéster de la metionina es propenso a transformaciones de oxido-reducción, y el grupo guanidino de la arginina, al igual que el hidroxilo fenólico de la tirosina, tiene la capacidad de favorecer muchas otras reacciones.

1.3 PROPIEDADES IONICAS.

Debido a sus grupos ionizables, carboxilo y amino, los aminoácidos tienen la capacidad de desarrollar una carga positiva o negativa de acuerdo con el pH al que se encuentren; es decir, su carácter anfotérico les confiere la capacidad de recibir y donar electrones. Esta situación hace que exista un estado químico conocido como punto isoeléctrico o de doble ión, en el que el aminoácido tiene el mismo número de cargas negativas y positivas, y por tanto su carga neta es de cero. Los aminoácidos pueden tener tres estados de carga eléctrica, que dependen del pH al cual se encuentren: a pH menores de su punto isoeléctrico se encuentran en forma protonada o catiónica; en el pH correspondiente al punto isoeléctrico su carga neta es cero, y por encima del punto isoeléctrico adquieren una carga negativa (forma aniónica). A continuación se presenta un sistema completo en equilibrio que envuelve una solución de un aminoácido, pasando de una acidez media a una alcalinidad media.

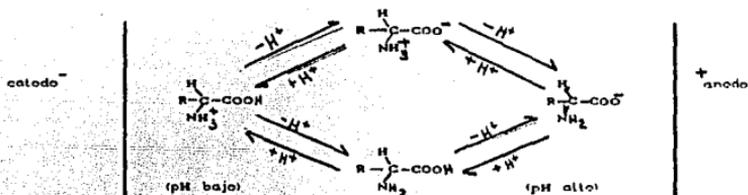
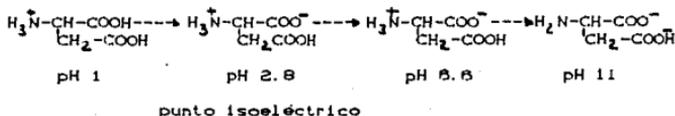


FIGURA 1. Representación esquemática del equilibrio de disociación de un aminoácido.

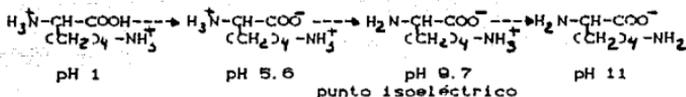
Las dos formas que se presentan en el centro del diagrama de la figura 1, corresponden al punto isoeléctrico en el cual la carga neta es cero o carece de carga. Al aumentar el pH existe una desprotonización del grupo carboxílico y por tanto la formación de

un anión, en este caso la carga neta del aminoácido es negativa. Al disminuir el pH el grupo amino sufre una protonación y el aminoácido adquiere una carga neta positiva al formar un catión.

Un proceso de representación de los estados iónicos de un aminoácido en función del pH es ilustrado en seguida, tomando al ácido aspártico para el caso:



De la misma forma tenemos los estados de ionización de la lisina:⁴

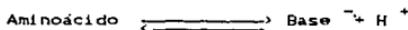


Esta propiedad que tienen los aminoácidos de ionizarse en función del pH al cual se encuentren, sirve para explicar la teoría del intercambio iónico, que se analizará posteriormente.

La ionización de los aminoácidos es similar a la de cualquier otra molécula ionizable y por tanto sigue la ecuación de Henderson-Hasselbalch.

$$\text{pH} = \text{pK} + \log \frac{\text{forma no protonada (base)}}{\text{forma protonada (ácido)}} ; \quad \text{pK} = -\log K$$

Donde el pK, por definición, es el logaritmo negativo de la constante de disociación de los grupos ionizables. A su vez, la constante de disociación se puede definir como sigue:



$$K = \frac{[\text{Base}^-][\text{H}^+]}{[\text{Aminoácido}]}$$

Los valores de las constantes de disociación de los distintos grupos ionizables de los aminoácidos se muestran en el

cuadro III. Además de los carboxilos y aminos que contienen todos los aminoácidos, los siguientes grupos son los que tienen una mayor influencia en el comportamiento ácido-base de los aminoácidos: el imidazol de la histidina, el amino ϵ de la lisina, el carboxilo β del ácido aspártico, el sulfhidrilo de la cisteína, el carboxilo del ácido glutámico, el guanidino de la arginina y el hidroxilo fenólico de la tirosina.

El punto isoelectrónico de un aminoácido que contiene un sólo grupo carboxilo y uno amino se puede calcular a partir de sus respectivos valores de pK

$$pI = \frac{pK \text{ amino} + pK \text{ ácido}}{2}$$

El cálculo puede hacerse con relativa facilidad para los ácidos monoaminocarboxílicos y en muchos casos para el más complejo de los aminoácidos. En el caso de los peptidos el cálculo se torna un poco más complicado, y en el caso de las proteínas mucho más.

CUADRO III. Constantes de disociación logarítmicas de algunos aminoácidos

AMINOACIDOS SIMPLES			
Aminoácido	(-COOH)	(NH ₃ ⁺)	PI
Glicina	2.34	9.60	5.97
Alanina	2.34	9.69	6.00
Valina	2.32	9.62	5.96
Leucina	2.36	9.60	5.98
Isoleucina	2.36	9.68	6.02
Serina	2.21	9.15	5.68
Prolina	1.00	10.00	6.50
Fenilalanina	1.88	9.18	5.48
Triptófano	2.38	9.39	5.89
Metionina	2.28	9.24	5.74

AMINOACIDOS QUE CONTIENEN ALGUN GRUPO FENOLICO O SULFIDRILLO

	pK ₁ (COOH)	pK ₂	pK ₃	PI
Tirosina	2.20	9.11(NH ₃ ⁺)	10.07(OH)	5.66
Cisteína	1.98	8.18	10.28	5.07

AMINOACIDOS CONTENIENDO DOS GRUPOS CARBOXILO

	pK ₁ (α-COOH)	pK ₂ (COOH)	pK ₃ (NH ₃ ⁺)	PI
Acido aspártico	1.88	3.89	9.60	5.96
Acido glutámico	2.19	4.25	9.67	3.22

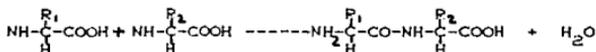
AMINOACIDOS CONTENIENDO DOS GRUPOS BASICOS

	(COOH)	pK ₂	pK ₃	PI
Histidina	1.82	6.00(NH ⁺)	9.17(NH ₃ ⁺)	7.59
Arginina	2.17	9.04(NH ₃ ⁺)	12.48(Qua ⁺)	10.76
Lisina	2.18	8.95(α-NH ₃ ⁺)	10.53(NH ₃ ⁺)	9.74

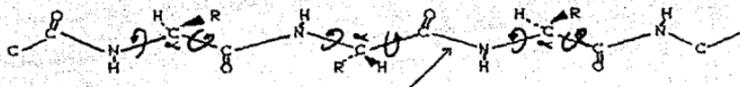
(7)

1.4 PROTEINAS.

Por definición las proteínas son polímeros de alto peso molecular (de aproximadamente 10⁴ a 10⁶ daltones). Cuando se solubilizan son de dimensiones coloidales, tienen propiedades anfotéricas, y su hidrólisis completa produce una mezcla de aminoácidos. Las proteínas están compuestas de residuos de aminoácidos que se encuentran unidos en una unión química firme por enlaces covalentes. Una cadena individual de esta naturaleza es conocida como péptido. La formación de péptidos consiste en la eliminación de agua de los grupos amino y carboxílico de los aminoácidos al condensarse.



La condensación de un número mayor de aminoácidos a través de enlaces peptídicos produce los polipéptidos, de tal forma que cuando tienen un peso molecular de más de 5000 daltones, se les denomina proteínas. Los péptidos y las proteínas tienen un grupo amino y uno carboxilo terminal correspondiente a los dos aminoácidos que se localizan en los extremos de la cadena. La figura 2 muestra la estructura de una cadena polipeptídica y además se puede observar que sólo los átomos del carbono α donde se encuentra el grupo R, tiene la capacidad de rotación.



amino terminal enlace peptídico planar carboxilo terminal

FIGURA 2. Enlace peptídico que muestra que solo el carbono α tiene posibilidades de rotación.

Existen muchas evidencias sobre la existencia de los enlaces peptídicos, como es el hecho de que las proteínas tienen muy pocos grupos amino y carboxilo titulables, que aumentan considerablemente después de una hidrólisis ácida o alcalina de la proteína. Existen además diferentes estudios espectroscópicos y enzimáticos que han demostrado que los aminoácidos de las proteínas están unidos a través de enlaces carbono-nitrógeno provenientes de la condensación entre grupos carboxilo y amino.

2.0 AMINOACIDOS AZUFRADOS

Dentro del grupo de los 22 aminoácidos normalmente aceptados, son tres los cuales tienen incluidos en su estructura átomos de azufre. Estos aminoácidos son cistina, cisteína y metionina. Este átomo de azufre se encuentra en diferentes formas químicas que dependen de su estado de oxidación; básicamente existe como sulfhidrilo (SH), o forma parte de un enlace disulfuro (S-S). Estos grupos azufrados son altamente reactivos y pueden intervenir en muchas reacciones. Dichos grupos se oxidan o se reducen fácilmente produciendo varios compuestos aromáticos de bajo peso molecular, están sujetos a reacciones de intercambio con ellos mismos, a una hidrólisis alcalina, su destrucción por irradiación y a la ruptura por fuerzas mecánicas.

En las proteínas la acción conjunta de sustancias reductoras y disolventes sobre los grupos disulfuro produce el rompimiento de la estructura tridimensional de ella, haciendo que adquiera una configuración al azar.

Los grupos sulfhidrilo activos (R-SH) se producen como resultado de la hidrólisis térmica de los enlaces S-S de las proteínas, después de un tratamiento con ciertos agentes desnaturalizantes. En caso de que el calentamiento fuese más intenso, los sulfhidrilo serían subsecuentemente degradados a ácido sulfhídrico por la hidrólisis de la unión S-C, o bien formarían sulfonas en presencia de oxígeno.

Los enlaces disulfuro de las proteínas provienen de la oxidación de dos moléculas de cistina y desempeñan un papel muy importante en la estabilidad y funcionalidad de las moléculas de los polipéptidos. De todas las uniones covalentes que se encuentran en las proteínas, el enlace disulfuro S-S es el más sensible a los diferentes agentes físicos y químicos que las afectan.

2.1 CISTINA Y CISTEINA

CISTINA

Nombres químicos

3,3'-Ditiobis(2-ácido aminopropanóico)
 β, β' -Diamino- β, β' -dicarboxil dietil disulfuro
Bis(β -amino- β -carboxietil)-disulfuro
 α -Diamino- β -ditiláctico ácido

Nombres triviales

Dicisteína
 β, β' -Ditiodialanina

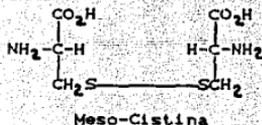
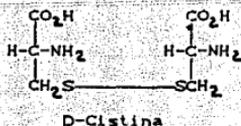
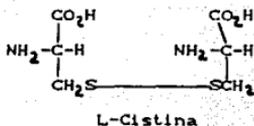
Fórmula empírica

$C_6H_{12}O_4N_2S_2$; C 29.99%, H 5.03%, O 26.63%, N 11.66%, S 28.69%

Peso molecular

240.31

Estructura y designación de estereoisómeros



CISTEINA

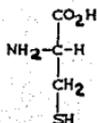
Nombres químicos

2-amino-3-ácido mercaptopropanóico
 α -amino- β -ácido tiolpropanóico

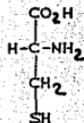
Fórmula empírica

C H O NS; C 20.74%, H 5.82%, O 26.41%, N 11.55%, S 26.47%

Estructura y designación de estereoisómeros



L-Cisteína



D-Cisteína

Historia y aislamiento de fuentes naturales

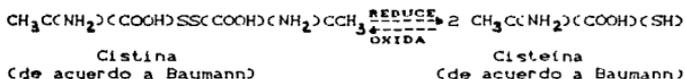
En 1810 Wollaston describió un compuesto orgánico, el cual logra aislar de dos cálculos biliares; este mostró ser soluble tanto en ácidos como en álcalis y lo separó a partir de una solución alcalina en acidificación con ácido acético, bajo la forma de placas hexagonales. A este compuesto le llamo óxido por que era aparentemente de naturaleza anfotérica (propiedad presentada por muchos óxidos metálicos), y puesto que este provenia de materia acumulada en la vejiga decidió llamarlo "óxido cístico". Esta substancia cuando arde produce una flama azulada y desprende un olor desagradable, no obstante este fenómeno, que fué cuidadosamente registrado por Wollaston, no hizo mención a una posible presencia de sulfuro. El compuesto fué analizado por Thaulow en el laboratorio de Liebig obteniendo resultados a partir de los cuales fué deducida la siguiente fórmula $\text{C}_4\text{H}_7\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$. El nombre de cistina en vez de óxido cístico, ya había sido introducido por Berzelius en 1833.

Asimismo, por otro lado Kulz en 1890 reportó el aislamiento de un precipitado blanco a partir de fibra cruda y páncreas desmenuzado, el cual parecía ser cistina. El material de Kulz, probablemente no estaba completamente puro, pues reportó una rotación de valores de menos de 142° . Mauthner, quien fué el primero en medir la rotación óptica de la L-cistina, reportó en 1892 a una rotación específica valuada a 20° de -205.88° en solución de ácido clorhídrico.

En 1895 Suter empleó una reacción, la cual fué de mucha utilidad en la detección de la cistina en las proteínas hidrolizadas. En esta reacción todo el nitrógeno se transforma a amoniaco, por la acción de un álcali caliente sobre la cistina, mientras que el azufre aparece como un precipitado negro de sulfuro, cuando el tratamiento alcalino es conducido en presencia de sales de acetato. Fué Morner quien finalmente aisló en 1899 la L-cistina de hojas de cuerno hidrolizadas en HCl por una técnica combinada de la metodología de Millon para la separación de la tirosina bajo

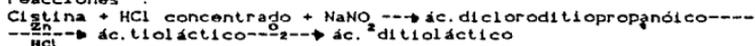
enfriamiento, seguida por una precipitación de cistina pura en acidificación del líquido nativo con ácido acético. La cistina así obtenida estaba libre de tirosina y esto proporcionó valores analíticos correctos.

Morner fue quien dió por asentada la existencia de modificaciones estereoisoméricas de la cistina, al observar diferentes valores de rotación óptica en sendas muestras de cistina obtenidas con diferentes condiciones hidrolíticas Baumann algunos años antes, en 1884, obtiene compuestos fácilmente oxidables al tratar la cistina con estaño y ácido clorhídrico, éstos compuestos tenían aproximadamente la misma composición elemental, pero propiedades muy diferentes. Baumann formuló la reacción oxidación-reducción, con la excepción de que designó erróneamente esta reacción entre cistina y lo que él nombró "cisteína".



Resultaba claro que para cuando Morner aisló la cistina, su estructura no era aún del todo comprendida.

La certeza de que tanto el nitrógeno como el azufre se encontraban en el carbono α fué cambiado por primera vez por Neuberg en 1902 y no fué sino un año más tarde que Friedmann estableció en forma más definida esta posibilidad por medio de la siguientes series de reacciones¹⁰:



Reacciones analíticas específicas

Un gran número de procedimientos gravimétricos, colorimétricos y titulométricos son utilizados durante la determinación de cistina a cisteína. Tales procedimientos dependen en parte de:

- a).- la capacidad de los grupos disulfuro de la cistina para experimentar un desproporcionado desdoblamiento con metales pesados y con ciertos agentes químicos.
- b).- la marcada labilidad del azufre de la cistina y la cisteína hacia álcalis e hidrazina.
- c).- las reacciones de oxido-reducción en que el grupo sulfhidrilo de la cisteína puede participar.
- d).- la propiedad que tiene el grupo sulfhidrilo para formar colores conjugados con varios reactivos y que pueden ser estimados por métodos colorimétricos o espectrofotométricos; la titulación del grupo sulfhidrilo puede llevarse a cabo a través de la aplicación de métodos yodométricos, acidimétricos y electrométricos.¹⁰

2.2 METIONINA

METIONINA

Nombres químicos

α -amino- γ -ácido metiltiolbutírico
 α -amino- γ -ácido metilmercaptobutírico
2-amino-4-ácido metiltiobutanóico

Nombres triviales

Metiona
Meonina

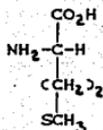
Fórmula empírica

$C_5H_{11}O_2NS$; C 40.25%, H 7.43%, O 21.45%, N 9.39%, S 21.48%

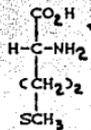
Peso molecular

149.22

Estructura y designación de estereoisómeros



L-Metionina



D-Metionina

Historia y aislamiento de fuentes naturales

Aunque la metionina fue descubierta por Mueller en 1922, podría decirse que la historia de este aminoácido comenzó a la par del descubrimiento de la cistina, en 1847. En 1848 cuando Flöitmann, trabajando en el laboratorio de Liebig descubrió la labilidad alcalina de la cistina; encontró que además del ácido sulfhídrico y el amoníaco, se producía un precipitado negro debido a la presencia de un grupo sulfuro. Este mismo precipitado se encuentra en la hidrólisis alcalina de las proteínas, pero en la época de Morner (1899), fue atribuida definitivamente a la presencia de cistina. No fue, sin embargo hasta 1902, cuando T.B. Osborne utilizó una técnica basada en aspectos cuantitativos, del

cual emergió un cuadro de la distribución de sulfuro en las proteínas. Osborne determinó dos cantidades para sus proteínas altamente purificadas: El azufre total, y lo que él llamó "azufre libre". Para la determinación de este último utilizó el método de Schulz. Los resultados a los que llegó Osborne lo tenían confundido, pues la cantidad total de azufre en la proteína no era lábil ante un medio alcalino, -medio siglo antes Fleitmann había observado el mismo fenómeno-. Osborne hizo la suposición natural de que la acción de un medio alcalino en el componente cistina de las proteínas no era cuantitativo. De los resultados de Osborne se encontró una forma de azufre orgánicamente libre, aparte del derivado de la cistina, en las proteínas, pero durante mucho tiempo esta interferencia fue ignorada o subestimada.

En 1921, Mueller notó que en las hidrólisis ácidas de proteínas se encontraba una sustancia la cual parecía ser esencial en el crecimiento de distintas bacterias; pensó en primera instancia en los aminoácidos conocidos hasta entonces: citina, tirosina, triptofano e histidina, pero descartó esta posibilidad al experimentar con ellos. Sin embargo, Mueller al utilizar sulfato de mercurio como precipitante, obtuvo un precipitado de azufre, el cual definitivamente no era cistina o cisteína (una reacción nitroprusida negativa), por lo que decidió estudiar esta observación. Al año siguiente anunció el descubrimiento de un nuevo sulfuro-aminoácido, utilizando la fórmula empírica $C_{11}H_{23}SN_2O_4$, considerándolo como un nuevo aminoácido. El azufre mostró ser completamente inerte a un medio alcalino caliente. Trabajos posteriores definieron que los cristales eran una mezcla de lo que finalmente fue llamado "Metionina", junto con fenilalanina. Posteriormente el nuevo compuesto fue purificado por Mueller obteniendo así una nueva fórmula empírica definitiva $C_5H_{11}SNO_2$; con rotación óptica a 20° de -7.2° en agua.¹⁰

Reacciones analíticas específicas

Diversos métodos titulométricos y colorimétricos son posibles para la determinación y detección de metionina, cuando se encuentra en una mezcla con otros aminoácidos. De los métodos de determinación se pueden citar los siguientes:

- a). - la determinación cuantitativa de los productos obtenidos de la degradación de metionina por demetilación reductiva con ácido hidroyódico, por la acción oxidativa de la ninhidrina.
- b). - la estimación directa del aminoácido por titulación con yodo o después de la oxidación con peróxido de hidrógeno.
- c). - la identificación de metionina sobre papel después de su separación cromatográfica de otros aminoácidos.¹⁰

3.0 DETERMINACION DE AMINOACIDOS MEDIANTE UN AUTOANALIZADOR DE AMINOACIDOS

La determinación cuantitativa de los aminoácidos de una proteína a menudo es de primordial importancia, ya que el análisis de aminoácidos nos puede proveer de evidencias de la pureza de una proteína al ser preparada o aislada; y ayuda a conocer la cantidad y la variedad de los aminoácidos presentes en ella. El análisis de aminoácidos es uno de los primeros pasos en la elucidación de la estructura química de la molécula de una proteína. Conocer la composición de la proteína es necesariamente una guía antes de comenzar el análisis estructural. En particular, la presencia o ausencia de ciertos aminoácidos (como cistina, cisteína y triptofano), influye decisivamente en la aproximación del estudio estructural. El análisis cuantitativo de los aminoácidos es usualmente esencial cuando los resultados al ser obtenidos en la elucidación de la secuencia de residuos de aminoácidos en péptidos aislados por fragmentación de la proteína madre, son ambiguos.¹³

Estudios en la naturaleza de las alteraciones conducidas por tratamientos químicos de una proteína pueden ser seguidos en todo momento por un análisis de aminoácidos. Un ejemplo de lo descrito anteriormente son los intentos que se llevan a cabo para modificar los llamados "sitios activos" de una enzima mediante el uso de reactivos selectivos.

Los ejemplos anteriormente descritos dan una idea de la importancia y conveniencia de llevar a cabo un análisis de aminoácidos con rapidez y una confiable exactitud. La facilidad del análisis incrementa en forma significativa el estudio de pequeños péptidos cuando se trata de definir en forma precisa la composición de una proteína.⁴

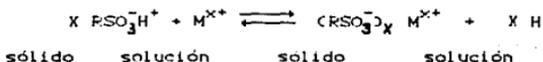
En la actualidad el uso de la cromatografía de intercambio iónico con resinas específicas (resinas de poliestireno sulfonadas), en columnas acopladas a bombas especiales que mantienen el flujo constante, así como dispositivos electromecánicos automáticos, han permitido el desarrollo de los llamados autoanalizadores de aminoácidos que realizan el análisis de los aminoácidos presentes en una proteína con increíble rapidez y una adecuada exactitud.

3.1 CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO.

Cromatografía es un término general aplicado a una gran variedad de técnicas de separación que se basan en la partición de la muestra por medio de una fase móvil, que puede ser un gas o un líquido, y una fase estacionaria, que puede ser un líquido o un sólido. El descubrimiento de la cromatografía generalmente se le acredita a Tswett, que en 1903 describió en sus trabajos el uso de una columna para separar los pigmentos verdes en hojas. El término "cromatografía" fue denotado por Tswett para describir las

zonas coloreadas móviles bajas de la columna. Por este tiempo el D.T. Day usó la cromatografía para la separación de fracciones de petróleo, pero fue Tswett quien primeramente reconoció e interpretó el proceso de cromatografía.

La cromatografía de intercambio iónico es un proceso mediante el cual se lleva a cabo un intercambio entre iones en solución y una base sólida insoluble que se carga al contacto con esta solución. La fase sólida que interviene en el intercambio iónico la constituyen generalmente resinas que pueden ser naturales o artificiales, y poseen carga que al interactuar con los iones de la fase líquida son retenidas por estas. Por consiguiente se puede decir que existen dos tipos de intercambio iónico: El intercambio catiónico y el intercambio aniónico. Un proceso de intercambio catiónico es ilustrado para el siguiente equilibrio.



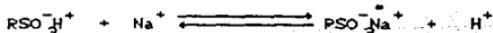
Donde M^{X+} representa un catión y R una parte de la molécula de la resina.

Un proceso análogo que envuelve un intercambio aniónico típico puede representarse de la siguiente manera.



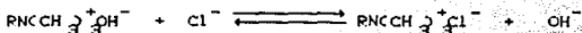
Donde A^{X-} es un anión.

La cantidad de iones atrapados por la resina está determinada por el contenido del electrolito de la solución que se encuentra en contacto con la resina. Por ejemplo, si una resina sulfónica es tratada con una solución de cloruro de sodio, la reacción de intercambio será la siguiente:



Donde R de nuevo representa una unidad de la molécula de la resina. Si la concentración de sal es alta, toda la resina es convertida a su forma sódica.

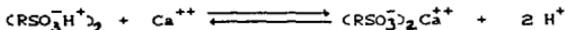
Similarmente, si en un intercambio aniónico la resina es tratada con cloruro de sodio concentrado, la reacción.



Es gradualmente favorecida, y la forma de cloruro de la resina predomina.

Cuando una unidad funcional de la resina es envuelta en

una reacción de intercambio con iones polivalentes, como cuando una resina sulfónica ácida es tratada con iones calcio, el equilibrio puede ser expresado de la siguiente forma.

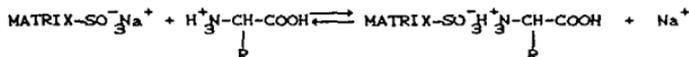


En el caso específico de análisis de aminoácidos por medio de un proceso de cromatografía de intercambio catiónico, la resina tiene carga negativa y el aminoácido es adicionado con un pH bajo, por lo que se encontrarán cargados positivamente. Las condiciones en la columna serán preparadas de tal manera que se formen un gradiente de pH, temperatura y fuerza iónica contrario a los iones.

Estas modificaciones inducen a que los aminoácidos alcancen su punto isoeléctrico y es en este momento en que los aminoácidos no interactúan con la resina de la columna y eluyen fuera de ésta.

El punto isoeléctrico es definido como el pH al cual todas las moléculas en solución carecen de carga neta, o su carga neta es igual a cero. El punto isoeléctrico de un aminoácido es función de los valores de pH de todos sus grupos ionizables. (En el inciso 1.3 de la unidad I, se han dado referencias ya con respecto al punto isoeléctrico).

El proceso de intercambio iónico puede representarse de la siguiente forma¹⁹:



3.2 ELEMENTOS ESENCIALES DE UN AUTOANALIZADOR DE AMINOACIDOS.

Los elementos esenciales de un analizador de aminoácidos se pueden observar en la figura III. La muestra conteniendo una mezcla de aminoácidos es colocada en un autoinyector, el cual lo carga sobre una columna que contiene una resina de intercambio catiónico. Los buffers, de diferente pH y fuerza iónica, son impulsados por bombas especiales a través de la columna para separar los diversos aminoácidos. La temperatura de la columna es controlada con precisión, este requisito es necesario para tener una separación eficiente.

El eluyente de la columna es mezclado con el reactivo ninhidrina, esta mezcla pasa a través de un baño de aceite a alta temperatura. En el baño de reacción, la ninhidrina se combina con los aminoácidos presentes en la solución eluyente para formar compuestos coloridos. La cantidad de estos compuestos coloridos es directamente proporcional a la cantidad de aminoácidos del eluyente.

Después de salir del baño de reacción la mezcla eluyente-ninhidrina es alimentada a un fotócolorímetro, donde la cantidad de cada compuesto colorido es determinado por la medida de la absorción de luz a dos longitudes de onda, 570 y 440nm.

El fotómetro tiene una terminal, la cual está conectada a dos canales de un registrador, un canal para una longitud de onda de 570nm y el otro canal para 440nm. La concentración de aminoácidos es registrada en una serie de picos. El tiempo de retención de los picos en la carta identifica a cada aminoácido; el área bajo la curva indica la cantidad de aminoácido presente. Mientras el análisis de aminoácidos es un instrumento comparativo, una calibración del mismo debe ser desempeñada antes de comenzar una serie de análisis introduciendo un estándar interno junto con la muestra para propósitos de comparación.

Después del análisis de cada muestra, la columna es regenerada por la adición a esta de una base fuerte por medio de bombas, seguida por un búffer de regeneración, que permiten que la columna esté lista para el próximo análisis.

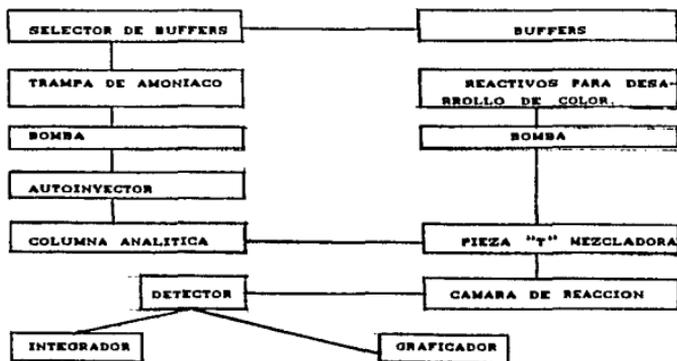


FIGURA 3. Elementos esenciales de un autoanizador de aminoácidos

9.3 ESTRUCTURA GENERAL DE LA RESINA DE UN AUTOANALIZADOR DE AMINOACIDOS

Las resinas utilizadas en los modernos analizadores de aminoácidos consisten en microesferas de poliestireno. Las

cadena de poliestireno son entrelazadas por la adición de grupos de divinilbenceno (DVB) y son sulfonadas para darle una carga negativa.

Las bases de poliestireno en las resinas de intercambio iónico están hechas por copolimerización de estireno y divinilbenceno (DVB). La estructura de la resina puede representarse como se muestra en la figura (4). Si el divinilbenceno no estuviera presente, las cadenas de poliestireno se liberarían y disolverían.

Estos materiales entrelazados son demasiado blandos para resistir las fuerzas de viscosidad generadas por la fuerza del búffer a través de la columna. Cuando el DVB es adicionado al estireno, los dos grupos funcionales reaccionan para entrelazar simultáneamente las dos cadenas de poliestireno. Esto hace más rígida a la cadena. Usualmente la rigidez o fuerza mecánica de la resina se da en términos de cantidad de DVB presente en ella.

La experiencia indica que el DVB contenido en las resinas de poliestireno debería de ser del 4% y preferentemente del 8%. Algunas manufacturas incluyen el porcentaje de DVB en las especificaciones de la resina. Por ejemplo, con "Durum AD-X4F", la X4 se refiere a un 4% DVB. En general, a medida que el porcentaje de DVB se incrementa, la porosidad de la resina decrece.

La selectividad de la base de poliestireno de la resina de intercambio iónico, semejante a Durum DA-XBF, es: $\text{HSO}_3^- > \text{ClO}_3^- > \text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{CN}^- > \text{HSO}_3^- > \text{NO}_2^- > \text{Cl}^- > \text{HCO}_3^- > \text{HCOO}^- > \text{OAc}^- > \text{OH}^- > \text{F}^-$. Otras resinas de intercambio aniónico pueden tener diferente selectividad.

Otros parámetros variables importantes utilizados en las resinas para análisis de aminoácidos son el tamaño de partícula y grado de sulfonación de la resina, los cuales nos dan la capacidad que tiene la resina para intercambiar muestra.

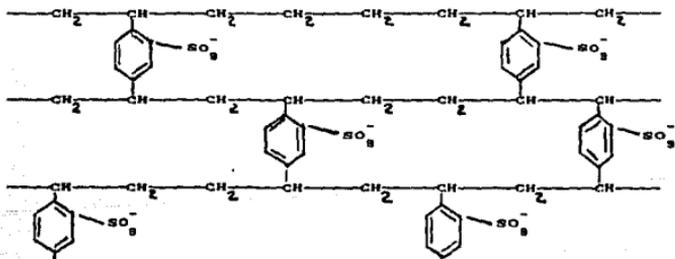


FIGURA 4. Estructura general de la resina de un autoanalizador de aminoácidos

3.4 SISTEMA DE DETECCION.

Los dos tipos más comunes de sistemas de detección utilizados en el análisis de aminoácidos son:

- a) detección mediante ninhidrina
- b) detección mediante fluorescencia

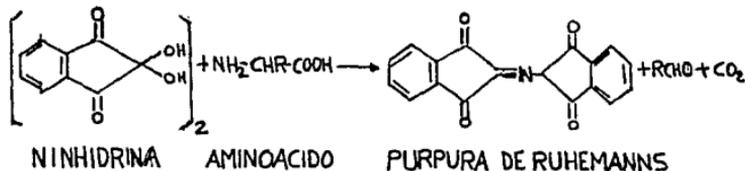
Los dos sistemas difieren en la sensibilidad de la detección, pues la detección por fluorescencia es más sensitiva que la detección mediante ninhidrina, pero su inconveniente radica en no ser sensible a los iminoácidos. El reactivo de detección es mezclado con el eluyente de la columna, y la mezcla pasa a través de un fluorómetro o un fotómetro, el cual analiza la cantidad de aminoácidos presentes en la muestra.

NINHIDRINA:

La reacción de ninhidrina (hidrato de hidrantina) con un aminoácido y con iminoácidos se muestra en la figura 5. La ninhidrina es un fuerte agente oxidante y produce la determinación oxidativa del grupo α -amino, liberando amoníaco, monóxido de carbono y aldehído con cadenas pequeñas de átomos de carbono, además de una forma reducida de ninhidrina-hidridantina.

El amoníaco, a la sazón reacciona con la hidridantina y una molécula de ninhidrina para producir una substancia color púrpura conocida como púrpura de Ruhemann. Esta substancia púrpura tiene una absorbancia máxima alrededor de los 570 nm, y es proporcional a la cantidad de grupos α -amino presentes en la muestra.

Es importante que la hidridantina esté presente en la detección para prevenir la reacción de la ninhidrina con los iminoácidos. Esta hidridantina reduce la cantidad de púrpura de Ruhemann formada en la reacción con los iminoácidos, que no poseen grupos α -amino libres. El producto es un compuesto amarillo brillante que es monitoreado a 440 nm. La medición a cualquier longitud de onda por debajo de 440 nm. puede dar una alta respuesta, pero una parte significativa de esta respuesta puede ser debida a la absorbancia de un compuesto ninhidrina positivo falso y por tanto la cuantificación de la cantidad de iminoácidos presentes en la muestra no resulta la correcta.*



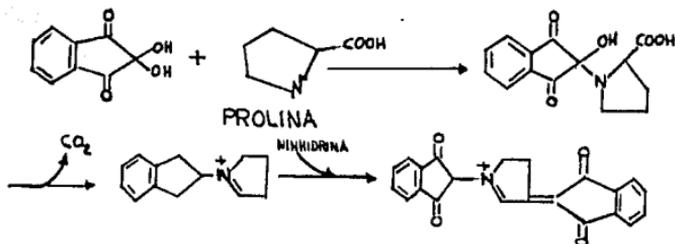


FIGURA 5. Reacción de la ninhidrina con los aminoácidos e iminoácidos.¹⁴

Para poder ser analizada la cantidad de color púrpura de Ruhemann formada al reaccionar la ninhidrina con los aminoácidos, la muestra es pasada a través de un espectrofotómetro, el cual tiene como principio teórico de su funcionamiento la ley de Lambert-Beer, que define la relación entre la absorbancia o transmitancia y la concentración molar, estas relaciones se encuentran dadas por las siguientes funciones:

$$A = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right) = \log_{10} \left(\frac{100}{T} \right) = Ecb$$

Donde:

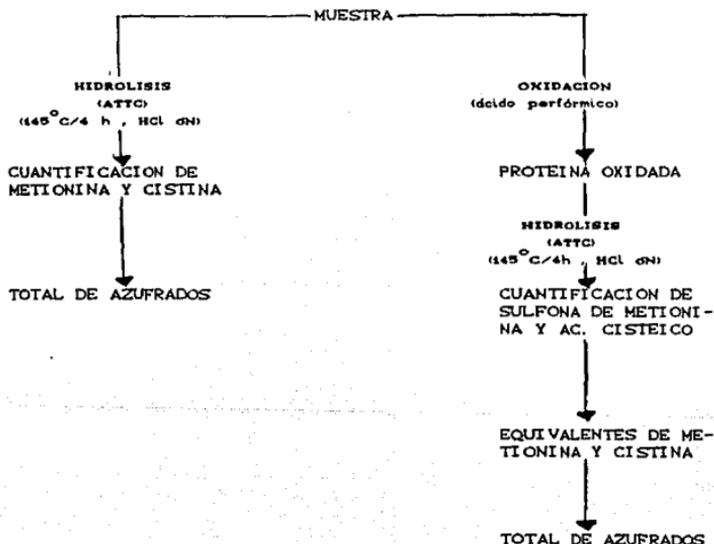
- A = absorbancia
- T = transmitancia
- I_0 = intensidad de la luz incidente
- I = intensidad de la luz transmitida
- E = absorbancia molar ($\text{dm}^2/\text{mol cm}$)
- c = concentración molar (mol/dm^3)
- b = trayectoria (cm)

La ley de Lambert-Beer es una relación lineal entre la concentración y la absorbancia. En el análisis de iminoácidos la relación es válida solamente para 1.8 unidades de absorbancia aproximadamente. Dicha aproximación de 1.8 unidades de absorbancia se ve mermada al utilizar fotómetros que tienen por principio la desviación en el rayo de luz incidente, ya que causan errores significativos.¹⁵

IV PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

La técnica utilizada durante el procedimiento experimental se muestra en el diagrama de trabajo. Las muestras, seleccionadas de acuerdo a su contenido proteínico fueron analizadas por dos técnicas diferentes. Una muestra de los alimentos fue oxidada con ácido perbórico seguida de una hidrólisis corta (ATTC) con ácido clorhídrico 6N, y posteriormente se determinó el producto de la hidrólisis mediante un autoanizador de aminoácidos. A otra muestra del mismo alimento se le aplicó una hidrólisis corta (ATTC) directa sin oxidación, y posteriormente se procedió a determinar aminoácidos azufrados en la muestra por el mismo método antes descrito.

1.0 DIAGRAMA DE TRABAJO



1.1 MUESTRAS

Las muestras de experimentación fueron seleccionadas al azar, tomando en cuenta el contenido de proteína presente en ellas, esto se hizo para tener variedad en las muestras. Con éstas muestras se formaron tres grupos que se clasificarán de la siguiente manera:

- Grupo I: muestras con alto contenido de proteína (>85%).
- Grupo II: muestras con contenido intermedio de proteína (25-85%).
- Grupo III: muestras con bajo contenido de proteína (<15%) y alto contenido de carbohidratos.

De acuerdo a cada grupo las muestras son las siguientes:
Grupo I: Aislados Proteínicos

MUESTRA	% PROTEINA
Caseína	91.10
Lisozima	88.00
Gelatina	98.33

Grupo II: Concentrados Proteínicos

Huevo desengrasado	81.30
Proteína de ajonjolí	59.57
Harina de soya desengrasada	45.45

Grupo III: Harinas de cereales procesados

Harina de trigo	11.44
Harina de arroz	9.01
Harina de maíz nixtamalizado	9.59

Las muestras se molieron finamente, de tal manera que pasarán por una malla de 0.5 mm y se colocaron en envases herméticos para su subsecuente análisis.

1.2 OXIDACION

Esta metodología propuesta inicialmente por Moore en 1963, tiene por objetivo la oxidación de los aminoácidos azufrados presentes en la muestra.

Material :

Tubos de cultivo c/tapón de baquelita y cubierta de

teflón.
Balanza analítica Mettler
Agitador magnético
Baño de hielo
Refrigerador
Rotavapor Buchi modelo R

Reactivos :

Acido fórmico al 88%
Fenol (ácido fénico)
Peróxido de hidrógeno al 30%

Preparación del ácido Perfórmico :

A un total de 0.5 ml de peróxido de hidrógeno al 30% se le adiciona 4.4 ml de ácido fórmico al 88% y 25 mg de fenol . La mezcla es homogenizada por medio de un agitador magnético, dentro de un baño de hielo durante 30 minutos e inmediatamente utilizada en la oxidación de la muestra.

Técnica :

Dentro del tubo de cultivo se pesan las muestras correspondiente al peso de 50 mg de proteína cruda y se adicionan 5 ml de ácido perfórmico recién preparado, se coloca esta mezcla en el recipiente con el hielo y se procede a homogenizar con ayuda de un agitador magnético a 200 rpm., por espacio de 15 minutos. La muestra se coloca dentro del refrigerador a una temperatura de 0°C durante 18 horas, pasado este tiempo se neutraliza el ácido perfórmico remanente adicionando aproximadamente 0.85 g de bisulfito de sodio y se coloca la mezcla en agitación durante 15 minutos. Finalmente a la muestra oxidada se le elimina el exceso de ácido perfórmico que pudo haber quedado sin neutralizar, por medio de un rotavapor a una temperatura constante de 60-65°C. Después del procedimiento anteriormente descrito, se somete a la muestra a una hidrólisis similar a la de las muestras no oxidadas.

4.3 HIDROLISIS

En esta parte del procedimiento se llevó a cabo una hidrólisis ácida corta (aumento de temperatura , tiempo corto) (ATTC). Esta hidrólisis corta fue propuesta inicialmente por Kaiser y colaboradores en 1974, y tiene por objetivo la protección de metionina presente en la muestra.

Material :

Tubos de cultivo c/ tapón de baquelita teflonada

Digestor Tecator modelo 20/40
Rotavapor Buchi modelo R

Reactivos :

HCl 6N
HCl 0.1N
Nitrógeno de alta pureza

Técnica :

Dentro del tubo de cultivo se pesa la muestra equivalente a 50 mg de proteína cruda y se mezcla con la cantidad de HCl 6N necesaria para su hidrólisis completa. Lo anterior se determina de acuerdo a las siguientes relaciones:

$$A = \frac{50 \times 100}{\%P}$$

$$B = \frac{4 \times 100}{\%P}$$

A = Cantidad de muestra en mg
B = Cantidad de HCl 6N
%P = Porcentaje de proteína en la muestra

Una vez colocada la mezcla de muestra y ácido en el tubo de hidrólisis, se le insufla nitrógeno y se coloca dentro del digestor a reflujó por un lapso de 4 hs. a una temperatura constante de 145°C.

1.4 CUANTIFICACION

Material :

Papel filtro Watman del número 1
Membrana Milipore 1PG HVLP 047 00
Potenciometro Corning con electrodo de combinación
Autoanalizador de aminoácidos LKB 4151 ALPHA PLUS
Agitador magnético
Micropipeta Gilson de 100 microlitros de capacidad

Reactivos :

Norleucina 2.5 micromoles/ml
HCl 0.1N
NaOH 5N
Agua desionizada
Buffer de citrato de sodio 2M, pH 2.2 (buffer de carga)
Buffer de fosfatos de pH 4

Estandar de aminoácidos de 2.5 micromoles de cada uno de los aminoácidos por mililitro de solución (Sigma)
 Acido cisteico (Sigma)
 Metionina sulfonada (Sigma)

Preparación del estandar de Norleucina

Un total de 32.8 mg de norleucina se pesan dentro de un matraz aforado de 100 ml. La norleucina se disuelve adicionándole HCl 0.1N y se lleva al aforo con el mismo ácido. Cada mililitro de esta solución contiene 2.5 micromoles de norleucina.

Condiciones controladas en el autoanalizador de aminoácidos

Las condiciones de funcionamiento del autoanalizador de aminoácidos, así como los programas utilizados durante el análisis de las muestras se dan a continuación:

Muestras sin oxidación :

Características de los buffers

Buffer	pH	Molaridad
1	3.20	0.2M
2	4.25	0.2M
3		
4		
5	6.45	1.2M
6	NaOH	0.4M

Programa utilizado para el análisis de muestras sin oxidar

Paso	temp (°C) de columna	tiempo (min.)	Buffers							
			Nin.	1	2	3	4	5	6	
1	55	4.0	X	X						
2	55	0.0	X	X						
3	55	1.0	X	X						
4	55	13.0	X		X					
5	85	16.0	X					X		
6	85	4.0	X						X	
7	85	6.0	X	X						
8	55	18.0	X	X						
9	55	5.0	X	X						
10	55	1.0	X	X						

Nin. = Ninhidrina

Condiciones de trabajo del autoanalizador

	Buffer	Nin.
Flujo (ml/h)	35	25
Presión (bar)	45	15

temperatura del baño de reacción 135°C

Muestras con oxidación :

Características de los Buffers

Búffer	pH	Molaridad
1	2.60	0.2M
2	3.35	0.2M
3	4.25	0.2M
4		
5	6.45	1.2M
6	NaOH	0.4M

Programa utilizado para el análisis de muestras oxidadas

Paso	temp (°C) de columna	tiempo (min.)	Nin.	Búffers					
				1	2	3	4	5	6
1	60	2.5	X			X			
2	60	0.0	X			X			
3	60	12.5	X	X					
4	62	12.0	X	X					
5	67	10.0	X					X	
6	65	3.0	X						X
7	65	0.0	X			X			
8	60	22.0	X			X			
9	60	5.0	X			X			
10	60	1.0	X			X			

Condiciones de trabajo del autoanalizador

	Búffer	Nin.
Flujo (ml/h)	25	25
Presión (bar)	45	15

Temperatura del baño de reacción 135°C

Técnica :

Una vez que la muestra ha sido hidrolizada, el contenido hidrolizado del tubo se transvasa cuantitativamente a un matraz de bola y ahí mismo se agrega 5 ml del estándar de norleucina. Por medio del rotavapor se lleva a sequedad 2 veces, lavando el residuo cada vez con agua caliente entre secada y secada, y a la tercera lavada se concentra a un volumen menor de 25 ml (aprox. 10 ml), para después filtrarlo a través de papel filtro doble de poro cerrado con ayuda de vacío, posteriormente se ajusta el pH a un valor de 2.2 y finalmente se afora a 25 ml. Del aforo anterior se toma una alícuota y se diluye al doble con buffer de carga. Se filtra a través de una membrana millipore y se inyecta una alícuota de 30 microlitros al autoanalizador.

V RESULTADOS Y DISCUSION

1.0 OXIDACION

La metodología utilizada para la oxidación de las muestras no presentó problemas para muestras con un contenido alto e intermedio de proteína, en cambio para muestras con un contenido bajo de proteína mostró algunos inconvenientes, debido al alto nivel de carbohidratos, éstos tendieron a gelificarse impidiendo así el contacto de la mezcla oxidante con la totalidad de la muestra por oxidar. En estos casos se procedió a agregar lentamente el ácido per fórmico a la muestra, de tal forma que la humectase en su mayoría, evitándose así el apeizamiento de la muestra, en seguida se agregó la totalidad del ácido, procediendo a agitarse durante 20 minutos para lograr una mejor homogenización. La utilización de una mayor cantidad de ácido per fórmico para corregir éste inconveniente no era aconsejable, ya que posteriormente podrían existir problemas para eliminar el exceso del ácido, además de que una cantidad mayor de ácido no necesariamente implica una mayor recuperación de aminoácidos azufrados²¹, por lo cual esto no se llevó a cabo.

1.1 CUANTIFICACION

Los cromatogramas típicos obtenidos de un análisis de aminoácidos se muestran en las figuras 5y6, presentan los resultados de la evaluación de metionina y cistina después de una hidrólisis directa, así como después de una hidrólisis previa oxidación.

El cuadro IV muestra los resultados de las determinaciones de metionina y cistina en los tres grupos de muestras trabajadas, con y sin previa oxidación a la hidrólisis.

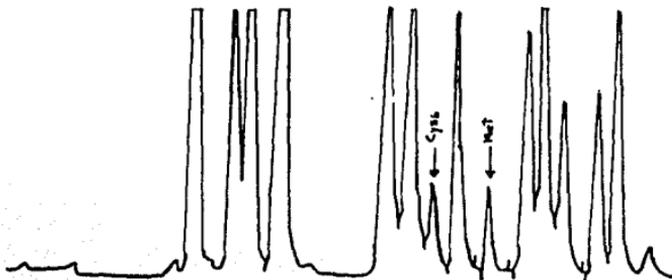


Figura 5. Aminograma de una muestra sin oxidar.

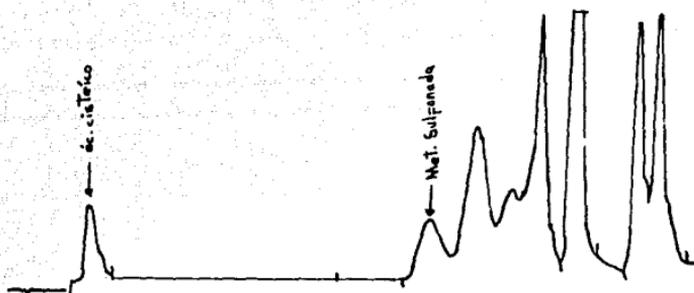


Figura 8. Aminograma de una muestra previa oxidación.

Como se puede observar, en los resultados tanto de metionina como cistina con oxidación, sólo dos de sus valores son ligeramente inferiores a los resultados de muestras sin oxidación (caseína, lisozima y Huevo deseng. y H. de arroz respectivamente) la lisozima en el análisis de la cistina, dio un valor muy superior para la muestra sin oxidar que para la oxidada. Los demás resultados muestran una mejoría en la cuantificación de los aminoácidos azufrados, al ser oxidada la muestra. Aunque en principio los valores de recuperación de metionina y cistina en muestras oxidadas fue satisfactorio, esto no implicaba la exactitud y confiabilidad de la técnica empleada, por lo que posteriormente se llevó a cabo un análisis estadístico con estos resultados. Mostrando que aunque los valores para muestras oxidadas eran mayores a los valores de muestras no oxidadas, no existía diferencia significativa alguna en los valores de la determinación de cistina, pero no así en los resultados de la cuantificación de metionina, los cuales sí presentaban diferencia significativa entre las técnicas sin y con oxidación.

CUADRO IV Contenido de metionina y cistina en muestras con y sin oxidación

MUESTRAS	METIONINA (mg/gN)		CISTINA (mg/gN)	
	S/oxidación	C/oxidación	S/oxidación	C/oxidación
Caseína	136.4	134.6	72.6	92.4
Lisozima	84.8	70.9	860.2	239.0
Gelatina	26.5	44.5	0	0
Huevo deseng.	112.2	182.8	218.4	147.2
Harina de soya	48.5	80.4	112.1	219.2
Prot. de ajonjolí	119.8	174.2	80.2	111.5
Harina de trigo	43.7	85.0	125.5	173.2
Harina de arroz	82.10	110.0	114.8	110.0
Maíz nixtamal.	63.3	118.0	107.9	155.3

El cuadro V muestra los valores obtenidos durante el desarrollo experimental de muestras sin oxidación, comparados contra valores registrados en la bibliografía. Como puede observarse se encuentran valores experimentales como los de harina de soya, proteína de ajonjolí y harina de trigo, que difieren poco del rango establecido en los valores bibliográficos reportados hasta la fecha, sin embargo en este mismo cuadro se encuentra un valor de huevo desengrasado experimental ligeramente superior en comparación con su valor bibliográfico, pero debido a que los alimentos son materiales biológicos complejos, se piensa que un rango puede ser aconsejable y que el material ocupado es una variedad con un alto contenido en este aminoácido.

CUADRO V Contenido de aminoácidos azufrados experimentales comparados con datos bibliográficos

MUESTRA	METIONINA ^a mg/gN	CISTINA ^a mg/gN	METIONINA ^b mg/gN	CISTINA ^b mg/gN
Caseína	136	73	41-156	85
Lisulina	84	860	104	355
Osalina	26	0	41-60	R-12
Huevo deseng.	112	218	181-249	113-189
Harina de soya	48	112	53-114	51-114
Prot. de ajonjolí	115	80	119-248	68-144
Harina de trigo	44	126	54-113	109-136
Harina de arroz	82	115	68-247	48-179
Maíz nixtamal.	63	105	53-175	38-108

a = promedio de las determinaciones por duplicado

b = FAO contenido de aminoácidos y datos sobre las proteínas(1970)

* = datos sin oxidación previa

R = residuos

1.1.4 METIONINA

El contenido de metionina de los tres grupos de muestras fue analizado después de una hidrólisis corta (ATTC) con HCl 6N y una oxidación con ácido per fórmico, como también después de una hidrólisis corta directa bajo una atmósfera de nitrógeno. Cada ejemplo fue analizado por el mismo método y en las mismas condiciones de trabajo y el porcentaje de recuperación (%R) fue calculado por la siguiente relación.

$$\%R = \frac{\text{Metionina oxidada}}{\text{Metionina no oxidada}} \times 100$$

Los resultados individuales y %R de cada muestra se presentan en los cuadros VI y VII, donde se observa que si existe una mejor recuperación cuando se lleva a cabo una previa oxidación para protección de la muestra. Sin embargo para confirmar lo anterior se procedió a realizar un análisis estadístico entre los dos métodos (sin y con oxidación), aplicando una prueba de "t" apareada. Esta prueba nos indica que si existe diferencia significativa (DS) entre los métodos. Para el caso del análisis estadístico por grupos, tenemos el cuadro VII, que muestra diferencia significativa entre muestras oxidadas y no oxidadas, en los grupos II y III, pero no así en el grupo I. El grupo I (alto contenido de proteína), es el que presenta el mas bajo y variante porcentaje promedio de recuperación (%R) de metionina (118%), por ejemplo caseína y lisozima dieron un valor mayor en muestras no oxidadas, de tal manera que la variación que presenta este grupo es lo que provocó que no hubiese diferencia significativa en él. En muestras con un contenido intermedio de proteína se presenta una recuperación buena y uniforme de metionina, pues tiene un %R de 167%, esta tendencia de recuperación se observa por igual en muestras con un bajo contenido de proteína (alto contenido de carbohidratos) con un %R de 172.

Las muestras de caseína y lisozima que contienen un alto porcentaje de proteína (91% y 88% respectivamente), no muestran diferencia en la recuperación de metionina, cuando comparamos la recuperación después de una hidrólisis directa, contra la recuperación después de una hidrólisis con oxidación previa (98% y 84% respectivamente). Este resultado puede deberse a lo siguiente: 1) que la hidrólisis directa tanto de caseína como de lisozima, de hecho da la mayor recuperación posible, 2) la metionina no se separó completamente de la proteína madre, o 3) el procedimiento de oxidación no se llevó a cabo correctamente y quedó incompleta la oxidación de metionina. Una separación incompleta de la metionina de la proteína madre es posible, ya que por ser muestras que necesitan poca cantidad de HCl para su hidrólisis, es posible que al neutralizar el ácido per fórmico de la oxidación, la cantidad de bisulfito de sodio agregada fuese mayor de lo necesario y quedase bisulfito residual que influyera en la hidrólisis de estas muestras, al neutralizar parte del HCl que las hidrolizaría. Esto solo puede suponerse pues la otra muestra del mismo grupo (gelatina) no sigue la tendencia de la caseína y la lisozima.

Las muestras con un contenido intermedio y bajo de proteína, muestran una recuperación uniforme de metionina, sin embargo el grupo II fue el grupo de muestras que presentaron menos problema al trabajar, ya que no mostraron gelificación como las muestras del grupo III, ni requieren de poca cantidad de HCl para su hidrólisis como las del grupo I.

Se ha reportado que, una de las razones de pérdida de metionina durante la hidrólisis puede deberse a la presencia de carbohidratos en la muestra como lo señala Spindler en su análisis de los trabajos de Smith et al., 1965; Hoppe, 1971; Robel, 1973, sin embargo existen trabajos que concluyen que para obtener una buena recuperación de metionina en muestras ricas en

carbohidratos, es necesaria una oxidación con ácido performico antes de hidrolizar la proteína²¹.

Los resultados presentados en los cuadros V y VI, confirmaron que para la máxima recuperación de metionina es necesario oxidarla a sulfona y posteriormente utilizar una hidrólisis corta (ATTC) para su liberación de la proteína madre.

CUADRO VI Resultados del porcentaje de recuperación (%R) de metionina, cistina y aminoácidos azufrados totales

GRUPO	MUESTRA	METIONINA (NR)	CISTINA (NR)	AZUFRADOS TOT (NR)
I	Caseína	98	127	109
	Lisozima	84	27	98
	Gelatina	108	100	109
II	Huevo deseng.	107	97	101
	Harina de soya	105	125	108
	Prot. de ajonjolí	109	139	107
III	Harina de trigo	104	137	108
	Harina de arroz	184	95	112
	Maíz nixtamali.	189	147	102
Valor de "t" calculada ($\alpha = 0.05$ y $gl = 8$)		9.28 (DS)	0.66 (ND)	0.18 (ND)
Promedio de recuperación + ESM		102 ±19.5	110 ±17.4	102 ±16.8

(DS) = diferencia significativa

(ND) = no diferencia

ESM = error estándar de la media

1.1.2 CISTINA

Los resultados individuales y %R de cistina se muestran en los cuadros IV y VI. Después de un tratamiento oxidativo e hidrólisis se observa que las muestras tratadas de esta forma no presentan diferencia significativa alguna, comparándolas con muestras sin oxidar. De la misma forma que para la metionina, se utilizó una prueba de "t" apareada para analizar las muestras. Al no encontrarse diferencia significativa en los métodos en forma global, se procedió a analizar los métodos, pero ahora desglosándolos por grupos (cuadro VI). Se encontró que ninguno de los tres grupos presentó diferencia significativa entre sus resultados.

Aunque la evaluación de la cistina no puede realizarse en forma general (por los valores variantes que presenta), sí se puede observar que en cada grupo existe una tendencia a una mejor recuperación con una previa oxidación. En muestras con un alto contenido de proteína, la caseína presenta un %R de cistina de 127, de la misma forma en el grupo de intermedio contenido de proteína la harina de soya y la proteína de ajonjolí presentan un %R de 125 y 139 respectivamente. El grupo de bajo contenido de proteína (a excepción de la harina de arroz) es el que presenta la mejor y más uniforme tendencia de recuperación (con un %R de 137 y 147 respectivamente).

La evaluación cromatográfica de la cistina (como ác. cisteico), se dificultó debido a que el ác. cisteico tiene un tiempo de retención corto y salía rápidamente de la columna analítica, de tal manera que en algunos cromatogramas salía a la par con respuestas ajenas a la de este ácido (Moore S. en 1962 encontró que residuos de agente reductor como el bisulfito de sodio pueden afectar la hidrólisis y también la determinación cromatográfica del ác. cisteico al neutralizar HCl de hidrólisis y formar compuestos que tienen un tiempo de retención semejante al del ác. cisteico).

CUADRO VII Prueba de "t" apareada por grupos ($\alpha = 0.05$ y $gl = 8$)

GRUPO	MUESTRA	METIONINA		CISTINA		AZUFRADOS TOT.	
		"t" c	NR	"t" c	NR	"t" c	NR
I	Caseína	0.10	110	0.88	91	0.91	104
	Lisozima	(ND)	ESM	(ND)	ESM	(ND)	ESM
	Gelatina		±31.8		±36.5		±48.1
II	Huevo desengra.	4.09	107	1.72	133	2.06	149
	Harina de soya	(DS)	ESM	(ND)	ESM	(ND)	ESM
	Prot. de ajonjolí		±1.1		±26.9		±31.1
III	Harina de trigo	5.85	172	0.48	124	2.88	148
	Harina de arroz	(DS)	ESM	(ND)	ESM	(ND)	ESM
	Maíz nixtamali.		±23.0		±19.5		±18.8

ESM = error estándar de la media

1. 2. 3 AMINOACIDOS AZUFRADOS TOTALES

Un análisis de aminoácidos azufrados totales, se llevó a cabo opcionalmente y los valores de recuperación se pueden observar en el cuadro V. Los resultados observados para muestras oxidadas no muestran diferencia significativa alguna, comparados con los valores de los resultados de muestras que no fueron oxidadas antes de la hidrólisis. Un análisis estadístico por grupos, tampoco muestra diferencia significativa alguna en estos (cuadro VII).

Si nos remontamos a la discusión de los resultados en la cuantificación de cistina, encontraremos fácilmente una respuesta al por qué de los resultados del análisis de azufrados totales, pues como se pudo constatar anteriormente, los resultados de recuperación de cistina no se pueden analizar en forma general, debido a la gran variación que presentan algunos de sus valores y como éstos no presentaron diferencia significativa ni en forma global, ni por grupos, es posible suponer que éstos resultados influyeron al momento de analizar estadísticamente el total de aminoácidos azufrados de la muestra.

VI CONCLUSIONES

Los resultados demuestran que es posible la recuperación de metionina y cistina (principalmente metionina), mediante el uso de una técnica que integre la hidrólisis corta (ATTC) con la oxidación de la muestra con ácido per fórmico.

Debido a que la recuperación de cistina solamente se pudo observar en forma individual en cada grupo, es necesario que la concentración de bisulfito de sodio agregada, se encuentre en cantidades adecuadas para que no tenga repercusión durante la hidrólisis de la proteína (principalmente en muestras que necesitan poca cantidad de HCl para su hidrólisis).

Para lograr la máxima cuantificación posible de metionina en muestras con un alto contenido de proteína, no es necesario oxidarla antes de la hidrólisis.

La hidrólisis corta (ATTC) resultó de gran utilidad, sobre todo en casos de análisis de proteínas en los cuales se requiera de una aceptable confiabilidad y una buena ganancia de tiempo.

Este método para la determinación de aminoácidos azufrados resulta adecuado para llevar a cabo la máxima cuantificación de metionina en muestras con un contenido intermedio y bajo de proteína, como son concentrados protéicos y harinas de cereales.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

VII BIBLIOGRAFIA

1. Andrew, P.; Condan, D. and Baldar, A. Amino Acid Determinations in feed constituents using the LKB 4150 Alpha Amino Acid analyzer. LKB Blochrom Ltd. Cambridge Science Park, Milton Road. Cambridge CB4 4BA PCN 27-E01-7/83. (1983).
2. Andrew, P. and Baldar, A. Amino acid analysis of feed constituents. Science Tools. 32:44-48 (1985).
3. Badui D. Química de los alimentos. Alhambra Universidad. Pp 105-158. (1981).
4. Barret, G. Chemistry and biochemistry of the amino acids. Chapman and Hall, 733 third Avenue, N.Y. 10017. Pp 1-25, 297-399, 415-482. (1985).
5. Bridgen, W. The LKB instruments Journal. J. Science Tools. 24:1-5. (1977).
6. Colowick, S. and Kaplan, N. Methods in enzymology. Academic Press, N.Y. Pp 819-824. (1963).
7. Fox, S. and Foster, J. Introduction to protein chemistry. New York: Wiley. Pp 5-75. (1957).
8. Hamilton, P. Ion exchange chromatography of amino acids a single column, high resolving fully automated procedure. Anal. Chem. 35:2055-2061. (1963).
9. Hill, R. Hydrolysis of proteins. Adv. Prot. Chem. 20:37-41. (1965).
10. Jeece P. Greenstein and Milton Winitz. Chemistry of the amino acids. John Wiley and Sons Inc. Pp 1879-2140. (1981).
11. Johnson, E. and Stevenson, R. Basic Liquid Chromatography. Varian. 811 Hansen Way, Palo Alto California. Pp 94-303. (1978).
12. Khayat, A. et al. Quantitative determination of amino acids in food by High-pressure Liquid Chromatography. Food Technology. 36:48-50. (1982).
13. Kopple, K. Peptides and amino acids. W. A. Benjamin, INC. Pp 124-130. (1986).
14. LKB Blochrom Ltd. LKB 4151 Alpha Plus Manuals. Cambridge Science Park. (1988).
15. Lucas, B. and Sotelo, A. Amino acids determination in pure proteins, Food and feeds using two diferent acid hydrolysis. Methods. Anal. Biochem. 123:349-356. (1982).

16. Moore, S. On the determination of cystine and Cysteic Acid. *J. Biol. Chem.* 236:236-237, (1970).
17. Roach, D. and Gehrke, C. The hydrolysis of the proteins. *J. Chromatog.* 52:393-404, (1970).
18. Schmidt, L. The chemistry of the amino acids and proteins. Charles C. Thomas, Pp 3-40, (1944).
19. Skoog, D. and West, D. Principles of the instrumental analysis. Holt, Rinehart and Winston, Inc. Pp 624-628, (1984).
20. Slump, P. and Schreuder, H. Oxidation of the Methionine and Cystine in food treated with Hydrogen peroxide. *J. Sci. Food Agric.* 24:657-661, (1973).
21. Spindler, M.; Stadler, E. and Tanner, H. Amino acids analysis of the feedstuffs : determination of the Methionine and Cystine after oxidation with Performic Acid and Hydrolysis. *J. Agric. Food Chem.* 32:1366-1370, (1984).
22. Technicon Instruments Corporation. NC-2P and TSM operations Manuals. Tarrytown, N. Y. (1973).
23. Tood, J.; Marable, N. and Kehrberg, N. Methionine Sulfoxide Determination After Alkaline Hydrolysis of the amino acids Mixtures, Model Protein System, Soy Products and Infantile Formules. *J. Food Sci.* 40:1547-1551, (1984).
24. Williams, A.; Hewytt, D. and Cockburn, J. A collaborative study on the determination of Cyst(e)ine in Feedingstuffs. *J. Sci. Food Agric.* 30:469-473, (1979).