

Prática – Análise qualitativa de aminoácidos e proteínas

INTRODUÇÃO

Aminoácidos

20 aminoácidos (AAs) padrões. Todos possuem uma cadeia principal composta por um grupo amina, um grupo carboxílico e um átomo de hidrogênio ligados a um carbono C alfa. Além disso, possuem uma cadeia lateral formada por um grupo variável designado R ligado ao C alfa.

Todos, excetuando-se a glicina, possuem um carbono assimétrico que implica na existência de estereoisômeros. Uma solução de um dos estereoisômeros de cada par gira o plano da luz polarizada para a esquerda ou direita, (-) ou (+), respectivamente.

São classificados em D ou L, mediante comparação da orientação dos quatro grupos substituintes do carbono assimétrico (configuração absoluta) em relação aos compostos de referência, D- e L-gliceraldeído.

Todos os AAs encontrados nas proteínas são isômeros L. Alguns D-AAAs são encontrados na matéria viva (parede celular das bactérias, toxinas e em certos antibióticos).

Os grupos Rs conferem a cada um dos AAs propriedades específicas, as quais podem depender do pH da solução. Baseado na interação com a água (pH 7,0), podem ser classificados em polares, apolares, aniônicos e catiônicos. De acordo com a estrutura química em ácidos, básicos, alifáticos ou aromáticos.

Os aminoácidos existem como moléculas dipolares (zwitterion), anfóteras, se comportam como ácido e base simultaneamente, quando em solução aquosa a pH 7,0.

Os grupos R podem conter ácidos (carboxílico) ou bases (amina) adicionais. A magnitude das cargas elétricas dos aminoácidos varia com o pH e serve como princípio nas técnicas de separação e análise de misturas de aminoácidos (cromatografia e eletroforese).

Peptídeos

Dois AAs podem unir-se através da reação entre os grupos amina e carboxílico pertencentes a cada um dos AAs, resultando em uma ligação peptídica. Várias ligações peptídicas resultarão na formação de grandes cadeias poliméricas. Se forem menos de 100 resíduos de AAs podem ser chamadas de peptídeos.

Como os AAs, os peptídeos comportam-se como ácidos e bases. Entretanto, nestes últimos, apenas os grupos NH_2 e COOH terminais da cadeia principal e os grupos ácidos e básicos das cadeias laterais estão livres.

Alguns peptídeos apresentam uma marcante atividade biológica (hormônios e toxinas), associada à sequência de aminoácidos.

Proteínas

As proteínas são as macromoléculas mais abundantes, representando mais da metade do peso seco das células.

São classificadas de acordo com a função biológica (anticorpos, hormônios, transportadores, enzimas, estruturais, etc.).

São classificadas também de acordo com sua forma: globulares (conformação tridimensional, solúveis em água: hemoglobina, imunoglobulinas e enzimas), de membrana (conformação variada com regiões hidrofóbicas expostas) e fibrosas (actina e miosina, pouco solúveis: queratina, colágeno, seda).

Proteínas distintas possuem composição de AAs diferentes. A função das proteínas é especificada por sua estrutura tridimensional (terciária ou quaternária).

Proteínas homólogas (de origem ancestral comum) de espécies próximas possuem composição de AAs muito semelhantes.

Podem ser hidrolisadas em solução aquosa, ácida ou básica com aquecimento por várias horas. Podem ser oligoméricas, mais de uma cadeia polipeptídica (hemoglobina).

Podem ser separadas de moléculas menores como glicose e sais apenas por diálise.

Podem ser separadas de outras proteínas por métodos cromatográficos como filtração em gel (massa molecular) e troca iônica (carga dos aminoácidos).

Realizando os testes que se seguem, algumas das propriedades características dos aminoácidos e das proteínas podem ser observadas. Você terá como amostras gelatina, albumina, tirosina e glicina na concentração de 1%.

- **Soluções-problema:** Soluções de aminoácidos e proteínas sempre na concentração de 1% (1 g/100 mL de água ou, no caso da tirosina, por problemas de solubilidade, 1 g/100 mL de HCl 1 M) – 5 mL de cada solução.

1. colágeno
2. tirosina
3. arginina
4. fenilalanina
5. glutamato
6. albumina (clara de ovo)

- **Reagentes:**

1. Teste ninhidrina: ninhidrina 0,1% (p/v) em etanol 95%;
2. Teste xantoprotéica: HNO₃ em água 50% (v/v) e NaOH 5 M;
3. Teste biureto: biureto e HCl 5 M.

- **Sugestões de material de bancada (monte o seu kit! Que vai além dessa sugestão!):**

- As 6 soluções aminoácidos/proteínas;
- Os 5 reagentes;
- Água destilada;
- 1 estante e "x" tubos de ensaio;
- pipeta de 1 ou 2 mL e uma pera;

TESTES

NINHIDRINA

Objetivo: detectar a presença de grupos amínicos livres.

Reagente: solução 0,1% ninhidrina em etanol.

Procedimento:

1. Colocar 1 mL de cada amostra-problema em tubos de ensaio.
2. Colocar 1 mL de água destilada no tubo destinado ao branco.
3. Adicionar 0,5 mL da ninhidrina em todos os tubos.
4. Colocar todos os tubos por cerca de 5 min no "banho-maria" .

XANTOPROTÉICA

Objetivo: detectar a presença de anel benzênico ou fenólico em aminoácidos e proteínas.

Reagente: 50% (v/v) HNO₃ (ácido nítrico) e 5 M NaOH.

Procedimento:

1. Colocar 1 mL de cada amostra-problema em tubos de ensaio.
2. Colocar 1 mL de água destilada no tubo do branco.
3. Adicionar a todos os tubos 0,5 mL do reagente do HNO₃ (CUIDADO! ÁCIDO CONCENTRADO!);
4. Colocar todos os tubos por cerca de 5 min no "banho-maria".
5. Anotar os resultados.
6. Adicionar gota a gota, agitando após cada gota, o NaOH somente nos tubos que ficaram amarelos.

BIURETO

Objetivo: detectar a presença de proteínas ou de peptídeos maiores, graças à presença de duas ou mais ligações peptídicas.

Reagente: reagente biureto (solução alcalina de sulfato de cobre, CuSO₄) e 5 M HCl.

Procedimento:

1. Colocar 1 mL de cada amostra a ser testada em tubos de ensaio.
2. Colocar 1 mL de água destilada no tubo destinado ao branco.
3. Adicionar 2 mL do reagente biureto (sulfato de cobre) a cada tubo.
4. Agitar bem, observar e anotar os resultados obtidos, na tabela.
5. Adicionar algumas gotas de HCl nos tubos que sofreram modificações (cor violeta) até notar nova alteração.

	Ninhidrina	Reação xantoprotéica	Reação de biureto	Conclusão					
	NaOH	HCl							
	Antes	Depois	Antes				Depois		
1									
2									
3									
4									
5 (branco)									

Reagiu = Anotar (+) para tubos com cor diferente do branco; Não Reagiu = Anotar (-) para cores iguais ao branco.