

Aula 5

AMINOÁCIDOS, PEPTÍDEOS E PROTEÍNAS EXPERIMENTAL

META

Apresentar ao aluno os aminoácidos e as proteínas no laboratório.

OBJETIVOS

Ao final desta aula, o aluno deverá:
saber identificar um aminoácido, peptídeo ou proteína no laboratório. Saber diferenciar entre aminoácidos livres e proteínas. Conhecer os fatores que causam a desnaturação de uma proteína. Saber extrair as proteínas do leite.

PRÉ-REQUISITOS

Aula 03 de aminoácidos e aula 04 de peptídeos e proteínas, reações de ácidos carboxílicos, aminas e amidas. Química orgânica experimental.

André Luís Bacelar Silva Barreiros
Marizeth Libório Barreiros

INTRODUÇÃO

Olá aluno, nas duas aulas anteriores você foi apresentado aos aminoácidos, peptídeos e proteínas. Você aprendeu sobre as suas estruturas e propriedades, além de ser introduzido às suas reações. Hoje vamos aprender a trabalhar com eles no laboratório. Aprender a identificar um aminoácido, peptídeo ou proteína. A diferenciar um aminoácido de um peptídeo ou proteína. Vamos ver também algumas propriedades das proteínas, como a sua desnaturação, e a detecção da presença de aminoácidos aromáticos Phe, Tyr e Trp. Por fim vamos aprender a extrair as proteínas do leite.

Vamos começar então? Mãos a obra!

TESTE DA NINHIDRINA

A reação da ninhidrina detecta a presença do grupo α -amino livre dos aminoácidos, do grupo amino terminal de peptídeos e proteínas e do grupo ϵ -amino da lisina. Ela segue o mecanismo de adição do nitrogênio nucleofílico à aldeídos e cetonas, onde é formada uma imina (Figura 1). No caso da prolina que é uma amina secundária a reação é um pouco diferente, formando uma enamina ao invés de formar a imina (Figura 2).

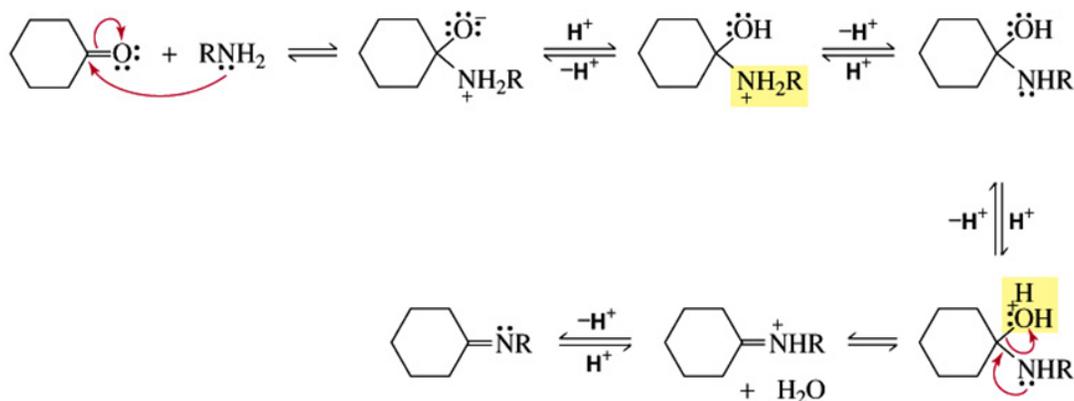


Figura 01 - Mecanismo da formação da imina.

Fonte: BRUICE, P. Y. Química Orgânica. Vol. II, 4ª. Ed. Pearson Prentice Hall, São Paulo – SP, 2006. Pg. 160.

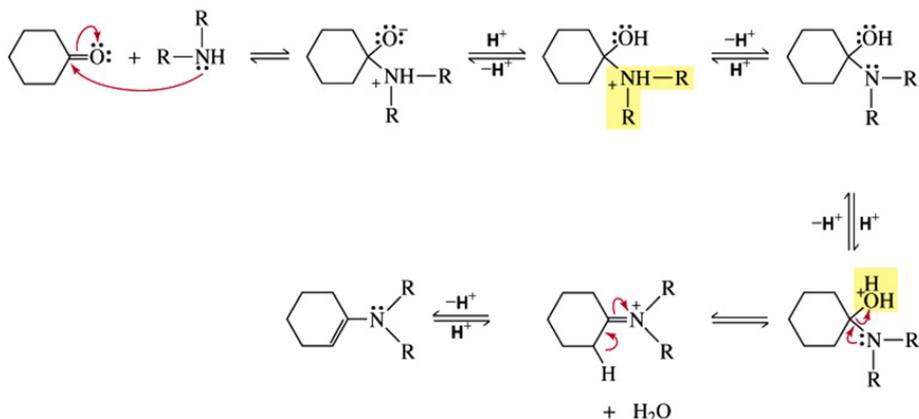


Figura 02 - Mecanismo da formação da enamina.

Fonte: BRUCE, P. Y. Química Orgânica. Vol. II, 4ª. Ed. Pearson Prentice Hall, São Paulo – SP, 2006. Pg. 162.

Em seguida ocorre uma descarboxilação devido à presença do grupo carboxilato ligado ao C- α , gerando uma nova imina, que hidrolisa formando um derivado da ninhidrina aminado. Esse derivado da ninhidrina adiciona à outra molécula de ninhidrina formando como produto uma imina de coloração violeta (Figura 3), sendo que a cor é proporcional à concentração. Iminoácidos prolina e 4-hidroxiprolina formam produtos amarelos, pois a enamina é amarela e não sofre a reação com outra molécula de ninhidrina.

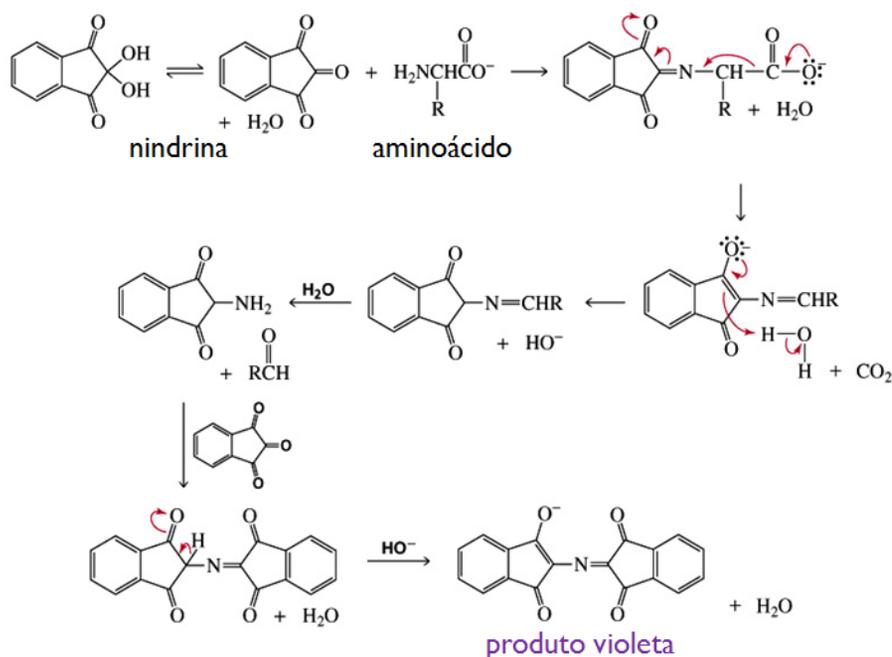


Figura 03 - Mecanismo da reação da ninhidrina.

Fonte: BRUCE, P. Y. Química Orgânica. Vol. II, 4ª. Ed. Pearson Prentice Hall, São Paulo – SP, 2006. Pg. 383.



ATIVIDADES

Realização do teste da Ninhidrina

Materiais:

- Balão volumétrico 100 mL
- Pipeta volumétrica 10 mL
- Béquer 100 mL
- Pêra
- 3 Tubos de ensaio
- Pipeta graduada 10 mL
- Balança analítica
- Conta-gotas

Reagentes:

- Tampão fosfato 0,01 mol/L
- Clara de ovo
- Ninhidrina
- Glicina 10%
- Aspartato 10%

Procedimento

Prepare uma solução de albumina 10% (v/v) dissolvendo 10 mL de clara de ovo em tampão fosfato 0,01 mol/L e avolumando com o tampão para 100 mL em balão volumétrico. Num tubo de ensaio pipetar 2,0 mL de solução de nindrina e adicionar 5 gotas da solução de proteína 10%. Aquecer em banho-maria fervente por 5 min. Anotar o resultado. Repetir o procedimento substituindo a solução de proteína por solução de aminoácido a 10% (glicina e aspartato). Nindrina: Dissolver 100 mg de nindrina em 100 mL de tampão fosfato 0,01 mol/L (pH = 7,0). Conservar em frasco escuro na geladeira.

COMENTÁRIO SOBRE AS ATIVIDADES

Todas as três amostras testadas dão resultado positivo, entretanto a Gly reage mais rapidamente pois não possui cadeia lateral, o que reduz o impedimento estérico. Em seguida reage o Asp e por último a albumina. A coloração mais fraca da albumina pode indicar poucos resíduos de Lys em sua estrutura (Figura 4).

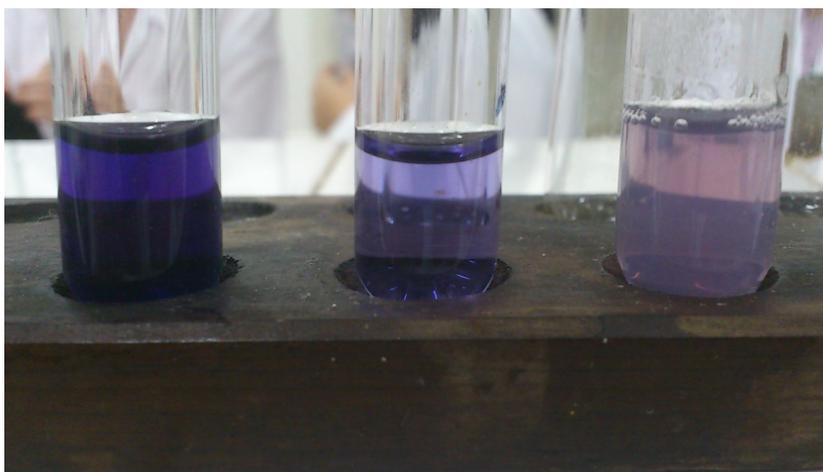


Figura 04 - Resultado do teste da Ninhidrina.
Fonte: Foto tirada pelo autor.

TESTE DO BIURETO

O Teste do Biureto é um teste geral para proteínas e peptídeos com mais de dois aminoácidos. A reação do Biureto é o resultado da formação de um complexo entre Cu^{2+} e as proteínas ou peptídeos com mais de dois aminoácidos. As ligações peptídicas são ligações amida, e o par de elétrons dos átomos de nitrogênio das amidas encontram-se disponíveis, podendo servir de ligante para o átomo de cobre II. O sulfato de cobre II em meio alcalino apresenta coloração azul clara, na presença de proteínas ou peptídeos forma produto violeta caracterizando a formação do complexo de coordenação entre o cobre e os átomos de nitrogênio das ligações peptídicas adjacentes, agindo como um ligante bidentado (Figura 5). Os dipeptídeos dão reação negativa por apresentarem apenas uma ligação peptídica. Os aminoácidos também dão reação negativa por não apresentarem ligação peptídica. Os grupos amino livres não coordenam com o cobre, pois em pH 7,0 encontram-se protonados na forma de $-\text{NH}_3^+$, não tendo elétrons disponíveis para doar.

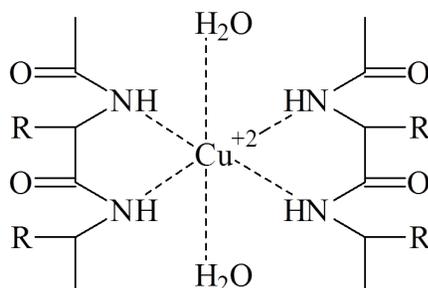


Figura 05 - Complexo formado entre o cobre II e peptídeos ou proteínas.
Fonte: Desenhado pelo autor.



ATIVIDADES

Realização do teste do Biureto

Materiais:

- 3 Tubos de ensaio
- 4 Pipetas graduadas 10 mL
- Balão volumétrico 100 mL
- Pêra
- Proveta 50 mL
- Béquer 100 mL
- Balança analítica
- Espátulas

Reagentes:

- Sulfato de cobre II penta-hidratado
- Sal de Rochelle (tartarato de sódio e potássio)
- Hidróxido de sódio 10%
- Água destilada
- Albumina 10%
- Glicina 10%

Procedimento

Separe três tubos de ensaio. No primeiro adicione 1,0 mL de água destilada, no segundo 1,0 mL de solução de glicina 10% e no terceiro 1,0 mL de solução de proteína albumina 10%. Adicione a cada tubo 1,0 mL do reativo de Biureto. Agite os tubos e observe a cor. Reativo do Biureto: Em 50 mL de água destilada dissolver 0,15g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e 0,6g de sal de Rochelle (tartarato duplo de sódio e potássio $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$). Adicionar 30 mL de solução de NaOH 10% com agitação constante. Avolumar para 100 mL.

COMENTÁRIO SOBRE AS ATIVIDADES

A água serve de branco, mostrando apenas a coloração do reativo de biureto que é azul clara. A glicina produz a mesma coloração do branco, pois não ocorre formação de complexo. Apenas a albumina dá resultado positivo com coloração violeta (Figura 6), devido à formação do complexo com o cobre II.

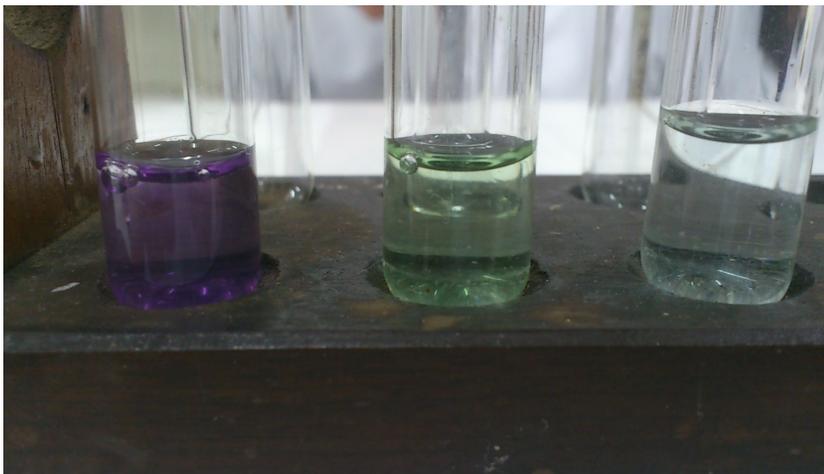


Figura 06 - Resultado do teste do Biureto.
Fonte: Foto tirada pelo autor.

TESTE DE HELLER

Este teste serve para identificar a presença de proteínas por desnaturação devido à acidez do meio. As proteínas globulares podem ser solúveis em água desde que em sua estrutura terciária seus grupos hidrofílicos estejam posicionados para fora e seus grupos hidrofóbicos posicionados para o interior da proteína. Uma das forças que mantém a estrutura terciária da proteína é a atração eletrostática entre os íons positivos de aminoácidos como Lys e Arg e os íons negativos de aminoácidos como Glu e Asp. Ao acidificar o meio os íons carboxilato de Asp e Glu são protonados ($-\text{COO}^- + \text{H}^+ \rightarrow -\text{COOH}$), perdendo sua carga negativa. Isto quebra as interações eletrostáticas, desorganizando a estrutura terciária da proteína e expondo dessa maneira os grupos hidrofóbicos, tornando a proteína insolúvel em água. O meio ácido também hidrolisa as ligações peptídicas quebrando a estrutura primária. A adição de ácido nítrico concentrado portanto desnatura a proteína formando um anel branco de proteína precipitada na interface entre a solução e o ácido.



ATIVIDADES

Realização do teste de Heller

Materiais:

- Tubo de ensaio
- 2 Pipetas graduadas 10 mL

Reagentes:

- Albumina 10%
- Ácido Nítrico concentrado

Procedimento

Pipetar 2,0 mL da solução de proteína 10% em um tubo de ensaio. Deramrar cuidadosamente e sem agitação 1,0 mL de ácido nítrico concentrado pelas paredes do tubo. Observar o resultado obtido.

COMENTÁRIO SOBRE AS ATIVIDADES

Ao escorrer o ácido sem agitar as fases não se misturam e podemos observar a desnaturação da proteína apenas na interface, formando um anel branco (Figura 7).



Figura 07 - Resultado do teste de Heller.

Fonte: Foto tirada pelo autor.

REAÇÃO XANTOPROTÉICA

Este teste identifica a presença de aminoácidos de cadeia lateral aromática (Phe, Tyr e Trp). As proteínas que apresentam estes aminoácidos aromáticos também reagem, sofrendo primeiramente precipitação devido a desnaturação, seguida do desenvolvimento da coloração amarela. A reação consiste da nitração do anel aromático, formando o nitrocomposto amarelo. Em seguida a adição de base transforma os nitrocompostos formados em sais de coloração alaranjada (Figura 8).

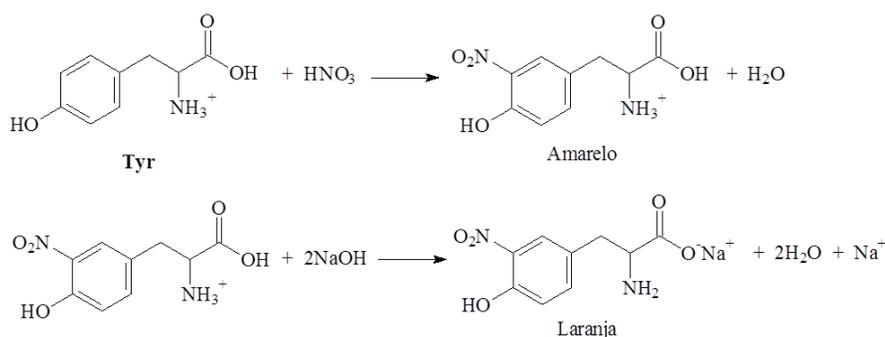


Figura 08 - Nitração da Tirosina.
Fonte: Desenhado pelo autor.



ATIVIDADES

Realização da Reação Xantoprotéico

Materiais:

- 4 Tubos de ensaio
- 6 Pipetas graduadas 10 mL
- Béquer 500 mL
- Pêra
- Chapa de Aquecimento
- Pegador para tubo de ensaio

Reagentes:

- Albumina 10%
- Ácido Nítrico concentrado
- Hidróxido de sódio 2,5 mol/L
- Fenilalanida 10%
- Tirosina 10%
- Triptofano 10%

PROCEDIMENTO

Pipete 2,0 mL de solução albumina 10% e transfira para um tubo de ensaio. Escorra pelas paredes do tubo 1,0 mL de HNO_3 conc. e observe a formação do precipitado branco. Aqueça o tubo em banho-maria fervente durante 1 min e observe e anote a cor do precipitado. Refrie em água corrente e adicione 1,0 mL de NaOH 2,5 mol/L. Observe e anote a cor. Repita o teste para solução 10% de um dos seguintes aminoácidos: fenilalanina, tirosina ou triptofano.

COMENTÁRIO SOBRE AS ATIVIDADES

Ao entrar em contato com o ácido primeiramente a proteína desnatura, da mesma maneira que no teste de Heller. O aquecimento promove a nitração dos aminoácidos de cadeia lateral aromática Phe, Tyr e Trp, assim como hidrólise parcial das ligações peptídicas, formando produto amarelo. Ao tratar com NaOH é formado o sal do nitro composto que é laranja e não amarelo, comprovando a presença de aminoácidos livres (Figura 9).

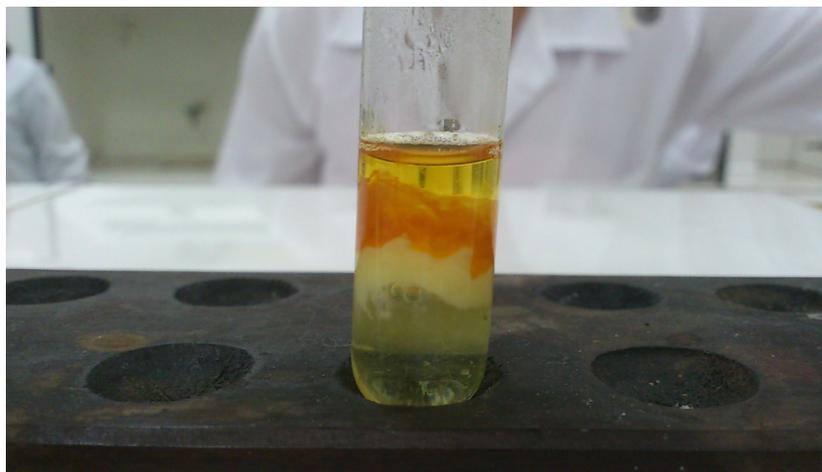


Figura 09 - Resultado da reação xantoprotéica.
Fonte: Foto tirada pelo autor.

REAÇÕES DE PRECIPITAÇÃO DAS PROTEÍNAS (DESNATURAÇÃO)

A solubilidade em água das proteínas é muito variável, e depende da distribuição dos grupos apolares (hidrofóbicos) e polares (hidrofílicos) na molécula. Para a proteína ser solúvel em água os grupos hidrofóbicos devem estar no interior da molécula onde interagem entre si, e os grupos hidrofílicos expostos no exterior onde interagem com as moléculas de água. Qualquer alteração nesta distribuição altera a solubilidade da proteína, levando à sua precipitação. Uma alteração na estrutura terciária é denominada desnaturação da proteína.

Uma forma de alterar a solubilidade é a adição de íons. Se a proteína estiver em solução de pH inferior ao seu pI ela estará em sua forma catiônica ($-\text{NH}_3^+$), desta forma, para precipita-la basta adicionar ânions tricloroacetato, picrato ou alcalóides. A adição de sais de metais pesados causam a precipitação pela combinação do cátion metálico (Pb^{2+} , Hg^{2+} , etc) com as cargas negativas da proteína dos resíduos de Asp e Glu ($-\text{COO}^-$). As proteínas também precipitam pela adição de ácido nítrico devido a desidratação causada pelo ânion nitrato e á protonação dos resíduos de Asp e Glu ($-\text{COO}^- + \text{H}^+ \rightarrow -\text{COOH}$), quebrando as interações eletrostáticas. Soluções salinas causam a precipitação por efeito *salting-out*, e solventes orgânicos por desidratação. O calor também é um agente desnaturante, pois o aumento da agitação molecular altera a conformação, quebrando as interações e expondo os grupos hidrofóbicos.



Desnaturação de Proteínas

Materiais:

- 5 Tubos de ensaio
- 5 Pipetas graduadas 10 mL
- Béquer 500 mL
- Pêra
- Chapa de Aquecimento
- Pegador para tubo de ensaio

Reagentes:

- Albumina 10%
- Ácido tricloroacético 10%
- Acetato de chumbo 5%
- Etanol
- Sol. Saturada de Sulfato de amônio

Procedimento

Tome 5 tubos de ensaio e adicione 2,0 mL de solução de albumina 10% em cada um. Aqueça o Tubo 1 em banho-maria fervente por 3 min. Anote o resultado. Ao Tubo 2 adicione 2,0 mL de ácido tricloroacético 10%. Anote o resultado. Ao Tubo 3 adicione 2,0 mL de solução de acetato de chumbo 5%. Anote o resultado. Ao Tubo 4 adicione 5,0 mL de etanol. Anote o resultado. Ao Tubo 5 adicione 4,0 mL de solução saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e anote o resultado. Em seguida adicione 6,0 mL de água destilada e anote o resultado.

COMENTÁRIO SOBRE AS ATIVIDADES

Em todos os cinco tubos ocorreu desnaturação pelos efeitos mencionados na texto. Nos quatro primeiros a desnaturação é irreversível, entretanto no quinto tubo onde ocorreu o efeito “*salting-out*” a adição de mais água dilui o sal revertendo a desnaturação no chamado efeito “*salting-in*”.

ISOLAMENTO DAS PROTEÍNAS DO LEITE

O leite é um dos alimentos mais completos, contendo em sua composição proteínas compostas por todos os aminoácidos essenciais, carboidratos na forma de lactose, lipídeos na forma de triacilgliceróis, fosfolipídios e colesterol, além das vitaminas tiamina, riboflavina, ácido pantotênico e vitamina A, D e K. No leite existem três tipos de proteínas: as caseínas que compõem 85% das proteínas totais, as lactoalbuminas e as lactoglobulinas, todas globulares. A caseína é uma fosfoproteína, pois na cadeia lateral estão ligados grupos fosfato, principalmente nas hidroxilas das serinas e treoninas. A caseína é uma mistura de três proteínas α -caseína, β -caseína e κ -caseína, todas com massas molares bem diferentes. Sozinhas as duas primeiras precipitariam em presença de Ca^{2+} , entretanto a κ -caseína estabiliza a estrutura do sal caseinato de cálcio formando uma micela. O ponto isoelétrico do caseinato de cálcio ocorre em pH 4,6 enquanto que o leite tem pH 6,6. Qualquer fator que altere o pH reduzindo abaixo de 4,6 irá precipitar a caseína. Já as albuminas (lactoalbuminas) são solúveis em água e em soluções salinas diluídas, entretanto desnaturam e precipitam pela ação do calor. Por fim as lactoglobulinas são responsáveis pelas propriedades imunológicas do leite, encontrando-se em menor quantidade e também precipitando pela ação do calor ou adição de solvente orgânico.

Neste experimento iremos isolar as proteínas do leite e comprovar as suas propriedades. Como utilizaremos leite desnatado, não teremos a pre-

sença de lipídios e nem das vitaminas lipossolúveis, restando no soro apenas um solução do açúcar galactose.



ATIVIDADES

Isolamento das proteínas do leite

Materiais:

- Balança semi-analítica
- Espátula
- Béquer 250 mL
- Banho termostatizado
- Bastão de vidro
- Béquer 100 mL
- Pipeta Pasteur
- Centrífuga
- Tubos de ensaio
- Bancada para tubos de ensaio
- Pissete
- Vidros de relógio
- Erlenmeyer 125 mL

Reagentes:

- Leite em pó desnatado
- Água destilada
- Ácido acético 10%
- Carbonato de cálcio
- Reagente de Biureto
- Etanol

Procedimento

Pese 10g de leite em pó desnatado num béquer de 250 mL, acrescente 25 mL de água destilada e aqueça em banho-maria a 40°C acompanhando com um termômetro a temperatura do leite. Quando o leite atingir 40°C comece a adicionar gota a gota 2,5 mL de ácido acético 10% e vá agitando lentamente e recolhendo com uma espátula a caseína coagulada, tomando o cuidado de espremer para remover o líquido. Transfira a caseína para um béquer de 100 mL. Se ainda houver líquido neste béquer remova com uma pipeta Pasteur e retorne pro primeiro béquer. Continue adicionando o ácido acético gota a gota até a caseína precipitar totalmente (Cuidado, não aqueça demais nem adicione muito ácido para não hidrolisar a lactose). Centrifugue por 5 min para separar o soro da caseína restante.

Retorne o soro para o primeiro béquer e adicione 0,5g de carbonato de cálcio para neutralizar, agite e aqueça até 75°C, mantendo nesta temperatura por 5 min, todas as lactoalbuminas deverão precipitar. Centrifugue e separe as lactoalbuminas. Reserve o soro para o isolamento da lactose. Realize o

teste do biureto com uma pequena quantidade das proteínas isoladas em 2,0 mL de água destilada. Seque em vidros de relógio separados e determine o rendimento na próxima aula.

Tome o líquido reservado do experimento anterior e adicione 45 mL de etanol. Ocorrerá precipitação de sólidos (globulinas). Aqueça até 60°C para dissolver a lactose e centrifugue ainda quente por 2 min. Descarte o material sólido e transfira o líquido para um erlenmeyer de 125 mL. Deixe esfriar. Realize os testes de Molish e Benedict com um pouco do líquido. Deixe o restante tampado recristalizando por 1 semana. Observe os cristais de lactose na semana seguinte.

COMENTÁRIO SOBRE AS ATIVIDADES

Ao adicionar o ácido acético o caseinato de cálcio é desestabilizado, pois a proteína caseína atinge seu ponto isoelétrico pI, precipitando desta forma e podendo ser separada. A lactoalbumina e a lactoglobulina não são desnaturadas neste pH 4,6. A lactoalbumina é mais sensível ao calor, desnaturando a 75°C, podendo assim ser isolada. Por fim a lactoglobulina é desnaturada pelo etanol, sendo insolúvel tanto a quente quanto a frio. Como a lactose é solúvel em etanol quente, efetuamos a centrifugação ainda quente, removendo a globulina e deixando a lactose dissolvida no soro. Ao ser resfriada a solução a lactose cristaliza lentamente no fundo, podendo ser removida por filtração a vácuo lavando com etanol gelado.

CONCLUSÃO

Como vimos, é possível diferenciar os aminoácidos das proteínas no laboratório por um teste simples. E podemos caracterizar as proteínas por suas propriedades. As proteínas e aminoácidos estão presentes em diversos alimentos que consumimos.



RESUMO

Na aula de hoje aprendemos sobre como identificar aminoácidos, peptídeos e proteínas pelo teste da Ninhidrina, aprendemos a diferenciar aminoácidos dos peptídeos e proteínas pelo teste do Biureto. Vimos também que as proteínas desnaturam em meio fortemente ácido pelo teste de Heller, e identificamos a presença de aminoácidos de cadeia lateral aromática pela reação Xantoprotéica. Avaliamos os diferentes fatores que podem causar a desnaturação de uma proteína. Por fim, extraímos as proteínas e o açúcar do leite e realizamos a sua caracterização.



AUTO-AVALIAÇÃO

- 1- Que grupo funcional o teste da Ninhidrina identifica?
- 2- Por que o teste da Ninhidrina daria negativo para a propilamina e positivo para a alanina?
- 3- Qual aminoácido falha no teste de Ninhidrina e porque?
- 4- Por que o teste do Biureto dá negativo para aminoácidos e positivo para peptídeos e proteínas?
- 5- Em que se baseia o teste de Heller?
- 6- Mostro o mecanismo da reação Xantoprotéica com o aminoácido Tyr.
- 7- Quais fatores causam a desnaturação de uma proteína? Explique cada um deles:
- 8- Quais os tipos de proteínas encontradas no leite?
- 9- Por que podemos separar os diferentes tipos de proteínas do leite?
- 10- Desenhe a estrutura em forma de cadeia da lactose:



PRÓXIMA AULA

Na próxima aula vamos aprender sobre uma classe especial de proteínas: as enzimas, e sua atividade catalítica.

REFERÊNCIAS

- BRUCE, P. Y. **Química Orgânica**. 4ª. Ed. Pearson Prentice e Hall, São Paulo – SP, 2006. Vol. 2.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**, 4ª. Edição, Editora Sarvier, 2006, capítulo 7.
- MASTROENI, M. F., GERN, R. M. M. **Bioquímica: Práticas Adaptadas**. Atheneu, São Paulo – SP, 2008.
- PAVIA, D. L., LAMPMAN, G. M., KRIZ, G. S., ENGEL, R. G. **Química Orgânica Experimental: Técnicas de escala pequena**. 2ª. Ed., Bookman, Porto Alegre - RS, 2009.
- PETKOWICZ et. al. **Bioquímica: Aulas Práticas**. 7ª. Ed. Editora UFPR, Curitiba – PR, 2007.
- dos SANTOS, P. C., BOCK, P. M. **Manual Prático de Bioquímica**. Ed. Universitária Metodista IPA, Porto Alegre – RS, 2008.
- VOGUEL, A.I. **Química Orgânica: Análise Orgânica Qualitativa**, Ed. Ao Livro Técnico S.A., Vol. 1, 2 e 3, 1971.