



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

---

Facultad de Química

**METODO COLORIMETRICO PARA MEDIR METIONINA EN  
HIDROLIZADOS DE PROTEINA Y SU COMPARACION CON  
EL METODO CROMATOGRAFICO.**

**T E S I S**

Que para obtener el Grado de:  
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P r e s e n t a

**ELVA CRISTINA RODRIGUEZ JIMENEZ**

México, D. F.

1985



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **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.

# C O N T E N I D O

	Página
OBJETIVO .....	1
INTRODUCCION .....	1
GENERALIDADES .....	3
Definición y estructura química de la metionina .....	3
Distribución de la metionina .....	3
Síntesis de metionina .....	3
Compuestos antagónicos de la metionina .....	4
Métodos de cuantificación de metionina .....	6
Métodos volumétricos .....	7
Métodos colorimétricos .....	10
Métodos cromatográficos .....	13
Métodos microbiológicos .....	14
Metabolismo de metionina .....	14
Efecto de la vitamina B <sub>6</sub> y B <sub>12</sub> en el metabolismo de metionina .....	15
Efectos biológicos .....	17
Efectos carenciales y tóxicos .....	17
Producción de arterioesclerosis .....	20
Efecto antiinflamatorio y analgésico de la metionina .....	20
Efecto en la cicatrización .....	20

	Página
PARTE EXPERIMENTAL .....	22
Primer ensayo .....	27
Segundo ensayo .....	28
Cálculos .....	31
Tercer ensayo .....	32
Cuarto ensayo .....	32
RESULTADOS Y DISCUSION .....	34
Análisis estadístico .....	36
CONCLUSIONES .....	38
BIBLIOGRAFIA .....	39

## OBJETIVO.

Probar la efectividad de un nuevo método colorimétrico para medir metionina, en hidrolizados de proteínas de origen vegetal y animal, y su comparación con el método cromatográfico.

## INTRODUCCION.

Las proteínas son macromoléculas que actúan como catalizadores, elementos estructurales, reserva de elementos nutritivos, vehículos de transporte, elementos de protección y como hormonas. Se encuentran constituidas comúnmente por 20 aminoácidos. Ocho de ellos son considerados como esenciales para el hombre, debido a que no pueden ser sintetizados en el cuerpo al ritmo requerido para un desarrollo normal. La metionina es uno de los aminoácidos esenciales, de ahí la importancia de su determinación y medición.

Este trabajo propone probar un nuevo método colorimétrico, para la cuantificación de metionina. Siendo sencillo, rápido, reproducible y más sensible que los métodos colorimétricos existentes.

La metodología consiste en realizar una hidrólisis alcalina de las muestras, a determinadas condiciones de temperatura, tiempo y presión. Posteriormente, la metionina presente en el hidrolizado reacciona con el reactivo

de yodoplatinato, efectuándose una reacción de oxidorreducción. La cantidad de metionina presente en el hidrolizado, se obtiene interpolando la absorbancia de los hidrolizados en una curva patrón, que resulta de graficar diferentes concentraciones de solución estándar de metionina y las absorbancias que se obtienen en un espectrofotómetro. El método no requiere de equipo costoso y complicado, como ocurre en el método de cromatografía de intercambio iónico, siendo en la actualidad el método ideal.

Finalmente en el presente trabajo, se comparan los resultados obtenidos por el método colorimétrico y cromatográfico, para determinar si hay diferencia significativa entre los dos métodos.

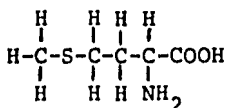
## I. GENERALIDADES

### 1.1 DEFINICION Y ESTRUCTURA QUIMICA DE LA METIONINA. (1,7)

La metionina es un aminoácido azufrado. Definiéndose, como un compuesto orgánico, que posee grupos amino, carboxilo y un átomo de azufre. Tiene un peso molecular de 149.22 g/mol.

Los nombres químicos que se le dan son:  $\alpha$ -amino- $\gamma$ -ácido metiltiobutírico,  $\alpha$ -amino- $\gamma$ -ácido metil mercaptobutírico, 2-amino-4-ácido metiltiobutanoico.

Su estructura química es:



### 1.2 DISTRIBUCION DE LA METIONINA. (2)

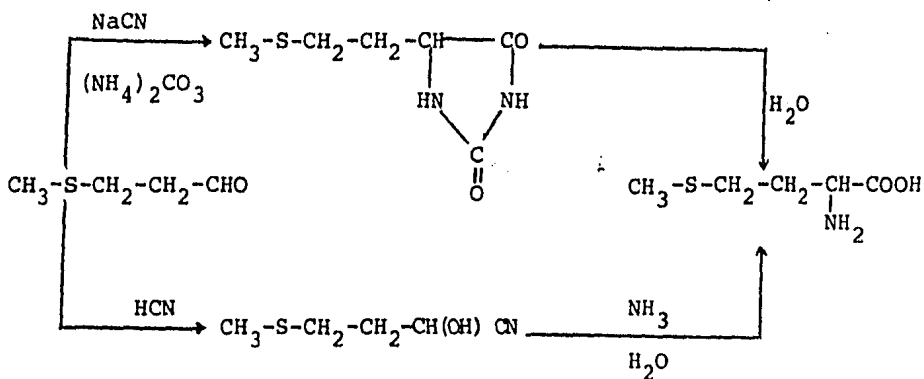
En los alimentos, la metionina y cistina están presentes en proporciones que varían aproximadamente de 1:1 a 3:1. La mayoría de los cereales y leguminosas, contienen cantidades cercanamente iguales de ambos aminoácidos; predominando la metionina en proteínas de origen animal.

### 1.3 SINTESIS DE METIONINA. (3,7)

La DL-metionina es sintetizada a partir de acroleína, metil-mercaptanos y alguna fuente de cianuro y de iones amonio.

La síntesis comercial de metionina empieza con la reacción de acroleína con el metil mercaptano, para dar 3-(metiltio)-propionaldehído, este aldehído reacciona con cianuro de sodio y carbonato de amonio, o con otros recursos de iones cianuro y amonio, para dar 5-(2-metiltio) (etil) hidantofina, y por hidrólisis de esta hidantofina se obtiene la metionina.

Alternativamente, el 3-(metiltio)-propionaldehído puede hacerse reaccionar con ácido cianhídrico, para dar el correspondiente 2-hidroxinitrilo; el hidróxilo, es entonces sustituido por un grupo amino, por reacción con amoníaco bajo presión, la hidrólisis del nitrilo da entonces la metionina.

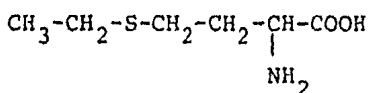


#### 1.4 COMPUESTOS ANTAGONICOS DE LA METIONINA. (4)

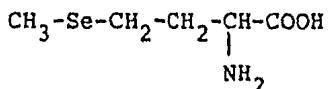
La etionina es un compuesto que produce un decremen-



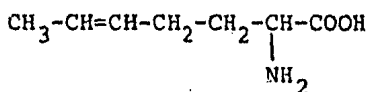
to en la transmetilación de metionina a colina en ratas, sin embargo la formación de creatina no es afectada. Los efectos tóxicos de etionina en ratas, son disminuídos por la administración de colina o bien por metionina. Los efectos tóxicos parecen ser debidos a la formación de etil análogos de los metabolitos esenciales, y a la formación de proteínas en las cuales, la metionina es reemplazada por etionina. La etionina es metabolizada, en menor grado, por la misma ruta de la metionina.



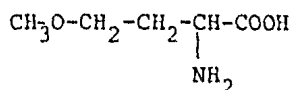
El DL-Seleno-metionina, ha sido encontrado como un antagonista competitivo de L- y D- metionina para el crecimiento de *Chorella vulgaris*. La toxicidad de este compuesto fue anulada por la metionina, la cual parece actuar previniendo la absorción del antagonista.



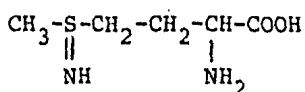
Otros antagonistas de la metionina son:  
2-amino-5-ácido heptanoico (Crotilalanina). Inhibe el crecimiento de *E. coli*.



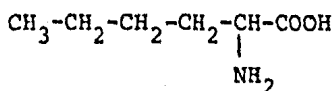
Metoxinina. Tiene efecto bacteriostático la DL-metoxinina en *E. coli.* y *St. aureus*, y éste puede ser anulado por la L-metionina, pero no por el D-isómero.



Metionina sulfoximina. Es un antimetabolito efectivo del ácido glutámico, así como de la metionina.



Norleucina, es otro antagonista de la metionina.



### 1.5 METODOS DE CUANTIFICACION DE METIONINA.

Los aminoácidos se obtienen como productos finales de hidrólisis de las proteínas, cuando se calientan por algunas horas con un ácido, álcali o por la acción de ciertas enzimas. La metionina, puede ser cuantificada después de una hidrólisis de las proteínas. (5).

Un gran número de aminoácidos, son destruídos durante la hidrólisis alcalina, entre estos están: serina, treonina, arginina, cistefna y cistina. Aquellos aminoácidos que son estables en álcali, son racemizados en un grado considerable. (6).

En la hidrólisis ácida, una pequeña cantidad de cistina, serina y treonina son destruídas. (1).

La hidrólisis varía como una función de la temperatura, presión, concentración de ácido o álcali, y de la presencia de sustancias no proteícas. (6).

A continuación se describen los métodos más importantes para la cuantificación de metionina.

#### 1.5.1 METODOS VOLUMETRICOS. (7).

1.5.1a Desmetilación reductiva de la metionina con ácido yodhídrico. El método involucra, la hidrólisis de la proteína con ácido yodhídrico (HI), la transferencia del yoduro de metilo liberado, por aereación, dentro de una solución alcohólica de nitrato de plata y la determinación del exceso de plata por titulación con tiocianato.

Alternativamente, el yoduro de metilo puede ser oxidado a yodato por transferencia a una mezcla de ácido acé tico glacial/acetato de sodio, que contiene bromo líquido. La solución de yodato tratada con yoduro de potasio, produce yodo libre, el cual puede ser determinado por titulación con tiosulfato.

Aminoácidos como triptofano, tirosina y cisteína, deben ser eliminados por oxidación con ácido bromoacético.

El intermediario formado por la metionina y el yodo, es estable a niveles de pH tan bajos como 4. El triptofano consume 6 átomos de yodo a todos los niveles de pH, en

tanto que la tirosina reacciona a pH=6 con 4 átomos de yodo, pero no a pH igual a 4.

A continuación se hace una descripción de los cálculos a realizar, para determinar la concentración de triptofano, tirosina y metionina.

Muestra<sub>1</sub> + sol. de Yodo (STD.)  $\xrightarrow{\text{pH}=6}$  T (yodo total)

$T = \text{Triptofano} \times 6 + \text{Tirosina} \times 4 + \text{Metionina} \times 2$

Muestra<sub>2</sub> + sol. Tiosulfato (STD.)  $\xrightarrow{\text{pH}=1}$  P (yodo unido irreversible)

P es la cantidad total de yodo consumido por triptofano y tirosina.

$P = \text{Triptofano} \times 6 + \text{Tirosina} \times 4$

$M = T - P$

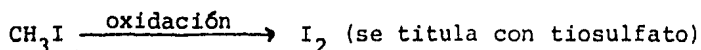
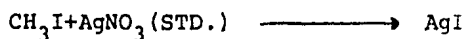
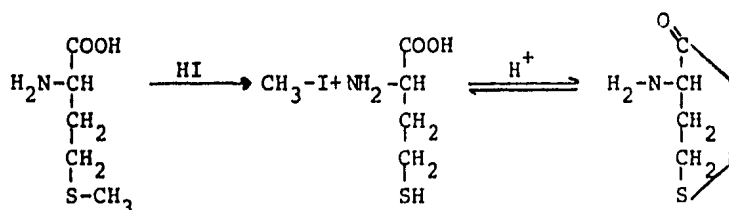
M es la cantidad total de yodo consumido por metionina.

Muestra<sub>3</sub> + sol. de yodo (STD.)  $\xrightarrow{\text{pH}=4}$  N

N es igual al consumo total de yodo, debido a los residuos de triptofano y metionina.

$N = \text{Triptofano} \times 6 + \text{Metionina} \times 2.$

Por lo tanto:  $T - N = \text{Tirosina} \times 4.$



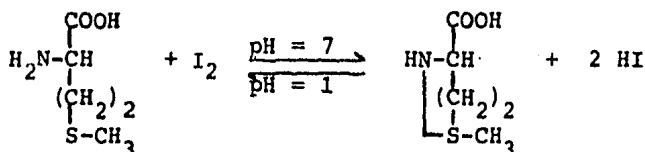
### 1.5.1 b Método de partición del azufre.

Este método se basa en la hipótesis, de que todo el azufre de la molécula de proteína se encuentra presente como cisteína, cistina, metionina y sulfato. Se aprovecha la ventaja de que únicamente una cantidad despreciable del azufre de la metionina se oxida a sulfato, por tratamiento con ácido nítrico fumante, en tanto que todo el azufre de la cistina-cisteína si es oxidado. Así, la suma de la cantidad de sulfato liberado en una hidrólisis con ácido clorhídrico (HCl), después de que la muestra ha sido tratada con ácido nítrico, proporciona una medida de la cantidad de metionina, ya que se resta al valor obtenido del contenido total de azufre de la muestra.

### 1.5.1c Método Iodométrico.

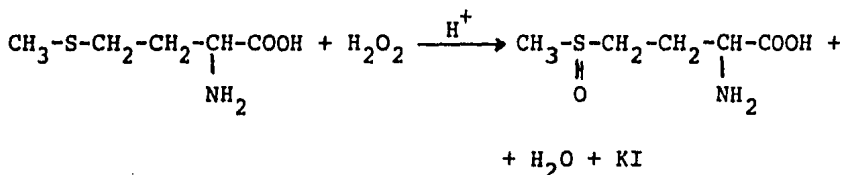
Consiste en la adición de un exceso de yodo a pH = 7-9, efectuándose la reacción con formación de un intermediario. El exceso de yodo libre se remueve con tiosulfato, seguida de una acidificación de la mezcla de reac-

ción, con el objeto de hacer reversible la reacción y liberar una cantidad estequiométrica de yodo.



#### 1.5.1d Oxidación con Peróxido de Hidrógeno.

Este procedimiento consiste en una oxidación selectiva de metionina, por exceso de peróxido de hidrógeno, en presencia de ácido perclórico. La mezcla de reacción se trata con una solución que contenga yoduro de potasio y molibdato de amonio como catalizador. El yodo liberado se titula con solución estándar de tiosulfato de sodio.



#### 1.5.2 METODOS COLORIMETRICOS.

##### 1.5.2a Reacción con Nitroprusiato de sodio. (8,9,10)

En 1941 McCarthy y Sullivan, propusieron un método que se basa en la adición de nitroprusiato de sodio a una solución alcalina de metionina, seguida de una acidificación de la mezcla de reacción, desarrollándose un color rojo fuerte. Con excepción de triptofano e histidina, cualquier otro aminoácido comunmente encontrado en hidrolizados de proteínas, no desarrolla color. El triptofano, es un aminoácido que es destruido por hidrólisis ácida

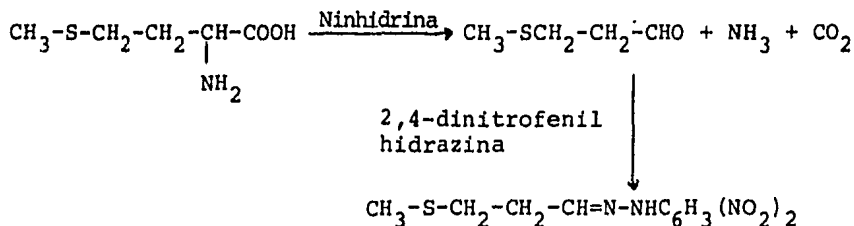
de una protefna. La interferencia de histidina es eliminada por adición de un exceso de glicina. Las desventajas que presenta este método son: Las muestras que tienen alto contenido de carbohidratos, producen una coloración que interfiere en la determinación. Esta coloración es debida a la reacción de Maillard, y por lo que es difícil de encontrar la reproducibilidad.

Ussary y Gehrke (1970), hicieron una adaptación a la reacción de McCarthy y Sullivan, con nitroprusiato de sodio sobre hidrólisis enzimática (papaina) usando un equipo automatizado. Hess y Sullivan, emplearon cloruro de titanio para prevenir la formación de humina, en la hidrólisis ácida de la protefna.

#### 1.5.2b Degradación con Ninhidrina. (7)

La reacción involucra un calentamiento de la mezcla de aminoácidos con un exceso de ninhidrina, produciéndose aldehídos volátiles, que son atrapados en una solución ácida de 2,4-dinitrofenilhidrazina, formándose los correspondientes 2,4-fenilhidrazonas. La fenilhidrazona de la metionina, puede ser separada cromatográficamente de otras fenilhidrazonas en una columna de sulfato de magnesio (molido) y luego ser medida colorimétricamente. Este procedimiento presenta varias ventajas, como son: La metionina libre puede ser distinguida de sus péptidos (los cuales no reaccionan), si la determinación se realiza antes y después de la hidrólisis ácida de las muestras. Proporciona una

separación rápida del azufre marcado  $S^{35}$  de la metionina, de otros compuestos con azufre en una mezcla, por lo tanto la determinación de la actividad específica es simple.



#### 1.5.2 c Reacción con yodoplatinato. (11)

Es un método simple propuesto por N.L. Njaa para la determinación de metionina en hidrolizados de  $\text{Ba(OH)}_2$ , usando el reactivo de yodoplatinato. La metionina es determinada directamente, después de la reducción con tricloruro de titanio del sulfóxido de metionina presente, dando la cantidad de metionina sin oxidar. La metionina total, no incluye la metionina sulfonada. En este método, hay varios compuestos azufrados que interfieren: homocisteína, homocistina, etionina, cistationina, etil éster metionina, N-acetilmetionina, cisteína y cistina. La interferencia de cisteína-cistina es eliminada, por la adición de pequeñas cantidades de acetato de cadmio o plomo antes de la hidrólisis. No se usa con muestras que contienen menos de 20% de proteína en base seca. Las ventajas que presenta son:

- a. La sensibilidad del método es alta. Los estándares más pequeños que se han usado son soluciones 20 micro



molar, en contraste con el usado por Ussary & Gehrke (1970), en una versión automatizada del método de Mc Carthy & Sullivan (1941), que fueron soluciones 300 micromolar.

- b. No presenta problemas de coloración.
- c. No presenta interferencia de otros aminoácidos, a excepción de cisteína y cistina, pero esta interferencia se elimina adicionando acetato de plomo o cad mio.

La desventaja que tiene, es la de utilizar un reactivo caro, aunque las cantidades que se requieren son pe queñas (miligramos).

#### 1.5.3 METODOS CROMATOGRAFICOS. (12,13)

La cromatografía de intercambio iónico, es en el pre sente lo ideal para la medición de metionina, pero los ma teriales requieren una preliminar oxidación de las unidades de metionina, a su correspondiente forma sulfonada más estable. El intercambio iónico es un proceso en el cual ocurre un intercambio de iones de signo igual entre una so lución esencialmente insoluble en contacto con la solución.

La cromatografía de intercambio iónico, se realiza en un autoanalyzer de aminoácidos, el cual está constituido de: sistema de introducción de la muestra, sistema separa dor (columna), sistema detector y sistema registrador. El sistema detector es un colorímetro que trabaja a una longi tud de onda intermedia (410 nm).

La cromatografía de gases, ha sido propuesta pero su uso no ha sido posible; parece ser, que no pueden hacerse extensivos los resultados con proteínas puras a los materiales complejos, como son las mezclas de proteínas con otros materiales, como son los alimentos.

#### 1.5.4 METODOS MICROBIOLOGICOS. (14)

Los ensayos microbiológicos, son los que pueden utilizarse a gran escala para la determinación de metionina, y parece ser uno de los mejores. Las ventajas de este método son que no se requiere de un equipo especializado ni costoso. La desventaja es que la precisión es relativamente baja, por lo que se requiere de personal capacitado en manipulaciones microbiológicas.

Dunn y col., encontraron que la metionina puede ser cuantificada con *Leuconostoc mesenteroides* P-60. Stokes y col., emplearon *Str. faecalis* para la determinación de metionina en varias proteínas y alimentos.

#### 1.6 METABOLISMO DE METIONINA. (1,15).

En sujetos humanos normales cerca del 90% de la metionina ingerida es convertida a cist(e)ína, vía ruta de transsulfuración.

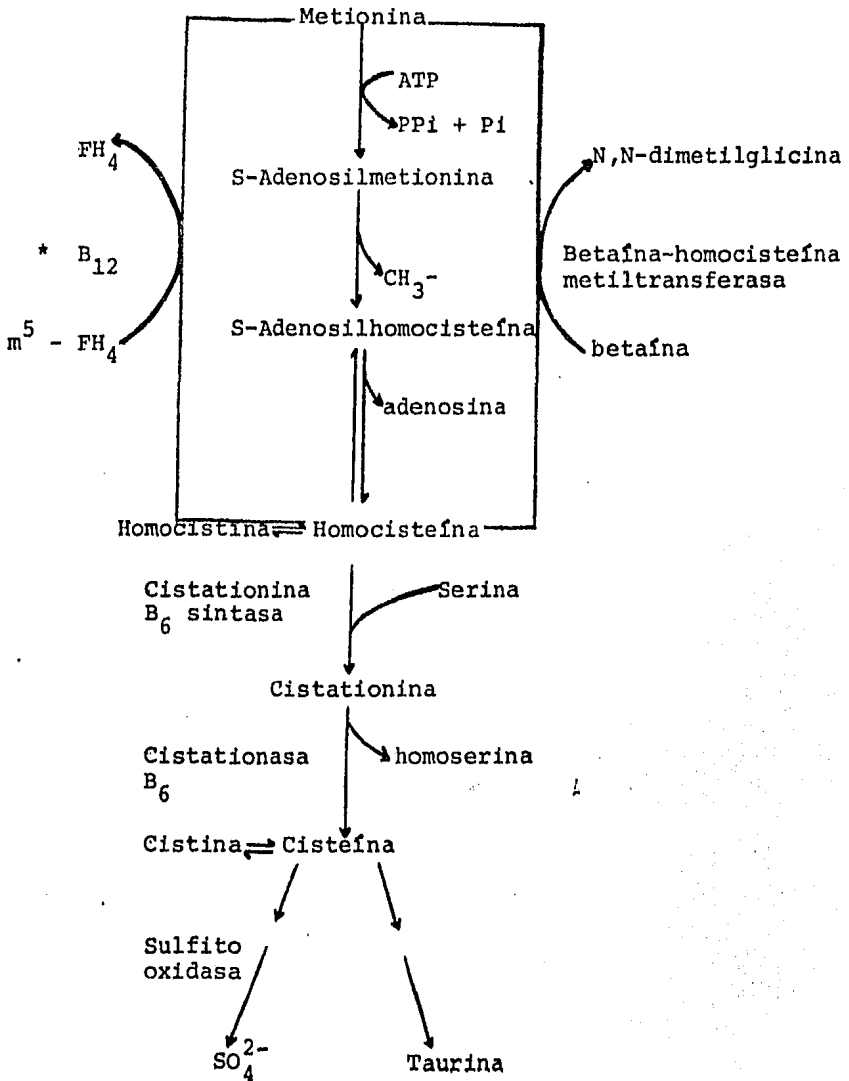
En la ruta de transsulfuración, la L-metionina se condensa primero con ATP formando S-adenosil-metionina ("metionina activa"). El grupo S-metilo activado, es luego transferido a cualquiera de una amplia variedad de compuestos aceptores. Los compuestos cuyos grupos metílicos

derivan de la S-adenosil metionina incluyen a las betaínas, colina, creatina, epinefrina, melatonina, sarcosina, varios aminoácidos N-metilados y diversos alcaloides de origen vegetal. Después de la eliminación del grupo metilo, se forma S-adenosilhomocisteína más adenosina. La homocisteína se condensa con una molécula de serina formando el aminoácido cistationina. El desdoblamiento hidrolítico de la cistationina forma L-homoserina y cisteína, de manera que el efecto neto es la conversión de la homocisteína en homoserina y de la serina en cisteína. Estas dos reacciones, por lo tanto, también intervienen en la biosíntesis de la cisteína a partir de la serina. La homoserina, es entonces convertida en alfa-cetobutirato, en una reacción catalizada por la homoserindeaminasa. La conversión del alfa-cetobutirato en propionil-CoA tiene lugar enseguida, de la manera usual para la descarboxilación oxidativa de los alfa-cetoácidos, que forma derivados de la acil-CoA, por ejemplo: piruvato, alfa-cetoglutarato. Lo anterior se resume en el diagrama I.

#### 1.6.1 EFECTO DE LA VITAMINA B<sub>6</sub> Y B<sub>12</sub> EN EL METABOLISMO DE METIONINA.

La metionina, homocisteína, serina y glicina, están involucradas en el metabolismo del ácido fólico y por lo tanto indirectamente en la producción de DNA timina; la variación en la cantidad de esos aminoácidos afecta la megaloblastosis. La megaloblastosis es caracterizada mor

Diagrama I



\*  $\text{N}^5$ -metiltetrahidrofolato-homocisteína metiltransferasa.

fológicamente por maduración nuclear retardada y bioquímicamente por síntesis defectuosa del DNA. La regeneración del ácido tetrahidrofólico (THFA) de 5-metil THFA, depende de la vitamina B<sub>12</sub> y requiere la metilación de la homocisteína a la forma de metionina. La disminución de esta vitamina, reduce la transmetilación y puede disminuir los niveles de metionina, los cuales son bajos en la anemia perniciosa. (16)

El efecto de una deficiencia de vitamina B<sub>6</sub> en el metabolismo de metionina es hasta ahora poco conocido. (17)

#### 1.6.2 EFECTOS BIOLÓGICOS DE LA METIONINA.

##### 1.6.2a Efectos carenciales y tóxicos.

En el hombre han sido realizados estudios que indican que la pérdida de apetito y un balance de nitrógeno negativo, son resultados de la ausencia de algunos aminoácidos.

Rose y col., afirman que los requerimientos de metionina en el hombre joven están entre los límites de 800-1,100 mg/día en ausencia de cistina, para este cálculo se tomó en consideración que la cistina podría reemplazar 80-89% de los requerimientos mínimos de metionina. (18).

Reynolds y col., reportan que 290 mg de metionina más 260 mg de cistina mantienen el equilibrio de nitrógeno en el hombre joven. (19)

La deficiencia de metionina causa daños hepáticos y renales. La metionina y algunos otros metil donadores,

actúan como agentes lipotrópicos para curar hígados grasosos, debidos a la deficiencia de colina. La colina puede ser sintetizada usando grupos metilo lábiles, donados por la metionina en el proceso de transmetilación. (15)

Al compararse los efectos en el crecimiento de pollos, de una dieta deficiente y en exceso en metionina, se encontró que los pollos alimentados con una dieta deficiente, retuvieron menos proteína, excretaron más nitrógeno en forma de ácido úrico y el peso corporal ganado fue menor, que los pollos alimentados con un exceso de metionina. (20)

La metionina tiene varios compuestos antagónicos, uno de ellos es la etionina, que también causa hígados grasosos. La acción de la etionina, se piensa que sea debida a una declinación en el RNA mensajero y la síntesis proteica, causada por una reducción en la disponibilidad de ATP. Esto ocurre, cuando la etionina que reemplaza a la metionina en la S-adenosil metionina atrapa adenina disponible y así evita la síntesis de ATP. Esta hipótesis está sostenida, por el hecho de que el efecto de la etionina puede ser invertido por la administración de ATP o adenina. (15)

Así como la deficiencia causa la formación de hígados grasosos, los procesos que utilizan excesivamente los grupos metilo, o las dietas pobres en proteínas (conteniendo metionina) o lecitina (conteniendo colina), tienden todos a favorecer la producción de hígados grasosos. (15)

Los estudios realizados sobre el consumo de niveles

excesivos de metionina, indican que al menos tres rutas están involucradas en la utilización del grupo metilo de la metionina. Una involucra la síntesis de colina, otra la formación de sarcosina (N-metil glicina). La tercera ruta, es competitivamente inhibida por la S-metil-L-cisteína y parece que utiliza una gran parte de metionina, a concentraciones altas de ésta. Por esta ruta, se forma un producto tóxico, es un intermediario en la degradación de metionina. (21).

Un exceso de metionina en la dieta ingerida por ratas, causa retraso en el crecimiento y efectos patológicos en órganos como el bazo o páncreas. Cuando la ingestión de energía es limitada, el exceso de metionina produce una mayor reducción de lípidos en el cuerpo, por lo que este exceso parece acrecentar los requerimientos de energía, probablemente por su catabolismo. (22)

Para disminuir la toxicidad de metionina en ratas machos, éstas se alimentaron con niveles altos de retinol. El tratamiento parece no ser tóxico, porque afecta el crecimiento y la cantidad de alimento ingerido. En las ratas machos tratadas con retinol, se presentó un mejor crecimiento e ingestión de alimento, un incremento en el almacenamiento de retinol en el hígado y también cerca de un 50% de decremento en la concentración de metionina en plasma. Sin embargo, la oxidación de metionina a  $\text{CO}_2$  no es significativamente incrementada. (23). El tratamiento con

retinol (800 UI/g dieta por 10 días), parcialmente contraresta el efecto causado por la ingestión elevada de metionina. Para disminuir la toxicidad de metionina se utiliza glicina o serina en ratas machos pretratadas con un exceso de retinol; las pretratadas tienen una mayor respuesta a pequeños suplementos con glicina o serina y mantienen el máximo nivel de crecimiento en un amplio rango de suplementación. (24)

#### 1.6.2b Producción de Arterioesclerosis.

Se ha demostrado experimentalmente que la homocist(e)-inuria elevada produce placas de arterioesclerosis. La única fuente significativa de homocist(e)ina es la metionina de la proteína contenida en la dieta, por lo que las dietas que tienen altas concentraciones de metionina producen arterioesclerosis en el hombre, aunque no hay información disponible sobre si la restricción de metionina reduce la arterioesclerosis. (17).

#### 1.6.2c Efecto antiinflamatorio y analgésico.

La DL-metionina produce efectos antiinflamatorios y moderada actividad analgésica, en ratas con edema inducido por carragenina, o artritis inducida por formaldehído, o en ratas con sacos de granuloma. Por esta razón podría atribuirsele como un efectivo antiinflamatorio que no causa irritación gástrica. (25)

#### 1.6.2d Efecto en la cicatrización.

Trabajos experimentales han permitido probar que la



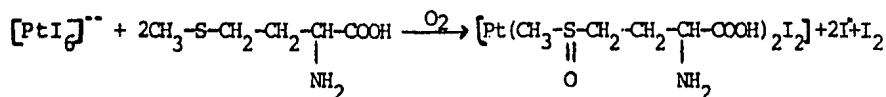
metionina es un aminoácido esencial para corregir los efectos frenadores de la hipoproteïnemia. La administración de este aminoácido, a los animales sometidos a dietas con bajo contenido proteico, mejora rápidamente la curación de la herida. La metionina es transformada en cistina y, en esta forma, es utilizada en el proceso reparativo, aunque el mecanismo de su acción no es conocido. (26)

## II. PARTE EXPERIMENTAL

Para el presente trabajo, se escogió el método de yodoplatinato propuesto por N.L. Njaa, por las ventajas que se mencionaron anteriormente.

### FUNDAMENTO.

La determinación cuantitativa de metionina se basa en la reacción de oxidorreducción que se efectúa entre el sulfuro y el ión yodoplatinato; el platino es reducido y el sulfuro presente es oxidado a sulfóxido. Se forma un complejo, que presenta una menor absorción a una mayor concentración de metionina, debido a la decoloración que sufre el ión yodoplatinato. El complejo es medido a una longitud de onda de 505 nm. (27)



### REACTIVOS:

Solución Buffer de fosfatos, 0.15 M pH=7. (30)

Solución estándar de metionina 1 mM y 0.1 mM. (Sigma Co. St. Louis, Mo.)

Solución de Hexayodoplatinato de potasio, K<sub>2</sub>(PtI<sub>6</sub>). Para prepararla se pesan 30 mg de yodoplatinato sólido (Merck, México). Se disuelven en 0.3 ml de agua destilada, de esta solución se toman 0.05 ml y se colocan en un matraz aforado de 50 ml. Se adicionan 2 ml de yoduro de potasio

(0.66 M) y 2 ml de agua destilada, se mezclan y se pone al abrigo de la luz durante 12 horas. Después de este tiempo, la solución se afora con ácido acético (1 M). Ambas soluciones se guardan en refrigeración.

Se realizó la curva estándar de metionina, se fijaron las condiciones a las cuales es reproducible y se encontraron los límites de concentraciones en que se tiene linearidad. (Tabla I).

Tabla I

Solución estándar de metionina 1 mM (ml)	Solución Buffer de fosfatos (ml)	Solución de Hexayodoplatinato (ml)
0.1	0.9	1
0.2	0.8	1
0.3	0.7	1
0.4	0.6	1
0.5	0.5	1
0.6	0.4	1
0.7	0.3	1
0.8	0.2	1
0.9	0.1	1
1.0	0.0	1
*0.0	1.0	1

\*Blanco. El % de transmitancia del blanco se resta al % de transmitancia obtenido en los tubos que contienen diferentes concentraciones de metionina.

Después de la adición del Hexayodoplatinato, los tubos se colocaron en un baño de agua a 30°C, durante 10 minutos. La lectura se hizo a una longitud de onda de 505 nm. Se ajustó al 100% de Transmitancia con solución buffer de fosfatos pH=7, ya que con el blanco todos los puntos de la curva daban una lectura mayor del 100% de Transmitancia, debido a que a mayor concentración de metionina, menor es la coloración que se presenta, es decir ocurre una decoloración. El color que se observa es tinto o vino. Las lecturas de % de Transmitancia que se obtuvieron estaban en el rango de 70-95% de Transmitancia, por lo que se procedió a disminuir la cantidad de solución de hexayodoplatinato, adicionando 0.5 ml y a aumentar la cantidad de solución buffer de fosfatos. Al correr la curva con estas modificaciones, se logró que los valores de % de Transmitancia estuvieran dentro de una zona aceptable: 40-65% de Transmitancia. La curva modificada es la que se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2

Solución estándar de metionina 0.1 mM (ml)	Solución Buffer de fosfatos (ml)	Solución de Hexayodoplatinato (ml)
0.1	1.4	0.5
0.2	1.3	0.5
0.3	1.2	0.5
0.4	1.1	0.5
0.5	1.0	0.5
* 0.0	1.5	0.5

\*Blanco

Como se puede observar, el volumen total de los tubos es de 2 ml y la solución estándar de metionina fue menos concentrada (0.1 mM).

Al trazar la curva estándar, graficando absorbancia contra microgramos de metionina, se observa una recta con pendiente negativa, y que sigue una linealidad en el siguiente rango de concentración: 1.492-7.460 microgramos de metionina (0.1-0.5 ml de solución estándar de metionina 0.1 mM).

La curva estándar quedó establecida, procediéndose al análisis de las muestras de origen animal y vegetal. Las muestras estudiadas fueron las siguientes:

NOMBRE	% PROTEINA
Gelatina	98.33
Frijol Bayo blanco	18.33
Soya	45.45
Semilla de cacahua nano desengrasada (Gliricidia sepium)	55.26
Aislado protéico de plasma de suero de bovino	82.83
Frijol Negro de Que rétaro	21.95
Semilla de Erythri- na breviflora desen- grasada, sin alcaloide	47.52
Harina de trigo	9.42
Semilla de algodón desengrasada	26.45
Lisozima	90.00
Leche en polvo des- cremada	35.32
Caseína	91.10
Huevo desengrasado	62.00
Proteína de ajonjolí	57.61
Albumina de huevo	75.68

Para la determinación de metionina se utilizaron 7 muestras de origen animal y 8 de origen vegetal.

**PRIMER ENSAYO:**

El método propuesto por N.L. Njaa, incluye una hidrólisis alcalina, pero debido a que los datos cromatográficos fueron obtenidos a partir de hidrolizados ácidos, se pensó en hacer una modificación del método, haciendo una hidrólisis ácida. Por lo que se siguió la metodología ya conocida. (6)

Se corrió la curva estándar y se realizó la reacción colorida con el reactivo de hexayodoplatinato de potasio de los hidrolizados ácidos. Se tomó una alícuota no mayor de 1.5 ml del hidrolizado, tratando de que las lecturas de % de Transmitancia quedaran dentro de la curva estándar.

Las muestras que se utilizaron fueron 5. En la tabla 3 se muestran los resultados.

Tabla 3

MUESTRA	CONTENIDO DE METIONINA (mg met/g N)	
	METODO CROMATOGRAFICO	METODO COLORIMETRICO
Harina de trigo	104.94	530.47
		517.21
Albumina de huevo	292.61	482.625
		442.0
Gelatina	50.935	10.56
		21.58
Huevo desengrasado	275.635	431.0
		358.0
Caseína	195.795	202.62

Haciendo un análisis de la tabla anterior, se concluyó que se estaban cuantificando metionina y otros compuestos azufrados, puesto que los valores resultados ser muy elevados, excepto en la muestra de gelatina cuyo valor obtenido por el método colorimétrico fue más bajo que el valor cromatográfico.

#### SEGUNDO ENSAYO:

Por los resultados obtenidos en el primer ensayo, se decidió realizar la hidrólisis alcalina propuesta por N.L. Njaa (ver diagrama 2).



**MATERIAL Y EQUIPO**

Tubos de ensayo de 13 X 100 mm

Pipetas volumétricas (10 ml)

Pipetas graduadas

Matraces aforados de 50 ml

Embudos de cola larga

Tubos de vidrio con tapón de rosca (capacidad 50 ml)

Varillas de vidrio

Vasos de precipitado de 100 ml

Balanza Analítica

Espectrofotómetro Coleman Junior II A

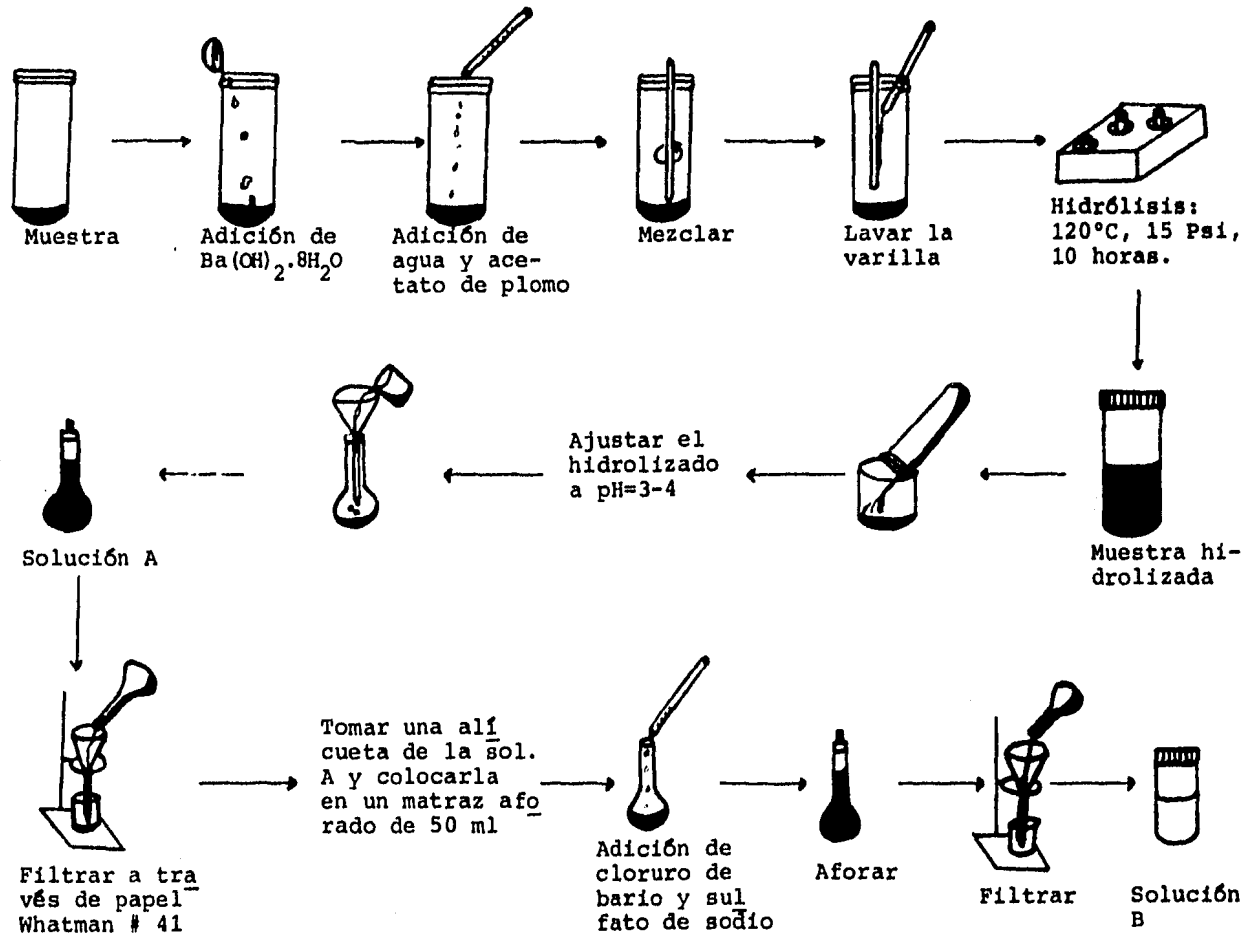
pH metro Corning Modelo 10

Digestor 20/40, Tecator ab

**PROCEDIMIENTO:**

Se pesa una cantidad de material que contenga 100 mg de proteína, se colocan en tubos de vidrio con tapón, se adicionan 2.1 gramos de  $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ , 2.5 ml de agua destilada, 0.25 ml de acetato de plomo (0.1 M), se mezcla perfectamente con una varilla de vidrio, la cual se lava con una pequeña cantidad de agua destilada (aproximadamente 5 ml). Los tubos se cierran con tapón de rosca y se colocan en el digestor durante 10 horas, a 15 Psi y a 120°C. Después de transcurrido el tiempo indicado, los tubos se enfrían. El hidrolizado se transfiere a un vaso de precipitado y se ajusta a un pH=3-4 con ácido clorhídrico (6N). Se transfiere el hidrolizado a un matraz aforado de 50 ml,

DIAGRAMA 2



llevándose a la marca con solución buffer de fosfatos (0.15 M, pH=7). Solución A.

La solución A se filtra sobre papel Whatman # 41. Se toma una alícuota de 10 ml, y se coloca en un matraz aforado de 50 ml. Se adicionan 6 ml de cloruro de bario (0.53 M) y 6 ml de sulfato de sodio (0.56 M), se agita y finalmente se afora con solución buffer de fosfatos. Se filtra sobre papel Whatman # 41. Solución B.

Se toma una alícuota de la solución B, no mayor de 1.5 ml, para hacer la medición de metionina con el reactivo de hexayodoplatinato. La cantidad de metionina presente en los hidrolizados, se obtiene interpolando las absorbancias en una curva estándar. Las determinaciones fueron hechas por duplicado en cada muestra.

CALCULOS:

$$\begin{aligned} & \mu\text{g de metionina} \times \frac{1 \text{ mg de metionina}}{1000 \mu\text{g de metionina}} = \\ & = \text{mg de metionina} \times \frac{\text{Aforo de Solución A}}{\text{Alícuota de Solución A}} \times \frac{\text{Aforo de Solución B}}{\text{Alícuota de Sol. B}} \\ & = \frac{\text{mg de metionina}}{100 \text{ mg de Proteína}} \times \frac{100 \text{ mg de Proteína}}{16 \text{ mg Nitrógeno}} \times \frac{1000 \text{ mg Nitrógeno}}{1 \text{ g Nitrógeno}} \\ & = \frac{\text{mg metionina}}{\text{g Nitrógeno}} \end{aligned}$$

Dependiendo de la muestra es el factor que se utiliza: 6.25 para la mayoría de las muestras, 6.38 para la leche y derivados, y 5.71 para la soya.

**TERCER ENSAYO:**

Este experimento tuvo por objeto averiguar si la cistina interfiere en la determinación de metionina por el método de yodoplatinato. Para esto se realizó el siguiente diseño experimental:

Se seleccionó una muestra cuyo valor obtenido por el método colorimétrico fuera casi igual al cromatográfico, por lo que se eligió caseína. Se hicieron los hidrolizados alcalinos con cinco variantes, siendo estas las siguientes:

a) Caseína; b) Caseína + Metionina (1 mg); c) Caseína + Cistina (0.2 mg); d) Caseína + Cistina (0.2 mg) + Metionina (1 mg); e) Sin Caseína + Metionina (1 mg) + Cistina (0.2 mg). Se adicionó un miligramo de metionina que equivale de acuerdo a su contenido de nitrógeno a 63.81 mg de metionina/ g de nitrógeno. La cantidad de metionina y cistina adicionada equivale al 30% del contenido de ambos aminoácidos en la caseína.

La metionina y cistina se adicionaron antes de efectuar la hidrólisis alcalina, con el objeto de determinar la cantidad de metionina y cistina que se pierde durante la hidrólisis.

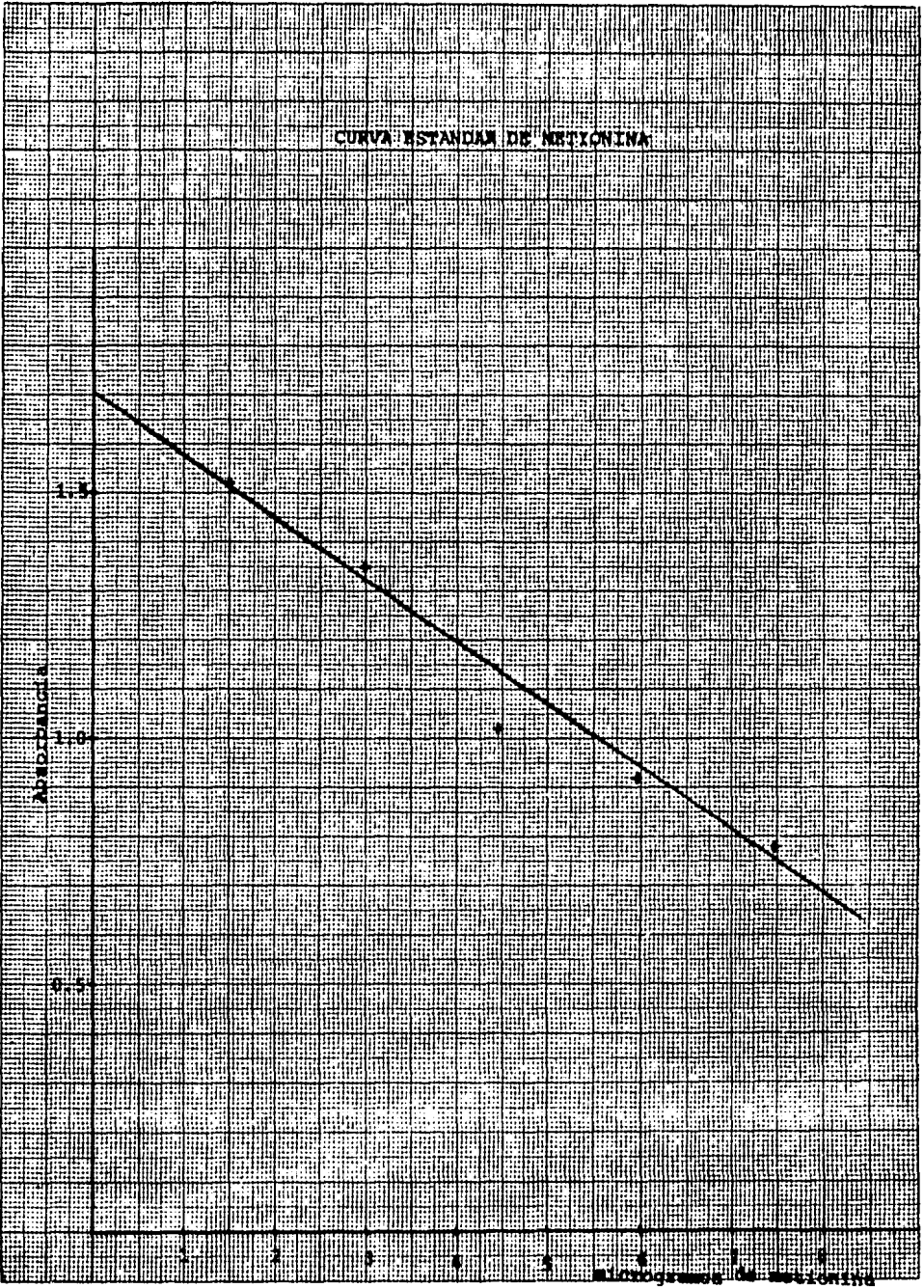
**CUARTO ENSAYO:**

En este experimento se trató de averiguar si era posible hacer la determinación de metionina por el método de

Nitroprusiato (9), a la misma concentración que en el método de Yodoplatinato, para esto se emplearon los hidrolizados alcalinos.

ANALISIS ESTADISTICO. Se realizó un análisis de varianza y se determinó t de Student, Coeficiente de correlación lineal y Coeficiente de correlación poblacional.

CURVA ESTANDAR DE METIONINA



### III. RESULTADOS Y DISCUSION

En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos. Como se observa, en algunas muestras el valor es un poco menor y en otras mayor, pero en general son casi iguales los valores colorimétricos a los cromatográficos.

En la tabla 5 se muestran los resultados del tercer ensayo, que tenía como propósito calcular el % de recuperación de metionina y la posible interferencia de cisteína y cistina. Como se puede observar la adición de cistina no incremento los valores de metionina.

En el cuarto ensayo no se obtuvo ningún resultado, pues como ya se había mencionado es de muy baja sensibilidad el método de Nitroprusiato, y no fué posible detectar la metionina a las concentraciones en que se encuentra en los hidrolizados.

Tabla 5

MUESTRA	% TRANSMITENCIA	mg METIONINA/g N	% RECUPERACION DE METIONINA
Caseína	48.75	198.24	
Caseína + Metionina (1 mg)	42.25	276.71	105.59
Caseína + Cisteína (0.2 mg)	49.25	203.72	102.76
Caseína + Cisteína (0.2 mg) + Metionina (1 mg)	41.75	237.21	90.52
Metionina (1 mg) + Cistina (0.2 mg)	40.5	58.33	91.41

Tabla 4

MUESTRA	CONTENIDO DE METIONINA (mg met/g N)	
	METODO CROMATOGRAFICO	METODO COLORIMETRICO
Gelatina	50.935	50.87
Frijol Bayo Blanco	61.74	101.92
Soya	67.95	112.77
Semilla de cacahu- nana desengrasada (Gliricida sepium)	78.02	88.955
Aislado proteico de plasma de suero de bovino	80.737	133.717
Frijol Negro de Querétaro	80.92	95.67
Semilla de Erythri- na breviflora desen- grasada, sin alca- loide	83.21	78.074
Harina de trigo	104.94	110.15
Semilla de algodón desengrasada	115.575	132.53
Lisozima	172.795	174.78
Leche en polvo des- cremada	175.45	155.32
Casefna	195.795	191.25
Huevo desengrasado	275.635	236.20
Protefna de Ajonjolí	285.35	171.55
Albumina de huevo	292.61	245.29



## ANALISIS ESTADISTICO

Se realizó un análisis estadístico de los resultados obtenidos por los métodos: colorimétrico y cromatográfico, determinándose: t de Student, Coeficiente de correlación lineal, Coeficiente de correlación poblacional y un análisis de Varianza (F). (28,29)

El coeficiente de correlación lineal obtenido fue de 0.91, este valor muestra la existencia de una relación lineal entre los métodos. Los valores de t de Student y F calculados, indican que no hay diferencia significativa entre los métodos, puesto que el valor teórico es mayor al calculado en ambas pruebas. En la tabla 6 se muestran los valores teóricos y calculados.

Tabla 6

	Teórico	calculado
t de Student	1.76	0.265
F	4.20	0.01

Nivel de Significancia = 5%

Probabilidad = 95%

Coeficiente de correlación poblacional.

Este coeficiente relaciona el coeficiente de correlación lineal ( $r$ ) con los grados de libertad ( $n-2$ ).

La fórmula para obtener el coeficiente de correlación poblacional es la siguiente:

$$t_o = r \sqrt{\frac{n-2}{1-r^2}}$$

Hipótesis: Si  $t_o = 0$ , se dice que los valores colorimétricos (X) y los cromatográficos (Y) son no correlacionados.

Si  $t_o = c$  (valor teórico) no se rechaza la hipótesis

Si  $t_o > c$  se rechaza la hipótesis.

En nuestro trabajo para 13 grados de libertad ( $n-2$ ), y un nivel de significancia del 5%:  $c = 1.77$ .

$t_o$  presenta un valor de 7.95, por lo tanto se rechaza la hipótesis, debido a que  $t_o$  es mayor que  $c$ , por lo que existe una correlación en los valores de X (método colorimétrico) y Y (método cromatográfico).

## IV. CONCLUSIONES

El método colorimétrico de yodoplatinato es útil por que cuantifica pequeñas cantidades de metionina (microgramos), siendo más sensible que los métodos colorimétricos existentes.

En un método fácil de reproducir, rápido para llevarse a cabo y no requiere de equipo especializado.

Los hidrolizados no presentan problemas de coloración, así como no hay interferencia de los aminoácidos cistina y cisteína en la cuantificación de metionina.

No existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos por el método de yodoplatinato y el método cromatográfico.

Aunque el reactivo de yodoplatinato es caro, este método no resulta ser tan costoso, debido a que las cantidades del reactivo que se utilizan son pequeñas (miligramos).

## V. BIBLIOGRAFIA

1. Fox, S. and Foster, J. Introduction to protein chemistry. Pp. 5, 75, New York: Wiley. (1957).
2. Orr, M.L. and Watt, B.K. Amino acid content of foods. Home Economic Rpt. 4. U.S. Dept. Agr. (1957).
3. Matsumoto, G.; Sakai, M.; Nakata, S. and Kawabata, T. (Sumitomo chemical Co., Ltd.). Recovery of useful compounds from exhaust gas produced by methionine synthesis. Offen 3, 1, 806, 31 Jul. 1980, Japan. Appl. 79/7, 852, 25 Jan. 1979; Pp. 16.
4. Meister, A. Biochemistry of amino acids. Pp. 119-121, Academic Press, N.Y. (1957).
5. Maynard, L. and Lossli, J. Nutrición animal. Pp. 125, UTEHA, México. (1975).
6. Anfinsen, C.B.; Anson, M.L.; Edsall, J.T. and Richards, F.M. Advances in protein chemistry. Academic Press, Vol. 20, N.Y. (1965).
7. Greenstein and Winitz. Chemistry of amino acids. Vol. 2, Pp. 2131-2137, New York: Wiley.
8. Ussary, J.P. and Gehrke, C.W. Advances in automated analysis 2nd Technicon International Congress. Vol. 2, Pp 89,, 1970.
9. McCarthy, T.E. and Sullivan, M.X. A new and highly specific colorimetric test for methionine. J. Biol. Chem. 141: 871, 1941.

10. Hess, W.C. and Sullivan, M.X. The cysteine, cystine and methionine content of proteins. *J. Biol. Chem.* 151: 635, 1943.
11. Njaa, L.R. A method for determination of unoxidized and total methionine in protein concentrates, with special reference to fish meals. *Br. J. Nutr.* 43: 339, 1980.
12. Inglis, A.S. and Edman, P. Mechanism of cyanogen bromide reaction with methionine in peptides and proteins (I) Formation of ionidate and methyl thiocyanate. *Anal. Biochem.* 37: 73, 1970.
13. Skoog, D.A. and West, D.M. *Análisis Instrumental*. Pp. 730, Editorial Interamericana, México. (1984).
14. Horn, M.J. and Jones, D.B. Microbiological determination of methionine in proteins and foods. *J. Biol. Chem.* 157: 153, 1945.
15. Harper, H. *Manual de química fisiológica*. Pp. 343, 344, 387, 400, 401, 413. Editorial "El manual moderno, S.A.", México. (1976).
16. Waxman, S.; Corcino, J. and Herbert, J. Aggravation or initiation of megaloblastosis by amino acids in the diet. *J. Am. Med. Assoc.* 214: 101, 1970.
17. McCully, K.S. and Ragsdale, B.D. Production of arteriosclerosis by homocysteinemia. *Amer. J. Path.* 61:1, 1970.
18. Rose, W.C. and Wixon, R.L. The amino acid requirements

- Olman. XIII. The sparing effect of cystine on the methionine requirement. *J. Biol. Chem.* 216-763, 1955.
19. Reynolds, M.; Steel, D.L.; Jones, E.M. and Baumann, C.A. Nitrogen balances of women maintained on various levels of methionine and cystine. *J. Nutr.* 64: 99, 1958.
  20. Hiroshi, U.; Hiro-omi, Y.; Mitsuaki, O. and Iwao, T.A comparative study of dietary methionine deficiency and excess in chicks. *Nutrition Reports International* 24 (1): 85, 1980.
  21. Norlin, J.B. Toxicities of methionine and other amino acids. *J. Agr. Food Chem.* 22 (1), 1974.
  22. Fau, D. and Peret, J. Methionine excess and energy requirement of rats. *Nutr. Rep. Int.* 22(5): 751, 1980.
  23. Peng, Y.S. and Evenson, J.K. Alleviation of methionine toxicity in young male rats fed high levels of retinol. *J. Nutr.* 109 (2): 281, 1979.
  24. Peng, Y.S.; Rusell, D.H. and Evenson, J.K. Alleviation of methionine toxicity by glicine and serine in rats pretreated with excess retinol. *Nutr. Rep. Int.* 23 (2) 303, 1981.
  25. Khanna, N.K. and Jain, P. DL-methionine: A potent antiinflammatory and analgesic compound. *Asian Med. J.* 23 (2): 860, 1980.
  26. Pera, Blanco-Morales, C. Fundamentos biológicos de la

- cirugía. Salvat, México. (1971).
27. Sease, J.W.; Lee, T.; Holzman, G.; Swift, H.E. and Niemann, C. Quantitative methods for certain organic sulfides. *Analyt. Chem.* 20: 431, 1948.
  28. Spiegel, R. Murray Ph. D. Teoría y problemas de Probabilidad y Estadística. Pp. 346, 348, Mc Graw-Hill, México. (1975).
  29. Kreyzing, E. Introducción a la Estadística Matemática, Principios y métodos. Editorial Limusa, México. (1976).
  30. Colowick, S.P. Methods in enzymology. Ed. by S.P. Colowick and N.O. Kaplan. New York, Academic. (1955).