

## Determinación por cromatografía de aminoácidos en *Iridaea ciliata* e *Iridaea laminarioides*\*

B. Matsuhiro Y. y R.E. Meza L.\*\*

---

*RESUMEN:* Se estudió el contenido de aminoácidos libres y de aquellos provenientes de hidrolizados de proteínas en *Iridaea ciliata* e *Iridaea laminarioides*, por cromatografía en papel y en placas de celulosa. La composición de aminoácidos en ambas algas es muy similar. Los aminoácidos glicina, alanina, arginina, ácido glutámico y ácido aspártico son los que se encuentran en mayor proporción.

*SUMMARY:* Free amino acids and protein amino acids from *Iridaea ciliata* and *I. laminarioides* were analyzed by paper chromatography and cellulose thin layer chromatography. The two species of red algae examined have a similar composition of amino acids. Glycine, alanine, arginine, glutamic acid and aspartic acid are present in major proportion.

---

\* Manuscrito revisado y aprobado en forma definitiva en Octubre de 1981.

\*\* Departamento de Química, Facultad de Ciencia, Universidad de Santiago de Chile, (ex-Universidad Técnica del Estado).

---

Desde que Pearsall y Fogg<sup>1</sup> estudiaron la posibilidad de usar algas, especialmente del género *Chlorella* como fuente alimenticia, se han publicado muchos trabajos<sup>2-10</sup> sobre el estudio del contenido de aminoácidos libres y de hidrolizados de proteínas en algas pardas, verdes y rojas. Se ha encontrado que una proporción significativa del contenido total de nitrógeno en las algas proviene de aminoácidos libres.

En este aspecto, resulta interesante el estudio del contenido de aminoácidos libres por cuanto proporciona una indicación de la cantidad de nitrógeno directamente asimilable.

Landsberger y colaboradores<sup>11</sup> estudiaron el contenido de aminoácidos libres en tres especies de algas pardas del litoral chileno. En este trabajo se informan los resultados preliminares obtenidos en el estudio de dos especies de algas rojas *Iridaea ciliata* e *Iridaea laminarioides*, que crecen en el litoral chileno. Silva y colaboradores<sup>12</sup> estudiaron el contenido total de aminoácidos en *I. laminarioides* sin diferenciar aquellos que se encontraban al estado libre.

Por otra parte, los polisacáridos solubles tipo carragenano de estas dos especies fueron estudiados en nuestro grupo<sup>13,14</sup>, como también el contenido de esteroides de los mismos<sup>15</sup>. Con el estudio del contenido de aminoácidos se pretende ahondar en el conocimiento general de los compuestos químicos constituyentes de las algas del litoral chileno.

## PARTE EXPERIMENTAL

Las evaporaciones se efectuaron a presión reducida a una temperatura de 40°. Las cromatografías en papel se desarrollaron sobre papel Whatman N° 1 y las cromatografías en placa delgada sobre placas de celulosa preparadas Merck, con los siguientes sistemas de desarrollo: A) Amoníaco-etanol-agua (1:8:1 v/v); B) Acido acético-l-butanol-agua (15:60:25 v/v); C) Fenol-agua (50:12.5 v/v); D) Amoníaco-l-propanol-agua (2:20:3 v/v); E) Piridina-dioxano-amoniaco-agua (35:35:15:15 v/v) y F) Acetona-l-butanol-ácido acético-agua (35:35:7:23 v/v). Los cromatogramas se revelaron con ninhidrina al 2% en acetona y posterior calentamiento a 100° durante 2 minutos.

Las extracciones fueron realizadas con muestras de algas frescas, recién recolectadas, el alga *Iridaea laminarioides* en Montemar en marzo de 1979 y el alga *I. ciliata* en Caleta Cocholhue en abril de 1979. Para la primera se encontró 67.0% de humedad y para la segunda 64.0% de humedad.

El porcentaje de nitrógeno se determinó por el método de Dumas en el Laboratorio de Microanálisis de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de Chile. Para la especie *I. ciliata* se determinó 2.62% y para *I. laminarioides* 1.45%.

### Extracción de aminoácidos libres.

Muestras de ambas algas frescas, limpias y trozadas (1000 g) se agitaron mecánicamente con 3 litros de etanol al 98% durante 5 horas a temperatura ambiente y se filtró. El proceso de extracción se repitió tres veces más. Los extractos etanólicos se concentraron en evaporador rotatorio hasta sequedad. Obteniéndose para *I. ciliata* 50.1 g de extracto y para *I. laminarioides* 59.5 g de extracto.

Ambos extractos se trataron tres veces con porciones de 20 ml de cloroformo, se llevaron a sequedad y se disolvieron en 10 ml de HCl, respectivamente.

### Purificación y fraccionamiento de extractos de aminoácidos.

Una alícuota de 5 g de cada extracto se disolvió en 10 ml de HCl 0.1 N y se purificó

por pasaje a través de una columna de resina Zeo-Karb 225 (900 g) en forma acida. La columna se eluyó con agua (tres veces el volumen de la columna), y a continuación con  $\text{NH}_4\text{OH}$  2N. La fracción eluida (3 litros) se concentró a sequedad en evaporador rotatorio y el residuo se disolvió en 2 ml de  $\text{HCl}$  0.1 N. La solución se diluyó en agua en la proporción 1:10 y se agregó a una columna de resina De Acidite FF regenerada con hidróxido de sodio y acetato de sodio, en una proporción de 1:1. Se eluyó con agua, a continuación con solución de hidróxido de amonio y finalmente con soluciones de concentración creciente de ácido clorhídrico de acuerdo a la Tabla I.

**TABLA I**

Eluyente	Volumen recogido	Fracción
$\text{H}_2\text{O}$	300 ml	1
$\text{NH}_4\text{OOCCH}_3$ 0.04 N + $\text{NH}_4\text{OH}$ 0.01 N	2000 ml	2
$\text{H}_2\text{O}$	600 ml	3
$\text{HCl}$ 0.05 N	600 ml	4
$\text{HCl}$ 1.0 N	600 ml	5
$\text{HCl}$ 6.0 N	600 ml	6

Las diferentes fracciones obtenidas se concentraron a presión reducida hasta sequedad.

#### **Hidrólisis y fraccionamiento de aminoácidos constituyentes de proteínas.**

Un gramo del residuo de la extracción con etanol se calentó en baño de vaselina a  $110^\circ$  durante 72 horas con 300 ml de  $\text{HCl}$  6 N. Se llevó a sequedad a presión reducida y el exceso de ácido se eliminó por repetidas evaporaciones con adición de agua. El residuo se disolvió en 10 ml de  $\text{HCl}$  0.1 N y se fraccionó por pasaje a través de resina De Acidite FF, de la misma forma que la mezcla de aminoácidos libres.

#### **Identificación cromatográfica de los aminoácidos.**

Las diferentes fracciones obtenidas se disolvieron en agua destilada y se estudiaron por cromatografía en papel unidimensional, en los sistemas A, B y C.

Las cromatografías en placa de celulosa se realizaron con los sistemas de solventes A, B, C y D. Las placas se eluyeron una vez, se secaron bajo campana, se volvieron a ambientar y se eluyeron por segunda vez con el mismo sistema de solventes.

Se realizaron también cromatografías en placas bidimensionales con los sistemas de solventes E y F. Las placas se eluyeron con el sistema E dos veces en el mismo sentido, se secaron y luego se desarrollaron perpendicularmente a la primera dirección con el sistema F.

Se usaron los siguientes aminoácidos patrones: ácido aspártico, lisina, leucina, glicina, ácido glutámico, alanina, metionina, isoleucina, triptofano, arginina y valina.

Los resultados se resumen en las Tablas II y III.

TABLA II

	Fracc. 1	Fracc. 2	Fracc. 3	Fracc. 4	Fracc. 5	Fracc. 6
<b>I. laminarioides</b> (libres)	Arginina	Trazas arginina	—	Trazas de neutros y ácidos	Neutros y ácidos	Neutros y ácidos
<b>I. ciliata</b> (libres)	Lisina arginina	Lisina arginina trazas	—	Trazas de neutros y ácidos	Neutros y ácidos	Neutros y ácidos
<b>I. laminarioides</b> (hidrolizado)	Lisina arginina	Lisina arginina trazas	—	Trazas de neutros y ácidos	Neutros y ácidos	Neutros y ácidos
<b>I. ciliata</b> (hidrolizado)	Lisina arginina	Lisina arginina trazas	—	Trazas de neutros y ácidos	Neutros y ácidos	Neutros y ácidos

TABLA III

	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>
Glicina	+	+	+	+
Arginina	+	+	+	+
Valina	-	+	-	+
Triptofano	+	-	+	-
Isoleucina	-	-	-	-
Ac. aspártico	+	+	+	+
Lisina	-	+	+	+
Leucina	+	+	+	+
Ac. glutámico	+	+	+	+
Alanina	+	+	+	+
Metionina	-	+	-	+

A<sub>1</sub> : aminoácidos libres de **I. laminarioides**

A<sub>2</sub> : aminoácidos de hidrolizado de **I. laminarioides**

B<sub>1</sub> : aminoácidos libres de **I. ciliata**

B<sub>2</sub> : aminoácidos de hidrolizado de **I. ciliata**

(+) : presencia de aminoácidos

(-) : ausencia

## DISCUSION

M. Takagi<sup>7</sup> estudió un total de 32 especies de algas pertenecientes a las divisiones Chlorophycophyta, Phaeophycophyta y Rhodophycophyta encontrando que la composición y proporción en aminoácidos libres era muy variable. Dentro de las especies de la división Rhodophycophyta (algas rojas), sin embargo, encontró que los aminoácidos más abundantes y que aparecían en todas las especies eran alanina, glicina y los aminoácidos glutámico y aspártico. Estos mismos resultados se encontraron en el presente trabajo.

También Takagi estudió los aminoácidos de la especie **I. laminarioides** proveniente de

las zonas de Nanahema y Moheji en el litoral japonés, describe los mismos aminoácidos que se encontraron en nuestro laboratorio con excepción de leucina, entre los aminoácidos libres, que para el caso de la muestra de la costa chilena aparece en proporción considerable.

Cabe señalar que Takagi trabajó con alga secada a 100° y no con muestras frescas.

Los resultados encontrados por Silva y colaboradores para el contenido total de aminoácidos en *I. laminarioides* difieren en que estos autores detectaron isoleucina que no se identificó en este trabajo, pero no encontraron arginina ni triptofano. La ausencia de triptofano se debe probablemente a las condiciones de hidrólisis en medio ácido.

El número de aminoácidos identificados en hidrolizados de ambas algas fue superior al número de aminoácidos libres, siendo aquellos que se encontraron en mayor proporción alanina, ácido glutámico y ácido aspártico. Estos resultados concuerdan con los valores publicados en literatura para otras especies de algas rojas.

Las cromatografías en papel y en placas de celulosa unidimensional en diferentes sistemas de solventes permitieron obtener estas conclusiones. Los resultados obtenidos por cromatografía en placa bidimensional no fueron concluyentes.

Se encontró un porcentaje aproximado de proteína en *I. ciliata* del 16.40/o y en *I. laminarioides* de 9.10/o, estos valores están dentro del rango encontrado para otras algas rojas. En otras especies de algas rojas se ha encontrado mayor porcentaje de proteína, por ejemplo en *Rhodymenia palmata* (23-270/o) y en *Porphyra tenera* (22-420/o), dos especies que forman parte de la dieta humana desde hace muchos años en el noroeste de Europa y en Japón, respectivamente.<sup>16</sup>

---

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece a los profesores A. Candia y A. Poblete (Universidad Católica de Chile, sede Talcahuano), la identificación de las algas. El presente trabajo se realizó con el apoyo económico de DIPLAN II - DICYT de la Universidad de Santiago de Chile.

## BIBLIOGRAFIA

1. PEARSALL, W.H. and FOGG, G.E., Food Sci. Abs., 23, 1 (1951).
2. SMITH, D.G. and YOUNG, E.G., J. Biol. Chem., 205, 849 (1953).
3. COULSON, C.B., J. Sci. Food Agric., 6, 674 (1955).
4. SMITH, D.G. and YOUNG, E.G., J. Biol. Chem., 217, 845 (1955).
5. LEWIS, E.J. and GONZALVES, E.A., New Phytologist, 59, 109 (1960).
6. MUNDA, I.M. and CUBENSEK, F., Bot. Marina XIX, 85 (1956).
7. TAKAGI, M., Bull. Fac. Fish. Hokkaido University, 7, 110 (1956).
8. DURRANT, N.W. and JOLLY, C., Fishery Industrial Research, 5, 2 (1969).
9. IMPELLIZARI, G., MANGIAFICO, S., ORIENTE, G., PIATELLI, M. and SCIUTO, S., FATTORUSSO, E., MAGNO, S., SANTACROCE, C. and SICA, D., Phytochemistry, 14, 1549 (1975).
10. SCIUTO, S., PIATELLI, M. and IMPELLIZARI, G., Phytochemistry, 17, 1659 (1978).
11. LANDSBERGER, W., SCHWENCKE, J. y ABARCA, F., Bot. Marina, XII, 218 (1967).
12. SILVA, F., ETCHEVERRY, H. y QUILHOT, W., Bot. Marina, VIII, 244 (1965).
13. MATSUHIRO, B. y ZANLUNGO, A.B., Rev. Latinoamer. Quím., 7, 119 (1976).
14. MATSUHIRO, B. y ZANLUNGO, A.B., Bot. Marina, XIX, 317 (1976).
15. HERRERA, M.A., Trabajo de titulación para optar a Profesor de Estado en Química y Ciencias Naturales "Estudio preliminar del contenido de esteroides de algas rojas chilenas", USACH, 1980.
16. OGINO, C., Journal of the Tokyo University of Fisheries, 41, 107 (1955).