

## COMUNICACION CORTA

# Pirólisis analítica de la caseína de leche bovina y su secuencia de aminoácidos

Rolando Marbot y María Julia Quintero.

Departamento de Química Analítica, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y Calle 158, Playa, Apartado Postal 6414, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 9 de mayo del 2000. Aceptado: 28 de agosto del 2000.

Palabras clave: claves: caseína, pirólisis, cromatografía de gases, espectrometría de masas, secuencia de aminoácidos.  
Key words: casein, pyrolysis, gas chromatography, mass spectrometry, amino acid sequence.

La caseína está constituida por un grupo de proteínas y puede ser obtenida por precipitación cuando la leche se acidifica. Constituye casi el 80 % del total de las proteínas presentes en la leche de vaca y el 3 % de su peso.

Se utiliza como complemento nutritivo y como pegamento; forma parte de la composición de las pinturas acuosas y se emplea en las fases de acabado de la fabricación del papel y de los textiles.

En las últimas décadas ha surgido un creciente interés por la secuenciación de proteínas, péptidos y ácidos nucleicos mediante la utilización de la Espectrometría de Masas.

En 1984 Boon<sup>1</sup> y en 1987 Boon y De Leeuw<sup>2</sup> propusieron que mediante la Pirólisis-Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (PI-CG-EM) de polipéptidos, proteínas y materiales proteináceos complejos que contienen secuencias de los aminoácidos valina (VAL), leucina (LEU) e isoleucina (ILEU) se obtenían dos grupos de complejos tipo, muy específicos, identificados como 3,5-dialquil-3,4-dihidro-2H-pirrol-2,4-dionas y como 3-alquenil-5-alquil-pirrolidón-2,4-dionas, los cuales contienen información acerca de dímeros de aminoácidos alifáticos (VAL, LEU, ILEU), así como 3,5-dimetil-3,4-dihidro-2H-pirrol-2,4-diona como producto de la secuencia de alanina (ALA-ALA).

Estos dímeros también han sido encontrados durante la pirólisis de muestras de materia orgánica de suelos<sup>3</sup> y en residuos de plantas des-

compuestas<sup>4</sup> debido a la presencia de restos proteicos en estos.

El objetivo de este trabajo fue el estudio de la estructura de la caseína de leche bovina mediante Pirólisis-Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas, así como la determinación de las posibles secuencias de aminoácidos alifáticos presentes en ella.

## Análisis por pirólisis Punto Curie-Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas

Se dispuso de caseína bovina (Fluka, > 95 %), la cual fue suspendida en metanol, depositada en micropipeta y secada con corriente de aire caliente sobre un filamento ferromagnético de punto Curie 400 °C para la realización de la pirólisis (equipo Fisher modelo 0316) directamente acoplada a un cromatógrafo de gases (Fisons serie GC-800) con detector cuadrupolar de espectrometría de masas modelo MD-800.

La separación cromatográfica fue realizada usando una columna de cuarzo SPB-5 (Supelco) de 25 m x 0,32 mm d.i. (0,25 mm de espesor de película), utilizando helio como gas portador.

El horno fue programado a 50 °C isotérmico durante 3 min, con posterior aumento de temperatura a 3 °C/min hasta 300 °C. Las temperaturas del inyector y de la interfase fueron de 275 y 300 °C respectivamente.

Se utilizó un inyector *split-splitless* con válvula cerrada durante los 30 s iniciales. Los espectros de masas fueron obtenidos con una energía de ionización de 70 eV.

La identificación de los productos de pirólisis se realizó con ayuda de los programas especializados Fisons Lab-Base MD-800 Data System y MassLab Version 1.2 Fisons Instruments, así como los atlas Eight Peaks Index of Mass Spectra (MSDC),<sup>5</sup> EPA/NIH Mass Spectral Data Base<sup>6</sup> y otras publicaciones relacionadas.<sup>7</sup>

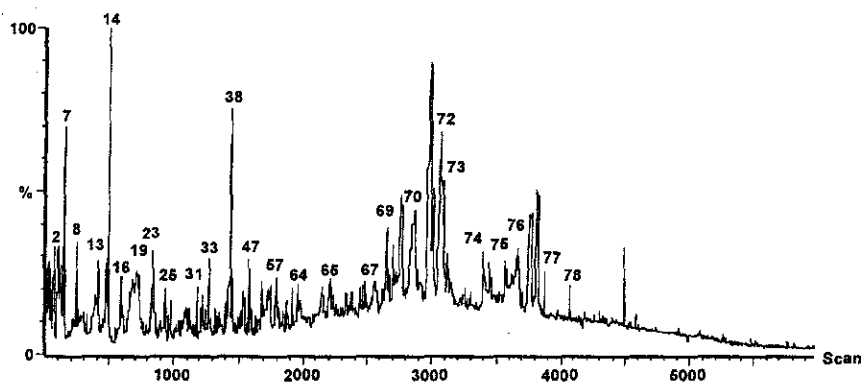
## Identificación de los productos de pirólisis

Como consecuencia de la pirólisis de la caseína se obtuvo un complejo perfil cromatográfico (Fig. 1) en el cual se identificaron 78 productos de pirólisis (Tabla 1).

La mayor parte de estos productos fueron compuestos nitrogenados, aunque también aparecieron compuestos aromáticos y ácidos grasos libres como resultado de la descomposición térmica de la proteína.

Resulta especialmente interesante la aparición de dímeros de los aminoácidos alifáticos valina (VAL), leucina (LEU), isoleucina (ILE) y alanina (ALA), lo que concuerda con los resultados expuestos por Boon y de Leeuw<sup>2</sup> para otros materiales proteináceos complejos.

La aparición de estos dímeros entre los productos de pirólisis de la caseína vacuna indica la presencia de las secuencias de los aminoácidos anteriormente señalados. Específicamente en el caso de la caseína bovina, se detectaron las secuencias ALA-ALA, VAL-VAL, VAL-ILE, ILE-VAL, VAL-LEU, LEU-VAL, ILE-ILE y LEU-LEU.



**Fig. 1.** Cromatograma de los productos de pirólisis de la caseína de leche bovina a 400 °C. (Los números de los picos cromatográficos se corresponden con los de la Tabla 1).

**Tabla 1.** Identificación de los productos de pirólisis de la caseína de leche bovina.

No.	Compuesto	Secuencia
1	acetona	
2	ácido acético	
3	furano	
4	disulfuro de dimetilo	
5	piridina	
6	pirrol	
7	tolueno	
8	2-metilpirrol	
9	3-metilpirrol	
10	7-etilbenceno	
11	estireno	
12	2-etilpiridina	
13	2-furanona	
14	trisulfuro de dimetilo	
15	benzocitrilo	
16	fenol	
17	2-etilpiridina	
18	5-etil-2-metilpiridina	
19	ácido hexanoico	
20	2-butilpiridina	
21	3-piridincarbonitrilo	
22	2,6-dimetilanilina	
23	p-cresol	
24	2,3-dihidroindol	
25	maltol	
26	ácido heptanoico	
27	3,5-dimetil-3,4-dihidro-2H-pirrol-2,4-diona	[ALA-ALA]
28	metilbenzocitrilo	
29	naftaleno	
30	2-etilfenol	
31	tetrasulfuro de dimetilo	
32	ácido octanoico	

Los resultados corroboran las conclusiones de Boon y de Leeuw<sup>2</sup> de que mediante la utilización de la técnica de Pirólisis Punto de Curie-Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas es posible encontrar la secuencia de aminoácidos alifáticos en materiales proteínicos ya que permite hallar las secuencias referidas en la caseína de leche bovina.

**BIBLIOGRAFIA**

1. Boon J.J., Tracing the Origin of Chemical Fossils in Microbial Mats: Biogeochemical Investigations of Solar Lake Cyanobacterial Mats Using Analytical Pyrolysis Methods, *Microbial Mats: Stromatolites*, Alan R. Liss, Inc., New York, USA, 313-342, 1984.
2. Boon J.J., De Leeuw J.W., *J. Anal. Appl. Pyrol.*, **11**, 313, 1987.
3. Saiz-Jiménez C., De Leeuw J.W. *J. Anal. Appl. Pyrol.*, **9**, 99, 1986.
4. Brock T.C.M., Boon, J.J., Paffen B.S.P., *Aquat. Bot.*, **22**, 197, 1985.
5. Eight Peak Index of Mass Spectra, Essential Data from 31101 Mass Spectra, 2nd Ed., Publ. Mass Spectrom. Data Ctr. (MSDC), AWRE, Aldermaton, Reading, UK, 1974.
6. Heller S.R., Milne G.W.A., EPA/NIH Mass Spectral Data Base, Supplement 1, National Standard Reference Data System, National Bureau of Standard, USA, 1980.
7. Tsuge, S., Matsubara, H., *J. Anal. Appl. Pyrol.*, **8**, 49, 1985.

Tabla 1. (continuación)

No.	Compuesto	Secuencia
33	bencenopropanonitrilo	
34	3-(2-metilpropil)-5-(2-metilpropil)-3,4-dihidro-2H-pirrol-2,4-diona	[VAL-VAL]
35	3-(2-metilpropenil)-5-(2-metilpropil)-3,4-pirrolidin-2,4-diona	[VAL-VAL]
36	N,N-dietilbencenamina	
37	8-amino-S-triazolo-4,3-a piridina	
38	indol	
39	8-amino-S-triazolo-1,5-A piridina	
40	ácido nonanoico	
41	acetato de octilo	
42	3-(2-metilpropil)-5-(2-metilbutil)-3,4-dihidro-2H-pirrol-2,4-diona	[VAL-ILE]
43	3-(2-metilbutil)-5-(2-metilpropil)-3,4-dihidro-2H-pirrol-2,4-diona	[ILE-VAL]
44	3-(2-metilpropil)-5-(3-metilbutil)-3,4-dihidro-2H-pirrol-2,4-diona	[VAL-LEU]
45	4-metilquinazolina	
46	3-(2-metilpropenil)-5-(2-metilbutil)-3,4-pirrolidin-2,4-diona	[VAL-ILE]
47	3-(2-metilpropenil)-5-(3-metilbutil)-3,4-pirrolidin-2,4-diona	[VAL-LEU]
48	3-(2-metilbutenil)-5-(2-metilbutil)-3,4-pirrolidin-2,4-diona	[ILE-VAL]
49	3-(3-metilbutil)-5-(2-metilpropil)-3,4-dihidro-2H-pirrol-2,4-diona	[LEU-VAL]
50	1,3,4,6,7,9 A-hexahidro-2H-quinolizina	
51	3-(3-metilbutenil)-5-(2-metilbutil)-3,4-pirrolidin-2,4-diona	[LEU-VAL]
52	1-metilindol	
53	metilpurina	
54	metilpurina	
55	ácido decanoico	
56	3-(2-metilbutil)-5-(2-metilbutil)-3,4-dihidro-2H-pirrol-2,4-diona	[ILE-ILE]
57	3-(2-metilbutil)-5-(3-metilbutil)-3,4-dihidro-2H-pirrol-2,4-diona	[ILE-LEU]
58	3-(2-metilbutenil)-5-(2-metilbutil)-3,4-pirrolidin-2,4-diona	[ILE-ILE]
59	3-(2-metilbutenil)-5-(3-metilbutil)-3,4-pirrolidin-2,4-diona	[ILE-LEU]
60	3-(3-metilbutil)-5-(3-metilbutil)-3,4-dihidro-2H-pirrol-2,4-diona	[LEU-LEU]
61	2-fenilpiridina	
62	3-(3-metilbutenil)-5-(3-metilbutil)-3,4-pirrolidin-2,4-diona	[LEU-LEU]
63	metilpurina	
64	metilpurina	
65	ácido dodecanoico	
66	3-fenoxifenol	
67	metilfenantreno	
68	tetraetilpirazina	
69	ácido tetradecanoico	
70	ácido pentadecanoico	
71	tridecanonitrilo	
72	3,6-bis(2-metilpropil)-2,5-piperazindiona	
73	ácido hexadecanoico	
74	ácido 9-octadecenoico	
75	ácido octadecanoico	
76	2-etil-3,6-dimetil-4(3H)-pirimidinona	
77	3-metil-3H-naft-1,2-eno-indol-10-ol	
78	ftalato de diisooctilo	