

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS QUIMICAS

**LA TIROSINA EN LA ALIMENTACION
Y SUS METODOS DE CUANTEO**

T E S I S

**QUE PRESENTA EL ALUMNO
GUSTAVO ALMENDARO H.
PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICO**

1949

9

9

4



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 esta 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.

DEDICO EL PRESENTE TRABAJO CON
CARIÑO Y GRATITUD A MIS MAESTROS

JUAN CARLOS ACOSTA
1978

CON VENERACION A MIS PADRES

C A P I T U L O I

MONOGRAFIA DE LA TIROSINA.

PROPIEDADES EN GENERAL.

METODOS DE SINTESIS.

TRANSFORMACIONES QUE SUFRE EN LA NATURALEZA.

FORMACION DE LAS MELANINAS.

MONOGRAFIA DE LA TIROSINA

La tirosina fué descubierta por Liebig en el año de 1846. Es la p.hidroxi.fenil.alanina o ácido para.hidroxi.fenil.propionico Liebig la descubrió en el queso de donde toma su nombre (en griego tiros = queso). En el queso de Roquefort se pueden apreciar al microscopio cristalitos de tirosina libre. La existencia de tirosina libre es la causa de la presencia de tiramina en el queso. Es un aminoácido muy abundante tanto en el reino animal como en el vegetal y lo mismo en forma libre que combinado integrando la molécula de muy diversos prótidos en proporción variable. Su aislamiento a partir de productos de hidrolisis de albuminoides es relativamente fácil.

La tirosina no cuenta entre los diez aminoácidos indispensables, pero eso no quiere decir que el organismo lo necesite para su funcionamiento, sino que puede sintetizarla a partir de alguno de esos indispensables. La substancia madre de la tirosina es la fenil alanina que es uno de los diez aminoácidos indispensables y que sufre una oxidación para agregar un oxidrilo en su molécula.



La tirosina como todos los aminoácidos, ofrece diversidad de isómeros entre los principales pueden citarse los siguientes:

PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS; C₁₁H₁₁O₃N, Peso molecular 181.09, Nitrogeno 7.74%. Se presenta en agujas largas, lustrosas, blancas inodoras y de sabor soso. Calentando lentamente se descompone entre 290 y 295° C. Calentando rápidamente se descompone entre 314 y 318° C. Soluble en 2,491 partes de agua a 17° C, y en 13,500 partes de alcohol de 96° frío. Insoluble en acetona, alcohol absoluto y ácido acético. Soluble en ácidos minerales y en álcalis D = 1.456 [α]²⁰ = - 8.07° en HCl al 21% ; [α]²⁰ = - 16.2 en HCl al 4%. La actividad óptica disminuye a medida que aumenta la concentración del HCl. El clorhidrato de tirosina cristaliza con dos moléculas de agua en escamas o prismas monoclinicos solubles en agua y alcohol absoluto.

La tirosina en su forma natural, no se racemiza calentando con ácidos, pero sí lo hace fácilmente calentando con álcalis, siendo el agua de barita una de los que más fácilmente actúan. Para racemizar completamente 50 g. de l-tirosina, se hierve a reflujo durante tres días en (setecientos cincuenta) 750 cm³ de agua con 250 g. de hidróxido de sodio.

El ácido ascórbico promueve la transformación actínica de la tirosina (2) en dihidroxifenilalanina pero además produce una oxidación posterior cuando ya la tirosina por sucesivas transformaciones ha llegado a ser una melanina; la oxidación reduce la melanina a una solución acuosa de una substancia amarilla.

Grupo hidróxido de la tirosina.—(3) Factores que incrementan grandemente su actividad. La actividad del OH de la tirosina (1) fué grandemente aumentada por la adición de sales fosfóricas y el pH aumento inmediatamente (5.9 a 6.9). El AgNO₃ oxida a l en presencia del ion PO₄, pero no en buffers de citrato acetato o ftalato. El efecto se hace presente pero no tan marcado con la oxidación con KMnO₄. A un pH = 5.9 la relación de reacción con (1) aumentó un décuplo por cada 10° de temperatura alcanzados entre 20 y 50°, el KI y algunas preparaciones de almidón retardan la reacción.

Las propiedades reductoras de algunas proteínas fueron reexaminadas, teniendo como base este principio.

La gelatina conteniendo pequeñísimas cantidades de tirosina apenas si dió reacción mientras que la caseína que es una substancia bastante rica en ese aminoácido dió la misma reacción dependiente del PO₄.

ROTACION ESPECIFICA DE LA l-tirosina.—(4) La tirosina es activa a la luz polarizada porque tiene un átomo de carbono asimétrico que es el que soporta el grupo amino y el carbóxilo.

Las iniciales d y l no corresponden exactamente a los isómeros dextrógiro y levógiro, de los cuales se pueden hacer derivar. Los aminoácidos naturales pertenecen todos a la l-serie. Por eso es indispensable para distinguir estos isómeros, consignar dichas letras iniciales seguidas de los signos (+) o (—) que son los que indican el sentido del poder rotatorio del aminoácido. Todo esto es aplicable a la tirosina. La natural es el isómero l (—).

La tirosina (I) preparada por seis métodos distintos tenía $[\delta]^{20} =$
—10.310.2° (HCl 4%) . $[\alpha]_D$ de tirosina en HCl al 4% es —10.3°, —11.8°
y —13° a 26°, 20° y 16° respectivamente y en HCl al 20% es —7°, —2.5°
y —9.6° a las mismas temperaturas. Así el $[\alpha]_D$ de la tirosina es una función de la pureza de la muestra y también el adecuado control de temperatura.

REACCION DE LA TIROSINA CON NaOH.—Poniendo tirosina a la ebullición durante 25 horas con NaOH al 20% se forma R-HOC₆H₄CO₂H, ácido p-hidroxibenzoico; para apresurar la descomposición, es bueno añadir unos pedazos de loza o mejor aún de Al (OH)₃.

ELECTROLISIS DE LA TIROSINA EN HNO₃.—La tirosina, glicina alanina y ácido glutámico fueron electrolizados bajo las mismas condicio-

nes. A partir de la tirosina se obtuvieron ácido oxálico y pequeñas cantidades de sustancias fenólicas y resinosas, de la glicina ácido oxálico; y de la alanina ácido oxálico y $\text{H}-\text{CH}=\text{O}$ etc.

ACCION DEL ACIDO NITRICO SOBRE LA TIROSINA.—Cuando la tirosina fué calentado con HNO_3N a 110°C ., durante tres horas con una pequeña cantidad de ácido vanádico como catalizador, se obtuvo 31.4% de ácido pícrico y 13.2% de ácido 3.5 dinitro-4-hidroxibenzoico.

YODINACION DE LA TIROSINA.—5 g. de tirosina y 10 g. de I Cl en 40 cm^3 . de alcohol calentados a 60°C . y añadiendo 80 cm^3 . de agua en tres porciones (tiempo total de calentamiento 30 minutos) produce 80.5% del diyododerivado.

Los efectos catalíticos de los buffers de fosfato, acetato, etc., dan diferentes resultados cuando se trata de la yodinación de la tirosina. En el buffer de fosfato, la relación específica es $K_s = 1.0 \times 10^6 (\text{OH}) + 150 (\text{HPO}_4) + 12 (\text{H}^2\text{PO}_4)$. — En el buffer de acetato la relación específica se encuentra que es proporcional a la relación: $(\text{CH}_3\text{COO}^-)/(\text{H}^+)$. La existencia de un anión complejo $\text{CH}_2\text{C}(\text{OH})\text{O}_2$ es probablemente el agente catalítico y así se ha postulado.

ACCION DE LOS RAYOS RONTGEN SOBRE LA TIROSINA.—

Cuando soluciones ácidas ligeramente diluídas de Reactivo de Nadi y tirosina, bencidina, hidroquinona, etc., son irradiados con Rayos X en presencia de aire, se decoloran gradualmente por la formación de productos de la oxidación. Si la irradiación es continua, larga y fuerte, los colores llegan a ser luminosos. Se presume que el oxígeno se activa primero y el hidrógeno después. Que el hidrógeno es realmente activado se demuestra por la prolongada irradiación de una solución de azul de metileno. Por algún tiempo no hay ningún cambio aparente pero después la solución se decolora y muestra fuerte disminución del potencial reducción — oxidación.

DESCRIPCION DE LAS REACCIONES DE LA TIROSINA.—(3)

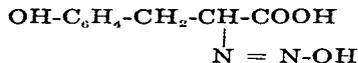
La tirosina presenta todas las reacciones generales de aminoácidos. Por lo tanto puede producir ésteres con los alcoholes, sales metálicas, de las cuales las más importantes son las de fierro y las de cobre; aldehídos internos, clorhidratos etc., por su grupo $-\text{NH}_2$, oximas etc., también produce las reacciones generales colorcadas y de precipitación de todos los aminoácidos: Reacción ninhidrina, y especialmente las de aminoácidos cíclicos como la de Millon, la Xantoprotéica y la de Hopkins-Cole (ácido glixílico), así mismo, las disoluciones de triptofano precipitan con las sales de metales pesados. Por su grupo $-\text{NH}_2$ forma clorhidratos, se une con el HNO_2 liberando N .

Es la tirosina como todos los aminoácidos un electrolito anfótero debido a la presencia conjunta de los grupos aminoácido y carbóxilo.

Pueden considerarse como reacciones más o menos específicas de la tirosina las siguientes:

(1) Reacciona con α nitroso β naftol disuelto en alcohol y ácido nítrico concentrado para dar una coloración púrpura oscuro. Hay que calentar a baño María.

- 2) Con solución de sulfato de mercurio y solución de nitrito de sodio se obtiene color rojo ladrillo.
- 3) Con nitrato de mercurio, la misma reacción anterior.
- 4) Con reactivo que contiene HgSO_4 , HgCl_2 , Na_2SO_4 y H_2SO_4 y agregando además sal de NaNO_2 aparece una coloración rojiza.
- 5) Con reactivo hecho de $\text{Mn}_2\text{O}_3 \cdot 2\text{H}_3\text{PO}_4 \cdot 98\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y H_3PO_4 y agregando también solución saturada de NaCO_3 , aparece una coloración azul verdosa, debida a óxidos de molibdeno producidos por reducción.
- 6) Con Bromato de sodio y una solución débil de tirosina se obtiene una coloración amarillenta.
- 7) Con solución de m nitroso fenol y solución buffer Sorensen se obtiene una coloración roja pálida.
- 8) A 3 ó 5 gotas de sol. alcohólica al 33% de acetaldéhidido con 2 cm³. de H_2SO_4 , se añade 1 ó 2 gotas de sol. de tirosina. Se produce un color rojo aún a diluciones de 1:10000.
- 9) También puede usarse 1 cm³. de una solución de formaldehido en 50 cm³. de H_2SO_4 . Cuando esta solución se calienta a 50-60° C, con tirosina se produce un color café parduzco el cual gradualmente toma un tinte rojizo. Hirviendo esto con dos veces su volumen de acético glacial, el color cambia a verde.
- 10) Con HCl 0.02N y Sol. al 1% de NaNO_2 se produce un calor amarillo que cambia primero a rosa, luego a violeta y después a verde.
- 11) Con HCl concentrado y pequeñas cantidades de clorato de potasio dá anaranjado rojizo.
- 12) Una solución de tirosina tratada con Sol. de NaNO_2 + HCl y algo de naftol dá color azul rojizo.
- 13) A una solución de tirosina en H_2SO_4 concentrado, preparada con ayuda de calor, añadir una poca de agua, neutralizar con carbonato de calcio o Bario, filtrar y añadir Cloruro férrico neutro. Se produce color violeta debido a la existencia de un oxidrilo fenólico en la molécula de la tirosina.
- 14) Tirosina tratada con NaNO_2 y HCl .—El nitroso compuesto se reduce con Zinc y de nuevo se trata con NaNO_2 . Una solución diluída de nitroso tirosina da un color amarillo con amoníaco.
- 15) El diazo compuesto formado da un color rojo intenso con resorcina en sol. alcalina, este diazo compuesto tiene la fórmula siguiente:



- 16) Tirosina produce con HNO_3 un color amarillo, por ser comp. fenólico.
- 17) Con cloruro de sulfonil bencen diazonio — rojo.
- 18) Con cloruro de nitrobencendiazonio — violeta.
- 19) Tirosina disuelta en agua caliente, se le añade una pequeñísima cantidad de Quinona, se forma un color rojizo, el cual se puede cambiar a azul violado por la adición de carbonato de sodio.

**INDICE DE DISOCIACION Y PUNTO ISOELECTRICO
DE LA TIROSINA**

	pK' y probable grupo determinante			pI'
	-COOH	-OH	-NH ₂	
Tirosina	2.20	10.1	9.1	5.7

**CONSTANTES DE DISOCIACION Y DATOS TERMODINAMICOS
DE LA TIROSINA A 25°**

	pK'_a	pK_{aS}	$\Delta H_p K_{aS}$	$\Delta F_p K_{aS}$	$\Delta S_p K_{aS}$	Presiones de disociación a:		
						25°	25°	40°
						mm	mm	mm
Tirosina	9.18	1.830	7110	2500	1546	3.30	11.30	20.00

	pK'_b	pK_{bS}	$\Delta H_p K_{bS}$	$\Delta F_p K_{bS}$	$\Delta S_p K_{bS}$	Presiones de disociación a:		
						25°	25°	40°
Tirosina	11.76	2.473	2990	3380	-1.31		2.55	3.25

H = aumento del contenido de calor.

F = Aumento de la energía libre.

S = Cambio de entropía.

Los valores de pK'_a y pK'_b fueron tomados de la tabla publicada por Miyamoto, S. y Schmidt, C.L.A., Biol. Chem., 90,165 (1931).

**CALORES DE SOLUCION Y DENSIDAD DE CRISTAL DE
TIROSINA RASEMICA Y OPTICAMENTE ACTIVA.**

l — tirosina	1.456	5950	—
d — tirosina	—	5950	—
d,l — tirosina	—	6110	.160
d,l — diyodotirosina	—	5830	—
l — diyodotirosina	—	7830	—2000

PROPIEDADES OPTICAS DE LA TIROSINA

Procedencia	c	Solvente	p	Moles de ácido o base/moles de aminoácido	l	Temp. °C.	α D	(α) D
				1(-) Tirosina				
B	4.40	HCl	6.3N	3.94	28	20	-0.76	-8.64

B = preparado por resolución de la forma sintética inactiva.

C = gramos de Soluto por 100 cm³. de solución.

d = densidad de la solución.

p = gramos de Soluto por 100 grms. de solución.

l = longitud del tubo en decímetros.

(α) = rotación específica en grados angulares calculados de

$$t [\alpha] \times 100 = 100$$

[α] = $\frac{\lambda}{c \times l} \text{Pxdl}$ en donde t = °C. y l = longitud de on-

da de la luz incidente en unidades Angstrom (α) D = (α) 5893.

METODOS DE OBTENCION DE LA TIROSINA

Nº 1.—A partir de la caseína.

Empleando pancreatina, carbonato de sodio, tolueno, fluoruro de sc-dio, HCl — conc. Benceno, amoníaco concentrado, carbón decolorante y NaOH, la operación tiene una duración de 16 a 17 días.

Se colocan 600 gramos de caseína comercial técnica en polvo, en un frasco de 8 litros de capacidad; se agregan 3,200 cm³. de agua de fuente previamente calentada a 37° C. Se agita fuertemente; se añaden 50 gramos de carbonato sódico anhidro y 6 g. de Fluoruro Sódico, disueltos en un litro de agua a 37°; luego una papilla hecha con 20 grs. de pancreatina absoluta Merk en 100 cm³. de agua a la misma temperatura; se cubre el líquido con una capa de tolueno (80 cm³). se añaden 6 litros de agua a 37° C, se agita fuertemente y se deja estar por cinco días en baño de agua a la indicada temperatura y agitando una vez al día. Al quinto día casi todo está disuelto y una capa de tirosina aparece en la superficie; se añaden aun otros 20 grs. de pancreatina emulsionados en 100 cm³. de agua a 37° y se deja esta temperatura durante 12 días más, agitando cada día. Pasado ese plazo se deja una noche en el refrigerador y se filtra lo insoluble através de un gran embudo de Buchner con papel. La tirosina impura así obtenida se disuelve en HCl diluido, se decolora con carbón activo y se filtra en tela y se extrae con benceno tres veces. La solución acuosa, ácida, después de extraer con benceno, se hace hervir y se neutraliza con amoníaco concentrado, se deja enfriar y se guarda en el refrigerador.

La tirosina se separa en largas agujas de brillo sedoso que se filtran con vacío y se lavan dos o tres veces con poca cantidad de agua helada. Para purificar se disuelve en 400 cm³. de agua con adición de 8 gramos

de NaOH en 25 cm³. se sacude enérgicamente con 2 g. de carbón decolorante, se filtra y se lava el carbón con 25 cm³. de agua hirviendo.

El líquido filtrado se hace hervir y se neutraliza a la ebullición con HCl concentrado (unos 15 cm³.) con lo cual comienza a cristalizar. Se acidula con acético y se deja de nuevo que cristalice en el refrigerador durante la noche.

La tirosina así recristalizada se filtra en vacío y se lava con agua hasta que los líquidos del filtrado no den reacción de cloruro. Finalmente se seca.

Nº 2.—*Método a partir de la seda-natural blanca (Desechos) : y : clorhídrico fumante, sosa, hielo y carbón decolorante.*

Los desechos de seda pura se cortan en pequeños pedazos, se colocan dentro de un matraz de 1 lt. y con el HCl fumante se pone a reflujo durante todo un día (8 horas). La solución resultante de color pardo se evapora a seco en vacío con trompa de agua.

El residuo se disuelve en agua, se filtra y afora a un volumen determinado. —En una parte alícuota se determina exactamente el contenido de HCl de la solución acuosa. Esta se enfría con hielo, se agita mecánicamente y se le agrega la cantidad exacta de sosa calculada para neutralizar el HCl en la totalidad de la solución. Se produce un precipitado pardo negruzco que se filtra con vacío después de haber estado una hora entre hielo. El precipitado se disuelve en la cantidad necesaria de agua hirviendo, se agregan 10 grms. de carbón decolorante y se mantiene a la ebullición durante 10-5 minutos. Se filtra debiendo pasar un líquido transparente. Si no, se repite la operación de decolorar. Por enfriamiento en el refrigerador a -5°C. durante la noche cristaliza la tirosina pura.

La hebra de seda, excreción del gusano *bombix mori* está formada principalmente por un albumoide, (70%) la fibrina, que pertenece al grupo de las esclero proteínas o proteínas de sostén. Esta proteína se halla rodeada de por otro albumoide similar, la sericina (goma o cola de la seda) en la proporción de un 30%.

La fibroína exenta de sericina muestra una estructura cristalina al análisis mediante difracción de rayos X. Al hervir con HCl se hidroliza la fibroína liberando los aminoácidos que la componen. La expresión fibroína como la de otros muchos albuminoides, no representa a una sola sustancia perfectamente definida sino más bien a un grupo de albuminoides, similares, pues la composición de las fibroínas varía según la procedencia, razas de gusanos, sistemas de cría, etc. No obstante se puede dar una composición media aproximada. Contenido medio en aminoácidos (%) de la fibroína de la seda.

Glucocola	40.0%	Tirosina	10%
Alanina	23.0	Lisina	1.0
Leucina	1.0	Histidina	1.0
Fenilalanina	1.0	Arginina	1.5

Como se ve, la fibroína es uno de los albuminoides más ricos en tirosina con la ventaja de que apenas contiene aminoácidos insolubles en el punto neutro (Leucina y cistina). Por eso es que al neutralizar el producto de la

hidrolisis, precipita tirosina casi pura acompañada cuando más por una pequeña cantidad de Leucina.

Nº 3.—*Obtención a partir de productos del maíz.*

Después de la cristalización y remoción del ácido glutámico clorado como se describe en la patente británica Nº 522, 365, la concentración de iones H de la solución se ajusta a $\text{pH} = 0.9 - 1.0$ por la adición de NaOH. La temperatura y la densidad son controladas para obtener la precipitación del crudo; algo de leucina impura, tirosina y otros aminoácidos permanecen en la solución. El filtrado conteniendo todos los aminoácidos obtenidos de la hidrólisis del gluten de maíz excepto leucina y ácido glutámico, se mezcla con NaOH hasta obtener un $\text{PH} = 2.4$.

La densidad y temperatura se regulan para obtener la precipitación de la tirosina cruda, la cual se extrae por centrifugación. Después se somete a un procedimiento de purificación.

Nº 4.—*Método basado en la reacción entre diazo compuestos aromáticos y compuestos del tipo de ésteres acetilacéticos.*

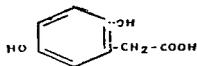
$\text{PMeOC}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{Cl}$ (parametoxi cloruro de bencilo) fué condensado con ester diazo aceto acético para dar ester p-metoxifenilaceto acético (76%), $b_p 157-8^\circ$, $d_4^{17.2} = 1.1033$, $D^{17.2} = 1.5077$; su fenil hidrazona fué obtenida en un producto de 75% aislada en dos formas: incolora y amarilla. La reducción de éste dió 56.0% de p-metoxifeni-alanina. Hirviendo este último con HI dió 90% de tirosina.

TRANSFORMACIONES QUE SUFRE LA TIROSINA EN LA NATURALLEZA. (12)

Los experimentos de Rose indican que la fenil alanina es un aminoácido indispensable, en tanto que la tirosina no lo es. Lo que parece deducirse de tales experimentos es que, en ciertas condiciones la primera puede transformarse en la segunda, pero no se produce el proceso inverso.

Administrando fenil-alanina marcada con deuterio, puede aislarse de las proteínas hepáticas, tirosina que contiene el isotopo.

Desde el punto de vista químico, fenilalanina y tirosina son tan parecidos que se ve uno tentado a tratarlas igual. En la rara enfermedad conocida con el nombre de alcaptonuria, la orina se oscurece con el tiempo. Esto es debido a la oxidación del ácido homogentísico:



a c. homogentísico

a c. 2 5 dioxi-Fenil-acético

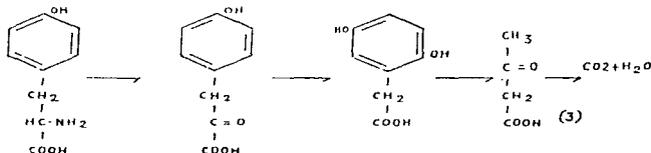
La administración de tirosina o de fenil-alanina a una persona que padezca alcaptonuria aumenta la cantidad de ácido homogentísico eliminado. Por eso se ha supuesto que esa substancia sea tal vez un compuesto "intermedio" formado durante la oxidación de uno o ambos aminoácidos.

Administrando tirosina a conejillos de Indias con dietas deficientes en vitamina C, se produce eliminación de ácido homogentísico y ac. oxifenil piruvico. Puede evitarse esta eliminación añadiendo la mencionada vitamina (ácido ascórbico). Sin embargo, cuando se suministra a un alcaptonúrico dicha vitamina, no parece tener efecto sobre la eliminación de ácido homogentísico.

Lewis ha conseguido aislar ácido homogentísico en la orina de ratas que habían recibido fenilalanina durante un considerable período de tiempo, con frecuencia por espacio de tres o cuatro semanas.

En experimentos de perfusión hepática, tanto la tirosina (1) como la fenilalanina (2) producen ácido aceto-acético; por lo tanto se cree que esté compuesto retracarbonado se forma durante la oxidación de (1) o de (2).

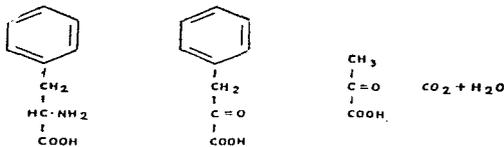
Además los ácidos para hidróxi fenil pirúvico y homogentísico producen también ácido acético en el hígado. Así pues, las etapas posibles en la desintegración de la tirosina pueden ser las siguientes:



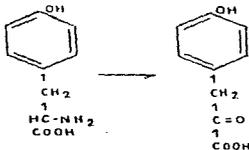
Tirosina Fenil pirúvico homogentísico ac. acetil acético.

Desde luego en el anterior esquema faltan muchos eslabones. Por ejemplo, precisaría una explicación más completa, la transformación del ácido p. oxifenil pirúvico en homogentísico; tampoco está claro como se rompe el anillo bencénico para producir ácido acetoacético. Es indudable que no podemos descartar la existencia de métodos alternantes en esta oxidación.

Ya hemos señalado que la fenilalanina (3) produce ácido acetoacético en el hígado. Sin embargo, dicho ácido (3) no se produce en el mencionado órgano a partir del ácido fenilpirúvico; en cambio, lo encontramos cuando se ponen trozos de riñón en lugar de hígado. Este parece indicar dos distintas vías de oxidación para la fenilalanina; por vía del correspondiente ácido pirúvico en el riñón y a través de la tirosina en el hígado. El trabajo de Medes sobre un caso único de tirosinosis parece confirmar también el segundo camino señalado; al administrar fenilalanina, al enfermo, se originó tirosina, así como ácido p. oxifenilpiruvico.

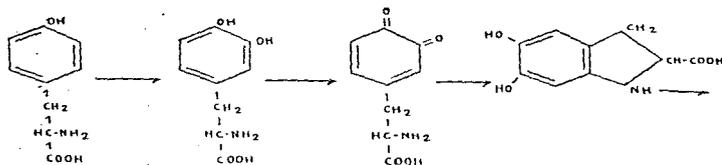


fenilalanina ac.fenilpirúvico



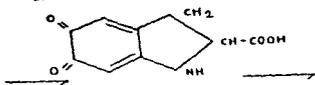
tirosina ac. p. oxifenil pirúvico

Diversos autores han descrito una anormalidad metabólica en ciertos enfermos mentales, anormalidad caracterizada por la eliminación de ácido fenilpirúvico. Se ha dado el nombre de oligofrenia fenilpirúvica (imbecilidad) a este padecimiento, que parece estar relacionado con un trastorno en el metabolismo de la fenil alanina. Vervis administró diversos aminoácidos (incluyendo tirosina) a unos de los enfermos, y sola la fenil alanina aumento la expulsión de ácido fenilpirúvico. En relación con lo expuesto, puede tener interés señalar el hecho de que cuando se administra grandes cantidades de fenilalanina a ratas con dieta pobre en vitamina B, se elimina ácido fenilpirúvico. Esto no sucede si se suministró también el mencionado factor vitamínico. El fosfato de vitamina B, es el cofermento (co-carboxilasa) de la carboxilasa que actúa sobre los compuestos semejantes al ácido pirúvico, eliminando CO_2 . Por lo tanto, parece deducirse que en este caso y en el de la enfermedad mental antes descrita, falta el mecanismo que continua la desintegración del ácido fenil pirúvico. El fermento tirosinasa convierte la tirosina en melanina, pigmento negro parduzco que se encuentra en la piel y en el pelo. Se desconoce el mecanismo por el cual se lleva a cabo semejante transformación. Según Raper es posible que se hidroxile el núcleo bencénico, cerrándose después el anillo, para producir así derivados del indol.

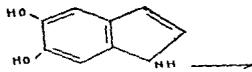


tirosina 3,4 dioxifenil Dopa-quinona
alanina

ac. 5.6 dioxi dihidro
Indol carboxílico



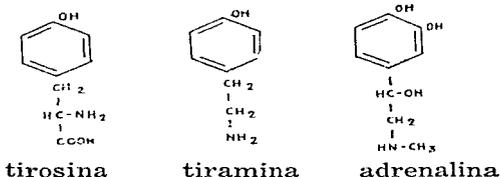
Quinona 5.6
(Hallacromo)



ac. 5.6 dioxi-indol
carboxílico

COOH
Melanina

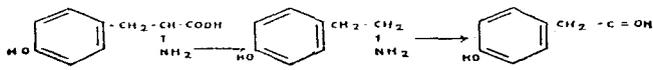
Las fórmulas de la tirosina, adrenalina y tiroxina indican que tal vez la primera sea la sustancia madre de las dos hormonas mencionadas. Se han conseguido algunos testimonios sobre la conversión de la tirosina en adrenalina. Utilizando trozos de tejido renal vivo y con un aporte limitado de oxígeno, el aminoácido se descarboxila para formar tiramina (con exceso de oxígeno la tirosina se desamina). Parece que la conversión de tiramina en adrenalina tiene lugar en los suprarrenales puesto que estos son incapaces de producir la primera.



Sin duda una de las transformaciones más importantes que sufre este aminoácido es la que antes ya se mencionó acerca de la formación de las melaninas y la primera teoría en orden cronológico y de importancia, es la que considera como cromógeno de las melaninas a la tirosina. Aunque los pigmentos que ahora nos ocupan son mucho más frecuentes en los animales que en las plantas, los primeros hechos observados en apoyo de su origen tirosínico arrancan de vegetales. Fué G. Bertrand, en sus estudios de formación de la laca, el primero que dilucidó el origen de esta materia colorante negra, la cual se produce cuando se extiende sobre el objeto que se desea barnizar o lacar, la crema espesa o latex que fluye casi incoloro del árbol de la laca. En este latex existe una sustancia fenólica, el lacol, la cual se oxida y se oscurece en presencia de una diastasa allí existente, la lacasa y con el concurso del oxígeno del aire y de un agente catalítico, el manganeso. Posteriormente se vió que muchos cuerpos de estructura fenólica son capaces de oxidarse y polimerizarse, ennegreciéndose por la acción de esa misma lacasa y más tarde se descubrió la existencia de una oxidasa especial (una fenolasa como es la de la laca), que ejerce concretamente su acción sobre la tirosina, que es un fenol, transformándola en cuerpos primeramente rosados, luego rojos y pardos y, finalmente negros (melaninas artificiales). La tirosinasa y la lacasa suelen presentarse conjuntas en algunos vegetales y muy especialmente la primera se encuentra muy difundida; el hongo *Russula nigricans*, la patata, el grano de trigo, el salvado, el intestino y la hemolinfa del insecto de la harina (*Tenebrio-moritor*) son primeras materias ricas en tirosina.

Si se sumerge una hoja de la planta de la patata en una disolución de sal de quinina al 1 por 100, se observa al cabo de un cierto tiempo un fuerte ennegrecimiento de los nervios de la hoja, debido a que el alcaloide descompone la estructura celular y libera la tirosinasa, la cual actúa sobre la tirosina de la planta, cosa análoga sucede cuando se corta el tubérculo o ciertos frutos como la manzana, etc. El fermento tirosinasa es una mezcla de tres fermentos solubles que ejercen sucesivamente sus acciones sobre la tirosina: una descarboxilasa, que hace desprender el grupo ácido al

estado de CO_2 , una desaminasa que desglosa el grupo amínico en forma de amoniaco y una genuína oxidasa que oxida el cuerpo producido por las anteriores diastasas, transformándolas en un aldehido.



Esta última substancia puede ser el genuino cromógeno de las melaninas.

El investigador que ha defendido más este origen tirosínico de las melaninas, ha sido O. V. Furth: Sus observaciones han conducido a demostrar la existencia de tirosinasa y tirosina en todos aquellos órganos donde hay melaninas; y sus experiencias, "in vitro", a probar el mecanismo de formación de dichos pimientos. La puesta en evidencia de este fermento en extractos de tejidos y especialmente en la piel de distintos animales, ha ofrecido mayores dificultades, las cuales se han solventado cuando se ha tenido en cuenta los factores especiales que influyen en la acción del citado fermento. Se ha probado el influjo de la alcalinidad del medio; operando con tirosinasa extraída del agarico se ha demostrado que la presencia de un 0.05% de NaOH es ya una alcalinidad muy fuerte para que el fermento rinda el máximo de melanina cuando actúa sobre una disolución de tirosina.

Dejust ha econtrado para la tirosinasa del salvado que la alcalinidad óptima corresponde a un líquido N/100 de NaOH; para la de las setas, Russulla, una inferior a N/200, y para la que procede de papas, una intermedia; el óptimo de alcalinidades es por tanto distinto, según la procedencia de la tirosinasa, y esto se explica porque no se ha logrado descubrir esta diastasa en muchos casos. También influye considerablemente la proliferación bacteriana (por microbios banales) que muchas veces coadyuvan eficazmente a la producción de melaninas. Meirowsky practicó una experiencia que se ha hecho clásica y que consistía en colocar un trozo de piel humana en atmósfera humada y en estufa a 38° durante varios días, observándose un manifiesto ennegrecimiento (al cabo de 263 días), debido a la producción de melaninas con los propios elementos contenidos, en las células del tejido. La existencia de tirosinasasa en las formaciones patológicas (Melanosarcomas) no ha sido probada, pues la substancia extraída de ellas ennegrece diversas fenoles (adrenalina, dopa, pirocatequina, etc.), pero no actúa sobre la tirosina.

Para explicar la melanogénesis, a partir de este aminoácido, es preciso demostrar que existe allí donde se encuentran melaninas.

Algunos investigadores lo han conseguido; Gessard ha obtenido tirosina cristalizada de las larvas de *Fucilla coesar*; Gortner un cromógeno casi seguramente tirosínico de las del insecto de la harina, y Verne un compuesto aminoácido análogo en los crustáceos decápodos.

La prueba más concluyente (en cuanto se refiere a las melaninas hermanas) la ha dado recientemente Schiemalfuss extrayendo, cristalizada, 18 mgrs. de 1 tirosina de dos kgs. de piel de cadáveres de individuos de raza negra; desengrasa el material con cloroformo y luego lo trata con gran cantidad de agua, evaporando los líquidos, lavando el residuo con

metanol y con éter, disolviéndole en agua hirviendo, filtrando y cristalizando entre hielo. Esta prueba era absolutamente necesario, porque la tirosinasa, extraída de procedencias bien diversas, no conserva la especificidad propia de la mayoría de los fermentos solubles, ya que puede actuar, para producir melaninas, sobre la tirosina o sobre otros cuerpos de naturaleza fenólica diversa como hemos visto antes que sucede con la tirosinasa existente en los sarcomas melánicos; la presencia de este fermento no supone, por tanto, la de tirosina; tanto más cuanto que la tirosinasa ejerce acción melanogénica mucho más intensa sobre la dioxifenilalanina (dopa; que sobre la propia tirosina).

Füth reconoce que todavía nos es completamente desconocido el proceso químico mediante el cual se transforma la tirosina en melanina; supone que la primera fase debe ser una descarboxilación del aminoácido, y la segunda una desanimación para llegar al compuesto $\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{COOH}$, que ya mencionamos antes. La tercera etapa debe ser una ciclización del correspondiente aldehído con pérdida de hidrógeno, y la cuarta y final una condensación del producto cíclico que, de este modo, se cambia en melanina. En cambio, Raper y Wormall creen que no tiene lugar una desaminación previa de la tirosina, sino que la tirosinasa verosímelmente la transforma en una amino-ortoquinona, de coloración roja, como vimos antes.

Corroborando la hipótesis que exponemos, están las numerosas experiencias de formación artificial de melaninas haciendo actuar el oxígeno (con o sin el concurso de la tirosinasa) sobre compuestos fenólicos diversos; si éstos no son nitrogenados (pirocatequina, hidroquinona, etc.) el producto de la oxidación (con persulfato potásico, por ejemplo) es negro y de propiedades análogas a las de las melaninas genuinas; se los llama ácidos húmicos y se producen también por la acción del calor sobre mezclas de azúcares y aminoácidos (Maillard) o sobre mezclas de albuminoides o de aminoácidos con aldehídos o con ácidos minerales (Gortner y otros).

Pero volviendo al posible origen tirosínico de las melaninas, podemos todavía comparar la composición cuantitativa de aquel aminoácidos y de estos pigmentos como lo hace Heinlein:

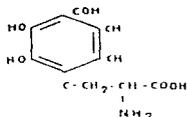
	N	C	H	O
Melamina natural	1	7-7,5	7,5-8	2,6-2,8
Tirosina	1	9	11	3

Para deducir que la tirosina puede ser la materia prima de las melaninas, en las cuales se transforma por pérdida de dos átomos de hidrógeno y oxidación subsiguiente. Claro es que la tirosina proviene del desdoblamiento de moléculas albuminoideas (posiblemente por autólisis), y cuyos restos acompañan siempre a las melaninas naturales.

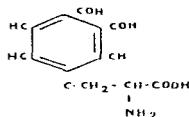
A través de los hechos expuestos anteriormente ha podido observarse que no son frecuentes los casos en que se ha demostrado la existencia conjunta de tirosina, tirosinasa y melanina. La mayor parte de las veces falta el fermento o el aminoácido. Esto hizo pensar en que la melanogénesis pudiera desarrollarse a partir de otras substancias, aunque por proceso análogo al expuesto anteriormente.

Fué Bloch el investigador que más ha trabajado por demostrar que las

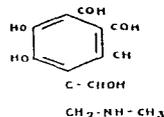
melaninas se producen en la naturaleza a partir de un cuerpo muy parecido a la tirosina y a la adrenalina, que es la dioxifenilalanina, llamado dopa por abreviatura (tomando las letras subrayadas de la palabra alemana o inglesa: *dlo XI p HE*, nil; *la*, nin) y con el concurso de una diastasa especial denominada, por ello, dopadiastasa:



Tirosina



Dopa



Adrenalina

Bloch y sus numerosos colaboradores (Ducrey, Schaf, Albl) apoyan su opinión con los hechos siguientes:

La dopa existe en los gérmenes y epispermo del haba comestible, en los tegumentos de las alas de las Melolonthas. Pero no se ha probado su existencia en los tejidos de vertebrados a pesar de las insistencias investigaciones de K. Sata y W. Brecher. Es indudable que la naturaleza difenólica de la dopa la hace mucho más fácilmente oxidable que lo es la tirosina, y el simple contacto con el aire determina ya su coloración y tendencia al ennegrecimiento; cuanto más con el auxilio de oxidasas, incluso de la propia tirosinasa que actúa sobre la dopa con más facilidad que sobre la misma tirosina. Realmente, los trabajos de Bloch se han dirigido especialmente a demostrar la existencia en tejidos de diversas procedencias de un fermento especial que, precisamente, actúa sobre la dopa y que por eso se denomina dopa-diastasa o dopa-oxidasa.

El estudio bioquímico más detallado que ha podido hacerse de los supuestos fermentos melanogenéticos (tirosinasa y dopaxidasa) se debe a Raper y a sus colaboradores. Demuestran en primer lugar (y contrariamente a lo sostenido por Bach, Füh y otros investigadores) que la acción de la tirosinasa sobre la tirosina no determina separación alguna de amoníaco de este aminoácido, y, por lo tanto, el proceso de desaminación que consignábamos antes no tiene lugar; la melanina producida tiene, incluso, más nitrógeno que la tirosina generadora (Raper y Wormall). Con esto se niega también el supuesto de Schiemalfuss de que el ácido 3.4 dioxifenilacético sea primera materia para formar melanina: ha logrado extraer dicho cuerpo en cantidad de 35 grs., tratando 19.000 litros del insecto de la harina (*Tenebrio molitor*) (desengrasados previamente con éter de petróleo) con metanol. Pero esto no sucede en presencia de un simple monofenol (fenol, y, cresol, etc.), porque entonces la primera acción de la tirosinasa es oxidante y transforma a dicho monofenol en orthodifenol primeramente y luego en orthoquinona y aún en productos todavía más oxigenados, los cuales actúan después sobre la tirosina, llegando a desaminarla. No es posible tampoco admitir como cuerpos intermedios entre tirosina y melanina, ni el aldehído $\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{C}-\text{H}$, ni el alguna la tirosinasa para transformarlos en pigmentos negros. El primer cuerpo que se forma en la acción de tirosinasa o de dopasa indistintamente ácido $\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{COCOOH}$, como supone Bach, ni el alcohol $\text{OH}-$

$C_6H_4-CH_2-CH_2CH$, como cree Gortner, porque sobre ellos no ejerce acción sobre tirosina o sobre dioxifenilalanina, es de color rojo y se origina por un proceso de oxidación diastásica; esta substancia roja se decolora espontáneamente sin el concurso de diastasas ni de oxígeno, y el cuerpo incoloro así producido se oxida al aire, pero sin fermentos para originar melaninas. Operando con dopa el color rojo se alcanza con mucha mayor rapidez que con tirosina. Como es lógico, se ha pretendido aislar y conocer la estructura química de esos compuestos y ha podido apreciarse que en el producto incoloro existen tres substancias (lo mismo si se parte de tirosina que de dioxifenilalanina), dopa, dioxindol y ácido dioxindol carbónico, las cuales han podido separarse y caracterizarse. El producto rojo no se conoce con seguridad, pero se cree fundadamente que es una quinona derivada de este último ácido citado. La serie de reacciones, que según Raper, tiene lugar en la melanogénesis, los consignamos antes.

BIBLIOGRAFIA

CAPITULO No. 1

- (1) F. GIRAL.—Productos químicos y farmacéuticos pág. 1190 (1946)
- (2) S. ROTHMAN.—Biol. Med. 45, 52-4 (1940); in C. A. 34 6306 (1941) 470^c.
- (3) D. E. DOWMAN.—J. Biol. Chem. 1412877 (1941); in C. A. 33 8269^b; 35, 1497^a, 42, 2274^d.
- (4) H. S. STANFORD and M. GERGMAN.—L. Physiol. Chem 64, 724 (1942); in C. A. 42, 2536.
- (5) E. ABDERHABDEN y O. BOHM, Z.—Physiol Chem. pág. 269, (1941); in C. A. 42 6141.
- (6) Y. TAKAYAMA.—J. Chem Soc. Japan 62, 31 (1941) in C. A. 43, 4052.
- (7) P. BLOCK Jr. and G. POWELL.—J. Chem. Soc. 65, (1930) (1943); in C. A. 43, 5383.
- (8) J. LOISELEUR BULL. Soc. Chim. Biol. 25,22 (1943) in C. A. 37, 2988.
- (9) The Merck index. Fifth edición (1940) 989.
- (10) Chemical Abstract (1942) 1048.
- (11) B. HARROW. Tratado de Bioquímica y manual de prácticas de bioquímica. Trad. Dr. J. Giral (1946)
- (12) Dr. J. GIRAL. "Melaninas" pág. 108.

C A P I T U L O I I

ESTUDIO GENERAL Y RESEÑA BREVE DE LOS METODOS DE CUANTEO

Clasificación de los métodos, descripción y estudio
de los principales, y Comentarios.

Existe hasta ahora una buena cantidad de métodos, para el cuantéo de la tirosina, y no se puede decir que existe uno ó algunos queden resultados enteramente satisfactorios debido a los reactivos complicados, o al proceso que algunas veces es sumamente tardado. Sin embargo, los que se usan más, y de los que se han hecho algunas modificaciones, son: El método de FOLIN, y el que se basa en la reacción de Millon, y que se han tomados como más seguros, y como base para el desarrollo de todos los demás.

A continuación damos a una recopilación de todos los métodos, para después analizarlos y comentarlos:

1) METODOS BASADOS EN EL EMPLEO DEL SULFATO DE MERCURIO COMO REACTIVO.

- a) Método de Folin.
- b) Método de Folin y Looney
- c) Modificación de Folin y Ciocalteu
- d) Método de Folin con Hidrólisis ácida.
- e) Modificación del método Millon-Lugg por Block y Bolling.
- f) Adaptación de Block y Bolling (al método de Millon).
- g) Método de Weiss (modif. al método de Nasse-Millon).
- h) Método de Lugg (modif. al método de Nasse-Millon).
- i) Método de Suwerkalow (modif. al método de Nasse-Millon).
- j) Método de Arnow (modif. al método de Nasse-Millon).
- k) Método de Suwerkalow empleando además $\text{CH}_3\text{-COOH}$ y NaNO_2 .

1) Modificación de Anow (al método de Folin con hidrólisis ácida).

- 2) METODOS QUE SE BASAN EN EL EMPLEO DE NaBrO_3 .
- a) Método de Millar: Modificación de Plimmer y Eaves.
 - b) Modificación de Bonicatti.

3) METODOS QUE EMPLEAN COMO REACTIVO EL HgNO_3 , al 10%.

- a) Método de Nasse Millon.

4) METODOS CON SULFATO DE QUININA Y REACTIVO DE MILLON.

- a) Método de Fürth y Fischer.

5) METODOS CON REATIVO FENOLICO.

- a) Método Fosfotúngstico-fosfomolibdico de Folin y Denis.

- b) Método de Folin y Looney empleando también H_2SO_4 .

6) CON NITROSO FENOL.

- a) Método Xantoprotéico de Tillman, Hirsch y Stoppel.

- 7) Método con α nitroso β naftol 8 adaptación de los métodos de

Marenzi y Lugg.

METODO DE FOLIN CON HIDROLISIS ALCALINA (1)

Hidrólisis: 100 mg. de proteína se colocan en un tubo de ensaye con 2 cm^3 . de NaOH , 5 N., ó el equivalente de Ba (OH) 2 al 10%, junto con 5 gotas de alcohol caprílico. Se inserta un pequeño tubo de ensaye en el cuello del tubo grande, para que sirva de condensador. La hidrólisis se lleva a cabo en un baño de aceite a una temperatura de 115-125° C., durante 18 a 20 horas. Al finalizar este tiempo, los tubos se lavan con un

poco de agua, y se agrega a la solución, 3 cm³. de sulfúrico 7 N., (estando la solución caliente) al mismo tiempo se agita con una varilla. Esto es esencial para que el sílice se obtenga como precipitado y no en estado coloidal. Después de que se ha enfriado el hidrolizado, se transfiere a un matraz aforado de 25 cm³., con tapón, repitiendo los lavados con pequeñas cantidades de agua. La adición de unos cuantos pedazos de vidrio ayuda a la rotura del precipitado gelatinoso de sílice. La solución se diluye al volumen, y se le añaden 0.2 gr. de Kaolin. Se agita fuertemente la suspensión, y se filtra por un papel de 12.5 cm. (Whatman). El embudo debe cubrirse con un vidrio de reloj para prevenir evaporaciones.

DETERMINACION

10 cm³. del filtrado se transfieren a un tubo cónico de centrifugación de 15 cm³, y se le agregan 2 cm³ de HgSO₄ al 15% en sulfúrico 6 N.

El HgSO₄ en solución se debe añadir gota a gota, y a una distancia no menor de 3 mc. Se deja que la solución permanezca a la temperatura ambiente durante 3 horas, y el precipitado se centrifuga a baja velocidad durante 5 minutos.

El filtrado se pone en un matraz aforado de 50 cm³ y el labio del tubo de centrifugación se lava con un cm³ de H₂SO₄ 0.1 N. El precipitado se rompe con una varilla de vidrio y se añaden 5 cm³ de HgSO₄ al 5%, en solución con sulfúrico 2 N. La suspensión se agita fuertemente, y la varilla se lava con 1 cm³ de la misma solución. El precipitado se centrifuga, y el filtrado se agrega a la solución principal, lavando nuevamente el labio del tubo de centrifugar con 1 cm³ de sulfúrico 0.1 N. El precipitado se lava finalmente, de la manera descrita anteriormente, con 5 cm³ de Sulfúrico 0.1 N., y la varilla se lava igualmente en 1 cm³ del mismo ácido. Después de la centrifugación, el líquido que sobrenada se agrega a la solución principal.

El precipitado de HgSO₄ contiene el triptofano.

Preparación del Standard.

A otro frasco volumétrico de 50 cm³, se agrega la siguiente solución: 2 cm³ de solución conocida de tirosina, 8 cm³ de agua, 2 cm³ de HgSO₄ al 15%, como reactivo, 6 cm³ de solución de sulfúrico de HgSO₄ al 1.5%, y 7 cm³ de sulfúrico 0.1 N.

Al contenido de cada frasco se le agrega 3 cm³ de H₂SO₄ 7 N., y después de mezclar bien cada frasco, se colocan en baño maría hirviente, durante 5-10 minutos. Se enfrían, y a cada frasco se le agrega 0.5 cm³ de una solución al 2% de NaNO₂. Las soluciones se mezclan y después de 2 minutos se diluyen a volumen con agua. Tomar la lectura en el fotocolorímetro, usando un filtro 5-50 contra agua. Filtrar si es necesario antes de tomar lecturas.

Cálculos.

Si el Standard se coloca a 20 mm.

$$\text{Tirosina} = \frac{100}{\text{lecturas de la muestra desconocida.}}$$

METODO DE WEISS (2).—Empléa como reactivo, el HgSO_4 al 10% en sulfúrico al 5%, solución standard de tirosina al 0.1%, en NaOH al 5%, y el proceso puede resumirse así:

Problema más reactivo más NaNO_2 — producción de color rojo ladrillo. Por otra parte, solución de Tirosina Standard al 0.002% más reactivo y más NaNO_2 — color. La comparación de color se hace a simple vista igualando las coloraciones por dilución.

Método de Lugg.—Lugg empléa tres reactivos hechos a base de HgSO_4 : el "A", el "B" y el "C". El "A", contiene HgSO_4 , HgCl_2 , Na_2SO_4 , agua y H_2SO_4 , el "B" se prepara diluyendo el "A" y el "C" contiene HgSO_4 , HgCl_2 , agua sulfúrica. Además empléa para la obtención del color, una solución molar de NaNO_2 . Este método es sumamente tardado, pues en una de sus etapas requiere que la solución Standard de tirosina se guarde durante varios meses además de que en sí, el proceso es de los más embarazosos debido a las precauciones extremas que se recomiendan, y lo tardado de su desarrollo.

EL METODO DE ARNOW es similar a los anteriores.

LA MODIFICACION DE FOLLIN Y CIOCAITEU (3) empléa un reactivo de Sulfato mercúrico al 15%, en Sulfúrico 6 N., otro también de Sulfato mercúrico al 1.5% en sulfúrico 2 N., y un reactivo fenólico para la determinación del triptofano en hidrolizados.

Después de la Hidrolisis de las proteínas se precita el triptofano con el HgSO_4 , se centrifuga y filtra para determinar en el líquido la tirosina.

Solución Standard: En un segundo matraz de 100 cm^3 se colocan 5 cm^3 de la solución conocida de tirosina, más 4 cm^3 de HgSO_4 al 15%, más 12 cm^3 de HgSO_4 al 1.5%, más 7 cm^3 de H_2SO_4 0.1 N.

Formación del color. A problema y tipo, se les añade 6 cm^3 de H_2SO_4 7 N., calentando a baño maría durante 15 minutos, se enfría a temperatura ambiente y se agrega agitando 1 cm^3 de solución de NaNO_2 al 2%, se diluye a la marca. La comparación del color, se debe hacer sin dilución indebida, leyendo siempre primero el Standard para igualar el cero.

Calculos: Si el Standard se deja a 20 mm. y el hidrolizado contiene 1% de proteínas, se obtiene el porcentaje de tirosina de la fórmula siguiente:

$$P = \frac{20 \times 1.25 \times 5}{R} \quad \text{en la que R es la lectura.}$$

Este método, como casi todos, sirve también para determinar triptofano, ya que casi siempre van acompañados y para la formación del color de éste se usa un reactivo cuya elaboración es sumamente engorrosa. La tirosina dá resultados un poco bajos, pero que se pueden considerar dentro de lo aceptable.

EL METODO DE FOLLIN Y LOONEY (4), con colorímetro, emplea el reactivo de Hopkins y Cole (HgSO_4 al 10%, en H_2SO_4 al 5%) y el reactivo fenólico que se prepara como sigue: Se hierve una solución de 15 gr. de MoO_3 y 10 gr. de NaOH en 200 cm^3 de agua, mientras no de olor muy fuerte a amoníaco. Se agregan 100 gr. de $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 50 cm^3 . de H_3PO_4 al 85%, 100 cm^3 . de HCl y el resto para hacer 800 cm^3 . de agua. Se pone a reflujo durante 10 horas, se agregan unas cuantas gotas

de Bromo para decolorar, y se hierve sin condensador para remover el exceso de Bromo, se enfría, filtra y diluye a un litro.

SOLUCION STANDARD DE TIROSINA EN H₂SO₄ AL 5% :
1 cm³. = 1 mgr.

Una vez efectuada la hidrólisis de la proteína, se procede a separar la tirosina del triptófano, colocando en un tubo de centrifugar de 10 cm³, una parte alícuota. Se agregan 2 cm³. de reactivo de Hopkins y Cole, se diluye a la marca con ácido sulfúrico al 5 %, se centrifuga y decanta el líquido.

Formación del color: Se transfieren 5 cm³. en un frasco volumétrico de 100, y en otro frasco igual, 1 cm³. de solución Standard de Tirosina (con 1 mgr, de tirosina). A éste segundo frasco se le agrega también 1 cm³. de reactivo de Hopkins y Cole, y 3 cm³. de H₂SO₄, al 5%. A cada frasco se agrega 30 cm³. agua, 20 cm³. de solución saturada de Carbonato de Sodio, y agitando, 4 cm³. de solución de NaCl al 5%. Después, 2 cm³. de reactivo fenólico, y se mezcla.

Comparación del Color.—Después de dejar reposar por 20-30 minutos, se hace la comparación de la manera usual, colocando el Standard a 20 mm.

Cálculos: Los mgr. de tirosina contenidos en el alícuota de hidrolizado, se deducen de la fórmula: $M = \frac{20 \times 2}{R}$ (R es la lectura del problema).

El método de Folin con hidrólisis ácida es exactamente igual al que se sigue, cuando la hidrólisis es alcalina, y Arnow (5) ha hecho una modificación que se basa, como todos los demás métodos de este grupo, en la formación de un color rosado rojizo, producido empleando sulfato de mercurio y nitrito de sodio. Las modificaciones que se hacen, carecen de importancia, pues solamente se varía dentro de pequeños límites, el tiempo y las cantidades.

DE LOS METODOS QUE EMPLEAN COMO REACTIVO EL NaBrO₃

Solamente se pueden contar el método de Millar, y la modificación a éste que hacen Plimmer y Eaves, así como la de Bonicatti.

METODO DE MILLAR (5)

En el método original de Millar, la titulación se lleva a cabo con una solución de bromato de sodio de una concentración. 2 M., el cual es demasiado fuerte para obtener lecturas exactas cuando el contenido de tirosina es bajo: A. concentraciones de 0.01 a 0.04 gamas por cm³, las lecturas correspondientes no se pueden tomar como seguras absolutamente.

Plimmer y Eaves, (5) por investigaciones posteriores en la Universidad de Sheffield, rectificaron el defecto del método de Millar sin reducir la cantidad de bromato, pero usando una solución 10 veces más débil (0.02 N. igual con 0.033 M.), y efectuando la operación en frasco cerrado. Ahora, con las ventajas de las microburetas, no es necesaria la reducción

de la concentración de la solución Standard, pues con el empleo de dichas buretas, se asegura la exactitud.

Reactivo: Solución Standard de bromato de Sodio 0.02 N. igual con 0.033 M. Se disuelven 5.033 gr. de NaBrO_3 , en agua, diluyendo a un litro.

Procedimiento: El hidrolizado conteniendo la tirosina en frasco cerrado, se disuelve en HCl, agregando de 10 a 15 cm^3 . de bromuro de potasio al 20%, y se deja reposar de 10 a 15 minutos en frasco cerrado.

Se titula con solución de bromato de sodio 0.02 N. hasta color amarillo persistente. Si la solución, antes de la titulación está coloreada como si fuera el punto final, oscuro, se usa solución de almidón y Yoduro de Potasio como indicador, y se titula con solución 0.02 N. de Tiosulfato.

Cálculos: Teóricamente. 1.765 gr. de Bromuro. corresponden a 0.5558 gr. de bromato de sodio, que son los que se requieren para un gr. de tirosina. Dos tercios de una Mole de bromato de sodio se requieren para reaccionar con un Mole, de tirosina, por lo tanto, 1 cm^3 0.03334 M. de bromato de sodio es equivalente a $181.09/1000 \times 0.3334 \times \frac{2}{3} = 0.00424$ gr. de tirosina.

En el segundo grupo de métodos incluimos la modificación de Bonicatti al método anterior, y que es brevemente como sigue: (7)

Se añade a la solución que contiene tirosina, HCl hasta reacción ácida, más 5 cm^3 . de solución de NaBr al 20%, y solución de bromato de sodio 0.1 N., hasta que la solución sea amarilla. Después de dos horas se agrega un exceso de KI y se titula el Iodo puesto en libertad con solución de Tiosulfato. El triptófano y la fenil glicina interfieren.

En el primer grupo de métodos, o sea los que emplean sulfato mercúrico, hemos creído, que el más importante es el de Folin, ya que de él se han hecho variaciones que incluyen los nombres de muchos investigadores, y sin embargo, su forma original no se ha olvidado y se emplea frecuentemente.

De los métodos que emplean el HgNO_3 , se puede señalar el de Nasse Millar. (8)

En el método original se emplea como reactivo una solución de nitrato de mercurio al 10% y unas gotas de nitrito de sodio al 5%. Después de la adición de los reactivos al problema, la mezcla se calienta en baño de agua para obtener la coloración rojiza que se lee después de diez minutos en el fotocolorímetro. Los cálculos se hacen comparando con un Standard conocido.

En los métodos que se usa el sulfato de quinina como reactivo, tenemos el de Fürth y Fischer (9), que además emplean el reactivo de Millar, y recientemente Fürth y Fleishman adaptaron al método la adición de Bromo. Se emplea como aparato colorímetro el de Duboscq.

El sulfato de quinina reactivo se emplea en solución al 5% en H_2SO_4 al 5%.

Reactivo de Millar: Se disuelve una parte de Hg metálico en dos partes de ácido nítrico fumante, diluyendo con dos veces su volumen de agua.

Solución Standard de tirosina al 0.1% en sulfúrico al 5%.

PROCEDIMIENTO: Se diluye el hidrolizado a un volumen de 50 cm^3 , y se colocan 20 cm^3 . (= 1 gr. de la proteína) en un cilindro graduado. Se agrega una solución de ácido fosfotúngstico al 20% (20 a 40 cm^3 .) y se forma un precipitado, pobre, que se deja reposar durante un día para

que se asiente. Cuidadosamente se apunta el volumen y se filtra a través de un pequeño filtro de papel plegado en un cilindro graduado anotando nuevamente el volumen. Si se requirieron menos de 30 cm³. de ácido fosfotúngstico, se lleva hasta la marca en un frasco volumétrico de 50 cm³, se filtra a través de filtro seco y se quitan 40 cm³. del filtrado.

Precipitación de la quinina. Al filtrado fosfotúngstico se añade sulfato de quinina reactivo mientras no se forme un precipitado fuerte, evitar exceso de volumen, medir este y filtrar a través de papel seco plegado en un cilindro graduado. Nuevamente se anota el volumen. Se agrega solución al 30% de NaOH suficiente para precipitar la quinina, medir el volumen y filtrar con papel seco, se anota el volumen, se añade H₂SO₄ al 50% hasta que dé ácido al papel tornasol y se anota el volumen final. Se debe tener cuidado de tomar bien las medidas y de llevar un record escrito de los muchos volúmenes, esto es necesario para la exactitud.

Formación del color.—A 10 cm³. de filtrado y 10 cm³. de solución standard de tirosina que tenga aproximadamente el mismo contenido de tirosina añadir 2 cm³ de reactivo de Millar, dejar reposar a la temperatura ambiente durante 45 minutos.

Si se tratan muchas diluciones de la solución standard, poniendo desde 0.03 hasta 0.10% de tirosina, se compara con el problema el que tenga color más parecido.

Comparación de color.—Filtrar si es necesario y comparar los colores en el colorímetro de Duboscq. Es necesario que tanto el problema como el tipo esté en claros.

Entre los métodos que usan el reactivo fenólico podemos citar el de Folin y Denis (10) que se denomina "método fosfotúngstico-fosfomolibdico".

De este método se obtuvieron numerosos resultados en la escuela médica de Harvard incluyendo los de Johnes y Jones, Thomas y otros han demostrado que el color de la reacción no es específico y los resultados son demasiado altos. Se emplea el colorímetro de Duboscq.

Reactivo.—Se emplea el reactivo fenólico de Folin y Denis preparado de la manera siguiente: se ponen a reflujo 20 gr. de 20 MoO₃·2H₃PO₄·48H₂O, 100 gr. de Na₂WO₄·2H₂O y 50 cm³. de H₃PO₄ al 85% con 750 cm³ de agua durante dos horas, enfriar y diluir a un litro. Se usa solución standard de tirosina al 0.02% en HCl O. N; 1 cm³. igual a un miligramo de tirosina.

Procedimiento.—La hidrólisis se lleva a cabo poniendo a reflujo 1 gr. de la proteína, con 25 cm³. de HCl al 25% en un frasco de 500 cm³. durante 12 Hs. enfriar, transferir el hidrolizado en un frasco volumétrico de 100 cm³, diluir hasta la marca y en otro frasco volumétrico de 100 poner 2 cm³.

Formación de color.—Se añade a la licuota 5 cm³. de reactivo fenólico de Folin y Denis y después de 5 minutos se añade 24 cm³. de solución saturada de carbonato de sodio, diluir hasta la marca.

Comparación del color.—Después de 10 minutos se comparan el problema y el standard en el colorímetro de Duboscq colocando el tipo a 20 mms.

Método con nitroso fenol.—Existe el de Tillman (11), Hirsch y Stoppel y que suele denominarse método Xanto protéico. El color amarillo producido por el HNO₃ sobre ciertas proteínas se debe a la presencia de uno

o más aminoácidos que contienen el anillo bencénico: 2 tirosina, 1 triptófano y 3 fenil alanina, la sensibilidad de la reacción es en el orden de los números 1, 2, 3. En el método ideado por Tillman en la universidad de Frankfurt, las condiciones son reguladas para prevenir la intervención triptófano. La hidrólisis se omite supuesto que el calentamiento con HNO_3 0.1 N. durante dos horas se hace con ese propósito.

La manipulación es simple, haciendo lecturas del colorímetro a altas y bajas concentraciones de iones hidrógeno y los cálculos no se dificultan si se siguen los pasos con detalle.

Reactivos: Solución standard de un nitroso fenol. Disolver 50 mgr. en 500 cm^3 . de NaOH 0.1 N. Para resultados prácticos el valor del color de esta solución, es equivalente a una solución standard alcalina que contenga 2.5 mgr. de tirosina por 500 cm^3 . después de la nitración.

Solución buffer: Sorensen.

Proceso de nitración: Se pesa en un erlenmeyer un gramo de proteína o una cantidad de materia protéica o bien una mezcla de aminoácido conteniendo tirosina y triptófano (unos 25 mgr.) se agregan 400 cm^3 . de HNO_3 0.1 N, para obtener alguna forma de condensación y calentar 2 horas a baño maría. Se enfría, se neutraliza con NaOH empleando papel tornasol, se pasa a un frasco volumétrico de 500 cm^3 . y se diluye hasta la marca.

Comparación del color.—Procurando ajustar pH a 1.8.—Se separa con una pipeta en un tubo colorimétrico un alícuota de 20 cm^3 . de la solución, se agregan 20 cm^3 . de agua y 10 cm^3 . de HCl 0.1 N. Esta mezcla tiene un Ph. de 1.8, como se muestra en la tabla. Se compara con 50 cm^3 . de solución Standard de M Nitro fenol, diluido a un décimo de la concentración, conteniendo 0.5 mgr. de materia colorante y se apunta la concentración del color en términos de miligramos de tinte como S'.

Comparación del color a un Ph 11.5.—Separar en otro tubo colorimétrico 5 cm^3 . de la solución, agregar 1.65 cm^3 . de solución de Na OH 0.1 N (Tabla) y comparar con 38 cm^3 . de la solución Standard diluido a $\frac{1}{4}$ de concentración conteniendo 0.95 mgr. de M Nitro fenol.—Apuntar la concentración en términos de tinte en mgr. S''.

Cálculos: Dejando que A' y B' representen los valores de color de tirosina y A'' y B'' los valores de color del triptófano a pH igual a 1.8 y 11.5, respectivamente, también que X y Y representen los miligramos de tirosina y triptófano en el problema, entonces:

$$A'x + B'Y = S'$$

$$y \text{ y } A''x + B''Y = S''$$

Supuesto que A', B', A'' y B'' pueden ser derivados de la tabla, solamente permanecen para resolver la ecuación, para X y Y.

pH	VALOR DEL COLOR		pH	VALOR DEL COLOR	
	TIROSINA	TRIPTOFANO.		TIROSINA	TRIPTOFANO
1.8	0.10	0.40	7.0	2.5	0.85
2.1	0.20	0.41	8.4	4.2	0.95
2.5	0.35	0.43	9.5	6.2	1.10
3.2	0.50	0.50	10.0	6.5	1.20
4.0	0.63	0.60	11.5	7.0	1.23
5.0	0.88	0.64	12.9	7.4	1.30
6.0	1.50	0.70			

NOTA: Intensidad de color comparado con un miligramo de tirosina.

Se ha probado que el margen entre los valores del pH, es suficientemente ancho, las soluciones deben ser ajustadas a otros valores de pH que 1.8 y 11.5 de acuerdo con las siguientes direcciones y los correspondientes valores de color derivados de la tabla.

Para pH igual a 1.8, 2.1 y 2.5 se añade HCl 0.02, 0.01 y 0.002 N, respectivamente. Para pH entre 3.2 y 10.0, se agrega solución Buffer Sørensen. Para pH 11.5, 11.7 y 11.9, se añade, respectivamente, 3.3, 5.3 y 8.5 cm³ de solución de NaOH 0.1 N por 100 cm³ de volumen total, y para pH 12.7 y 12.9 se agrega, respectivamente 5.3 y 8.5 cm³ de solución de NaOH 0.1 N por 10 cm³ de volumen total.

METODO COLORIMETRICO DEL α NITROSO β NAFTOL PARA TIROSINA Y TIRAMINA DE GERNGROSS, VOSS y HERFERLD:

El método original de basa en el color púrpura oscuro que se forma cuando 1 cm³ de una solución de tirosina, tiramina u otros fenoles parsubstituidos se trata con 6 cm³ de una solución al 10% de Carbonato de Sodio Anhidro, y una gota de α Nitroso, β Naftol al 1% en Metanol, calentado a la ebullición, y agregando después una o dos gotas de HNO₃. Ya que el color desaparece rápidamente y no obedece la Ley de Beer, la determinación se hace en sucesivas diluciones del problema mientras el color sea débilmente perceptible; entonces se compara con el color obtenido, tratando una solución que contenga una gama de tirosina en 10 cm³ de la misma manera.

Modificación de Maciag y Schoental, añadiendo alumbre férrico amoniacal.

Por la adición de una solución saturada de alumbre a la solución coloreada, Maciag y Schoental estabilizan el color de manera que pueda ser leído una hora después, tratándose de tirosina o tiramina.

Aparato.—Fotómetro de Pulfrich con celda de 1 cm³ y filtro 550.

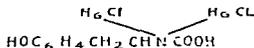
Reactivo.—Solución del α Nitroso β Naftol al 1%, en Etanol.

Proceso.—Formación del Color.—A 2 cm³ de una solución acuosa de tirosina y tiramina o supuesto compuesto hidrolizado de proteína, añadir una gota de reactivo y calentar hasta hervir, añadir entonces tres gotas de ácido nítrico y calentar nuevamente hasta hervir. Tan pronto como se forma el color rojo violeta, se añade la mezcla de 2 cm³ de solución saturada de sulfato férrico amoniacal y se calienta hasta hervir.

Lectura del color.—Después de una hora, leer el coeficiente de extinción en el fotómetro de Pulfrich, usando una celda de 1 cm y filtro S-50. La correspondiente concentración de tirosina y tiramina se encuentra en la siguiente tabla:

TIROSINA Y TIRAMINA	TIROSINA	TIRAMINA
1.25	...	0.137
2.5	0.076	0.149
5.0	0.125	0.208
7.5	0.161	0.256
10.0	0.208	0.328
12.5	0.244	0.357
15.0	0.292	0.432
17.5	0.328	0.488
20.0	0.377	0.538
22.5	0.444	0.620
25.0	0.509	0.658
37.5	0.678	0.939
50.0	0.824	1.187
0	...	0.076

La diazo reacción de Pauly (12) para tirosina en una adaptación de Hanke (14) se funda en el principio siguiente: la Histidina es removida del hidrolizado por precipitación con Ag_2SO_4 y $Ba(OH)_2$. La tirosina es precipitada en el filtrado con acetato de mercurio y cloruro de sodio. La solución purificada de tirosina se diazota con el reactivo de Weis-Ssobolew (15) (ácido sulfanílico diazotado) formándose un complejo de tirosina y mercurio.



Método:—Se precipita la tirosina de un hidrolizado (con H_2SO_4) de cinco gramos de proteína con Ag_2O y $Ba(OH)_2$. De acuerdo con el método usual de Kossel. (16) El filtrado se acidula inmediatamente para prevenir la pérdida de tirosina por oxidación por el Ag_2O . Después de remover los reactivos con HCl y H_2SO_4 , la solución de aminoácido se evapora hasta sequedad. El residuo se disuelve en 73 cm^3 . de agua, un cm^3 . de ácido acético glacial y 3.5 gr. de acetato de mercurio se añaden. La solución se hierve por 10 minutos a reflujo. Se enfría y agrega 7.5 gr. de $NaCl$. El precipitado del complejo Cloruro mercúrico tirosina, después de permanecer por 2 horas bien frío, se extrae por centrifugación y se lava en 25 cm^3 . de $NaCl$ al 10%. El precipitado se descompone con HCl al 20% caliente y el Hg es removido con H_2S . Después de concentrar la sequedad el residuo se levanta con agua y se toma un pequeña alícuota para la determinación de la tirosina por la modificación de Koessel-Hanke al método Pauly Weiss.

El procedimiento es una adaptación de los métodos descritos por Folin, Marenzi y Lugg. Los reactivos son los descritos por Lugg.

A unos cuantos cm^3 . de solución de tirosina (conteniendo de 0.25 a 0.9 mg. de tirosina) en un frasco volumétrico de 25 cm^3 . se añade una poca de agua para hacer 3.5 cm^3 . y 1.5 cm^3 . de H_2SO_4 , 5 N. Se añaden 5 cm^3 . de la solución de sulfato mercúrico en sulfúrico descrita en el método de Lugg, se mezcla perfectamente y se mantiene a 60-65° C., durante 30 mi-

nutos. Se enfría en el chorro de la llave y se deja a 18-26° C. por diez minutos. Se añade ahora y casi hasta la marca del frasco, solución diluida de sal mercúrica en Sulfúrico y se mezcla. Se añade 0.1 cm³. de solución NaNO₂ 1 M. y se afiora al volumen con la misma solución diluida de mercurio empleada anteriormente mezclando bien.

Después de cinco minutos y menos de 10, se mide la transmisión en el fotómetro KWSZ. En la celda de referencia se usa una solución preparada de idéntica manera excepto que el agua reemplaza la solución de tirosina. Si el triptófano está presente en la solución desconocida, la solución de mercurio del triptófano, debe ser centrifugada, separada y lavada como la describe Lugg y la solución debe permanecer a 18-20° C. por una hora en lugar de 10 minutos como se recomienda antes.

COMENTARIOS :

No fué sino hasta que Fürth (13) hizo una clara explicación de que los métodos de Millar para tirosina, en proteínas no proporcionaban valores absolutos, y que se usaban solamente como datos comparativos, cuando dejaron de tomarse por absolutamente ciertos. Las experiencias de este autor hicieron que esos métodos sirvieran para determinar con considerable exactitud la cantidad de grupos fenólicos presentes en los hidrolizados de las más puras proteínas.

Con respecto al Diazométodo, los valores de tirosina obtenidos de esta manera, fueron más bajos que los reportados al mismo tiempo por Folin y Looney. Esto provocó una serie de acalorados debates sobre el valor de las reacciones de Pauly, la fenólica y la reacción de Millon para la determinación de la tirosina. Como resultado de esto, Hanke (14) admitió que pequeñas cantidades de tirosina se pierden por la precipitación con la mezcla Ag₂SO₄-Ba (OH)₂, pero también demuestra que los resultados para tirosina obtenidos por el método fenólico son demasiado altos.

Los autores piensan que si la Histidina fuera precipitada con plata a pH igual a 7 ó con HgNO₂ en soluciones neutras o casi nada alcalinas (Kossel) (16) y que la tirosina fuera precipitada en medio ácido (acetato de mercurio-NaCl), el método de Pauly-Hanke probaría tener un valor considerable. Un método que promete excelentes resultados es el del Nitroso Naftol, se ha demostrado que la reacción es específica de fenoles para sustituidos, sin embargo esta prueba para tirosina no ha sido la suficientemente estudiada.

Tratándose de los métodos Folin-Millón, ha habido numerosas pequeñas modificaciones para tirosina y triptófano, pocas de las cuales muestran cambios marcados sobre los procedimientos originales, y de los cuales se puede decir dan resultados medianamente satisfactorios.

En contraste con los muy sensitivos métodos de aldehído para triptófano, las direcciones de los métodos Nasse-Millon, para tirosina, pueden ser cambiados considerablemente sin que se obtengan malos resultados.

Abderhalden y Siebel (17) usan 7 cm³. de ácido sulfúrico 14 N, en lugar de 6 cm³. de H₂SO₄ 7 N, recomendados por Folin-Marenzi. Von-Deseö usa 5 cm³. de H₂SO₄ 1415 para prevenir la turbidez.

Jorpes (18) hierve las soluciones mercúricas tirosínicas, por 10 ó 15 minutos, y las deja a la temperatura ambiente por muchas horas. La solución se filtra si se enturbia antes de la adición de NaNO₂, Ba-

lint (19) usa en el colorímetro, filtro de 500 m para estimaciones de tirosina emplea el reactivo de Folin, pero relativamente en pequeñas proporciones, y el volumen final de 20 cm³. usa una relación de 0.2 á 2.0 mgr. de tirosina.

Fujiwara y Kataoka (20) dicen que el reactivo fenólico Folin, y otros similares no son específicos, siendo reducidos no solamente por los fenoles sino también por aldehidos aromaticos, hidroxilamina, fructuosa, hidroximetifurfural, inulina, morfina, etc. Hanke (21) dice con respecto a tirosina, que el diazometodo de Pauly coincide con el procedimiento de Millon, cuando el proceso es apropiadamente llevado a cabo. Por otro lado Holiday y Devine (22) han demostrado que los métodos Folin-Millon y los espectros fotométricos dan resultados que concuerdan cuando se trata de la determinación de la tirosina en caseina, sangre, proteina, etc.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—The determination of the amino acids by Richard J. Block, Ph. D. from the department of Chemistry New York State Psychiatric Institute and Hospital. New York, N. Y.
- 2.—The analysis of foods, by Andrew L. Winton and Kate barber Winton. John Wiley & Sons Inc., New York. 1945 — 129.
- 3.—The analysis of foods, by Andrew L. Winton and Kate barber Winton. John Wiley & Sons Inc., New York. 1945 — 132.
- 4.—The analysis of foods, by Andrew L. Winton and Kate barber Winton. John Wiley & Sons Inc., New York. 1945 — 136.
- 5.—MILLAR.—The determination of the amino acids, by Fichard J. Block, Ph. D from the department of Chemistry New York State Psychiatric Institute and Hospital. New York, N. Y. 1945 — 135.
- 6.—PLIMMER Y EAVES.—The determination of the amino acids, by Richard J. Block. Ph. D from the department of Chemistry New York State Psychiatric Institute and Hospital. New York. 1945 — 135.
- 7.—BONICATTI.—Anaysis of foods, by Andrew L. Winton and Kate Barber Winton. John Wiley & Sons Inc., New York. 1945 — 135.
- 8.—Wasse-Millon.—The Analysis of foods, by Andrew L. Winton and Kate Barber Winton. John Wiley & Sons Inc., New York. 1945 — 129.
- 9.—FURTH Y FISHER.—The Analysis of foods, by Andrey L. Winton and Kate Barber Winton. John Wiley & Sons Inc., New York. 1945 — 129.
- 10.—FOLIN Y DENIS.—The Analysis of foods, by Andrew L. Winton and Kate Barber Winton. John Wiley & Sons Inc., New York. 1945 — 132.
- 11.—TILLMAN.—The Analysis of foods, by Andrew L. Winton and Kate Barber Winton. John Wiley & Sons Inc., New York. 1945 — 137.
- 12.—PAUY.—Uber die konstitution des histidines, *Zoit Physiol. Chem.* 1904, 42 Pag. 508 y the aminacid composition of proteins and foods. Richard Block y Diana Bolling 1945 Pag. 87.
- 13.—FURTH.—*Biochem. Zeit* 1924, 146 pag. 259 y the amino acid composition of proteins and foods by Richard J. Block y Diana Bolling 1945, pag. 86.
- 14.—HANKE.—*Biol. Chem.* 1925, 66, pag. 475 y the amino acid composition of proteins and foods. Richard Block y Diana Bolling 1945, pag. 87.
- 16.—KOSEL.—*Zeit Physiol. Chem.* 1898 25, pag. 165 y the amino acid

- composition of proteins and foods. Richard Block y Diana Bolling 1945, pag. 88.
- 17.—ABDERHALDER Y SIEBEL.—The amino acid composition of proteins and foods. Richard Block and Diana Bolling 1945, pag. 100.
 - 18.—JORPES.—The amino acid composition of proteins and foods. Richard Block and Diana Bolling 1945, pag. 100.
 - 19.—BALINT.—The amino acid composition of proteins and foods. Richard Block and Diana Bolling 1945, pag. 100.
 - 20.—FUJIWARA Y KATAOKA.—The amino acid composition of proteins and foods. Richard Block and Diana Bolling 1945, pag. 100.
 - 21.—HANKE.—The amino acid composition of proteins and foods. Richard Block and Diana Bolling 1945, pag. 104.
 - 22.—HOLIDAY Y DEVINE.—The amino acid composition of proteins and foods. Richard Block and Diana Bolling 1945, pag. 105.

CAPITULO III

ESTUDIO COMPARATIVO CON OTROS METODOS.

- a) Método del α nitro β naftol
- b) Preparación del α nitro β naftol
- c) Método del ácido selenioso.

CAPITULO III

ESTUDIO COMPARATIVO CON OTROS METODOS

La principal dificultad que encontramos al dar principio a este trabajo, fué el encontrar el método más seguro y rápido a la vez, y que estuviera al nivel de las necesidades actuales del análisis. Encontramos que los métodos de Folin y Millon junto con sus variaciones, debido a la diversidad de resultados que se obtienen, no se pueden tomar definitivamente como propios de nuestros días.

I.—Nos decidimos finalmente por el método del α nitro β naftol que hasta ahora sólo ha sido consignado por algunos autores y no ha recibido el estudio que se merece, aún cuando verdaderamente promete venir a substituir a todos los métodos antiguos. Block estima que esta reacción prometedora no ha sido estudiada por los investigadores.

Hace ya bastantes años que unos investigadores alemanes (1) publicaron una reacción típica de tirosina en la cual emplean el α nitroso Bnaftol. Posteriormente ha sido consignada en el conocido libro de Feigl (2) y en otros varios como el de Koch (3). Feigl la describe de la manera siguiente:

La tirosina y las proteínas que la contienen, producen intensa coloración púrpura oscura con α nitro β naftol y ácido nítrico; este ácido pasa el reactivo α nitro β naftol, lo cual se consigue también con bióxido de plomo o de manganeso. La reacción es específica de tirosina en presencia de otros aminoácidos, 3-4 dioxi-fenil alamina, adrenalina, tiroxina, aldehidos, azúcares, urea. Análoga reacción dan muchos fenoles para sustituidos: tirosol, tiramina, p-cresol, o-etilfenol, 1-2-4 xileno, p-clorofenol, p-bromo-m cresol, eter monometílico de la hidroquinoma, β naftol y Fenoltaleína. Los reactivos son: Disolución alcohólica al 0.2% de α nitroso β naftol, ácido nítrico diluyendo una parte del fumante con cuatro partes de agua.

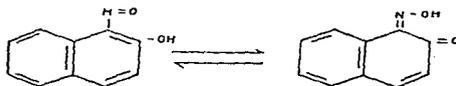
La práctica es la siguiente: Se colocan unas gotas de la disolución de tirosina en un microcrisol con unas gotas de reactivo; se caliente y se agrega a la disolución caliente, unas gotas de ácido nítrico: se produce en seguida la coloración púrpura. Para las proteínas se hidrolizan antes con ácido sulfúrico o bien con hidróxido de sodio. Sensibilidad igual a 0.5 μ g de tirosina, límite de concentración 1 : 1000000.

Como tuviera a la mano un poco de este raro reactivo, procedimos a comprobar este método basándonos en un trabajo efectuado y publicado

por el Dr. José Giral (4) en el Instituto de Investigaciones Científicas de la Universidad de Nuevo León. El Dr. Giral observó que la reacción era correcta con una disolución de tirosina purísima, pero se sorprendió grandemente al ver que la coloración roja purpúrea se producía también con los reactivos solos y en ausencia total del aminoácido. Llevó a cabo entonces, la reacción con α nitroso β naftol purísimo de la firma, Eastman Kodak y también se produjo con los reactivos solos. Intentó una modificación substituyendo el ácido nítrico por el clorhídrico fumante, obteniendo entonces excelentes resultados, puesto que los reactivos solos no producían más que una débil coloración amarilla. Después de innumerables ensayos encontró que la coloración entre los reactivos solos se debía a mínimas impurezas del α nitroso β naftol consistentes en pequeñas cantidades de β naftol que es primera materia para la obtención del reactivo, y que produce con este mismo la coloración dicha, como hemos visto antes, pues figura en la lista de cuerpos que la dan.

El α nitroso β naftol es también un reactivo muy sensible al ion cobaltoso con el cual produce un intenso precipitado color rojo ladrillo diferencial con el níquel (5), también lo es de las sales de circonio y de las de otros metales. Por eso se utiliza mucho en Química Analítica.

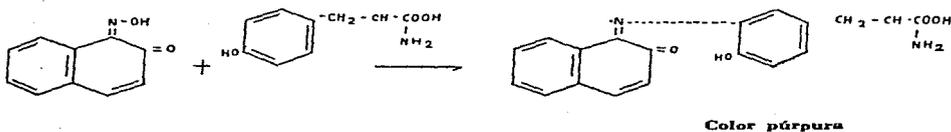
Reacciona en sus dos formas tautómeras: nitroso fenol y quinon o xima.



Según que el reactivo se encuentre en medio alcalino o ácido, adopta la constitución siguiente:



Una hipótesis de como se copula este reactivo con la tirosina es como sigue:



Esto puede deducirse análogamente a la siguiente reacción:



Ponemos en duda que el reactivo pase primeramente a α nitro- β naftol por la acción del ácido nítrico como aseguran sus autores, puesto que la reacción coloreada con tirosina se produce también en ausencia de este ácido y en presencia de clorhídrico que no es oxidante. Después de llevar a cabo muchísimos ensayos para determinar en qué condiciones se produce el máximo de coloración, hemos llegado a establecer que la forma más adecuada para proceder es la siguiente:

A 1 cm³. de solución acuosa de tirosina (acidulada débilmente con clorhídrico), pura al 1 por mil, se agregan sucesivamente, 1 cm³. de reactivo (disolución alcohólica al 0.2%) y 1 cm³. de ácido nítrico diluido (una parte del fumante en cuatro partes de agua); se agita bien el conjunto y se le calienta a baño maría hirviendo durante cinco minutos; se deja enfriar y se diluye con 5 cm³. de alcohol, el líquido rojo cereza se puede llevar inmediatamente al fotocolorímetro; debido a que la coloración no es estable, el compuesto colorado se hidroliza y regenera la coloración amarilla primitiva.

Se puede muy bien apreciar coloración roja con 0.1 de la disolución de tirosina (un diezmiligramo de substancia) diluida finalmente con alcohol hasta 10 cm³.

Se hizo una curva de sensibilidad del reactivo una vez encontradas las condiciones mejores, de la siguiente manera: Se emplearon ocho tubos con cantidades crecientes de tirosina y las mismas cantidades de reactivos, y un tubo testigo sin tirosina y con las mismas cantidades de reactivos. Fué necesario hacer la operación en cada tubo por separado, uno por uno para obtener mayor exactitud: de esta manera, el tiempo de reacción y de operación es el mismo en cada uno de los tubos. Chequé de tiempo en tiempo al tubo patrón para prevenir variaciones tanto de éste, como del aparato. El Colorímetro empleado fué el de KLETT SUMMERSON con filtro N° 54 (verde) de 500-570 milimírons. La concentración de la solución de tirosina fué de 200 gamas por cm³. Antes de obtener la curva definitiva se hicieron varias cambiando la concentración de la solución de tirosina, así como las condiciones de la técnica. Se hizo el siguiente cuadro de resultados.

Tubo No.	Acido.	Sol. de Tirosina	Gamas Tirosina	α nitroso Bnaftol	Alcohol	Lectura
Tipo	1 cm.3	0. 0.	0. 0.	1 cm.3	8 cm.3	000
1	„	.4 cm.3	80	„	7.6 „	75
2	„	.5 „	100	„	7.5 „	130
3	„	.6 „	120	„	7.4 „	165
4	„	.7 „	140	„	7.3 „	205
5	„	.8 „	160	„	7.2 „	260
6	„	.9 „	180	„	7.1 „	270
7	„	1.0 „	200	„	7.0 „	300
8	„	1.2 „	240	„	6.8 „	370

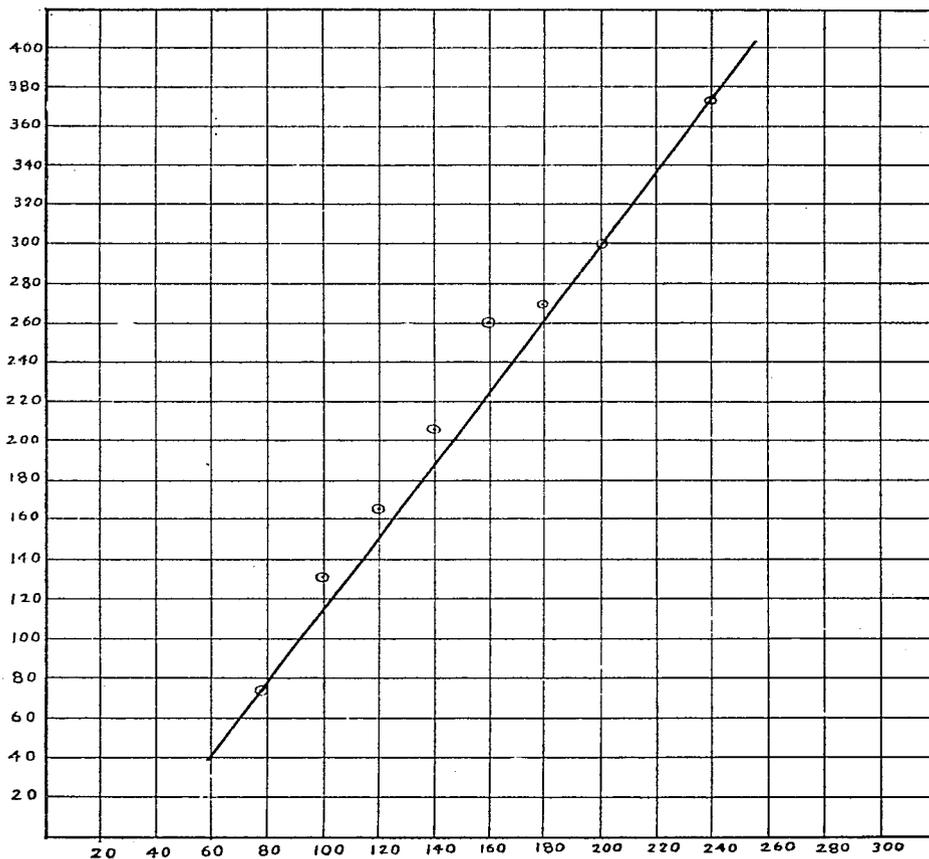
La presencia de triptófano perturba la producción del color púrpura, si se encuentra en gran cantidad; pero no lo hace si está en cantidades iguales a las de tirosina o en menor proporción. Así, 0.5 cm³. de solución de tirosina en mezcla con 0.5 cm³. de disolución de triptófano (ambas al 1 por 1000), produce coloración rojo con las cantidades antedichas de reactivos. Y como en los hidrolizados de proteínas nunca se encuentra el triptófano en cantidad mayor de la tercera parte de tirosina, se deduce que la reacción es aplicable para el cuanteo de esta última en los productos de hidrólisis de proteínas. Si el hidrolizado es muy ácido o muy alcalino, se le neutraliza antes aunque no se necesita una neutralización muy exacta. Es conveniente que los hidrolizados sean incoloros o tan sólo amarillentos; si no lo son, se hace necesaria la decoloración con celita o con caolín preferentemente, pues si se hace con carbón animal, este retiene por adsorción alguna cantidad de aminoácidos. La hidrólisis debe hacerse de preferencia en medio sulfúrico porque así se destruye la mayor parte de triptófano, presente; pero si se desea cuantear este y la tirosina en el mismo líquido, se debe hacer hidrólisis alcalina. La reacción se lleva a cabo lo mismo que con la solución de substancia pura, tomando una cantidad de hidrolizado que contenga aproximadamente 0.5 a 2 miligramos de tirosina y comparando con disolución tipo de tirosina al 1 por mil en fotocolorímetro con filtro verde. A continuación está la curva que expresa la proporcionalidad entre la cantidad de tirosina presente y la intensidad de la coloración.

Se hizo la preparación en el laboratorio del reactivo α nitroso β naftol que es una operación sencilla a partir del β naftol (6).

Substancias:

β naftol 25 g.
 Nitrito de Sodio 12.5 g.
 NaOH 7 g.
 H₂SO₄ (40-42%) 45 cm³. (D = 1.32)
 hielo y sal.

Procedimiento: El β naftol se disuelve en una solución de 7 g. de NaOH en 300 cm³. de agua y agitando mecánicamente se enfría a 0° con mezcla de hielo y sal. Se añade el nitrito de sodio y después, poco a poco,



GAMAS DE TIROSINA

COLORIMETRO FOTOELECTRICO

KLEFF SUMERSON

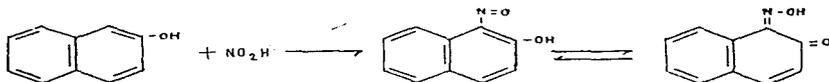
FILTRO No 54 (Verde) 500-570 milmicrons

REACTIVO: α nitroso β naftol Sol. Alcohólica al .2%)

Junio
dilución a 10 an³

para que la temperatura no se eleve de 0°, el ácido sulfúrico. Al final debe quedar la solución ácida al papel de congo. A poco de empezar a añadir el ácido sulfúrico se forma un precipitado amarillo pardo que va aumentando y se produce espuma. Terminada la adición (unos 15-30 minutos), se agita durante media hora más a 0° y se filtra a vacío lavando con agua helada, se recoge y seca durante varios días en desecador de vacío sobre sulfúrico. El producto amarillo toma un color pardo verdoso mientras se seca rendimiento 28-30 g. (casi cuantitativo).

Propiedades: polvo amorfo, de color pardo verdoso, insoluble en agua, poco soluble en alcohol, éter y acético glacial. P. F. 100°-103°. Calentando a unos 150° se descompone. Medianamente soluble en ligroina (p.eb. 60-90°) en la que se puede cristalizar obteniéndose puro con un P. F. 112°.



El NO_2H es liberado del NaNO_2 por el ácido sulfúrico.

II.—Un método excelente para cuando se trata de soluciones puras de tirosina es el descubierto por el Dr. José Giral, empleando como reactivo una solución de 5% de ácido selenioso en sulfúrico. Se basó en la siguiente nota publicada en el *Industrial and Engineering Chemistry* (7).

Los ácidos selenioso y selénico fueron propuestos como reactivos para la identificación de los alcaloides del opio por Brandt, Lafon y Ferreira de Silva. Mecke observó el color o colores producidos por la adición de una solución al 0.5% de ácido selenioso, en ácido sulfúrico concentrado, a los alcaloides del opio y recomendó esta solución como reactivo para la identificación de pequenísimas cantidades de esos compuestos. Levine observó el color de las reacciones de fenoles y éteres fenólicos con el reactivo ac. selenioso. El estableció que la producción de color es una prueba específica de grupos fenólicos hidroxílicos. La producción de compuestos coloreados la atribuye él a la acción oxidante del ácido selenioso y también estableció que un precipitado rojizo o café rojizo acompañado o siguiendo a la primera reacción coloreada se debe a la reducción del ácido selenioso con la liberación de selenio elemental.

Experiencia: Un miligramo del compuesto se coloca en un microcristal y se agrega una gota de solución sulfúrica al 0.5% de ácido selenioso. Las sustancias químicas empleadas fueron de grado Eastman proporcionadas por Eastman Kodak Co. Para determinar si la reacción es característica del reactivo H_2SeO_3 se hizo una prueba simultáneamente con ácido sulfúrico sólo, sin dar coloración.

Algunos compuestos producen el mismo color con ácido sulfúrico que con el ácido selenioso y son: bencidina, o bramoanilina, m-bramoanilina, p-p-diamino difenilmetano, dibencilamina, difenil-nitrosoamina, defenil-carbazona, etc.

Los siguientes apenas si dan coloración o no la dan: alitiourea, ácido orto-amino-benzoico, ac. m-aminobenzoico, ac. p-amino benzoico, etc.

Este artículo establece que el reactivo ácido selenioso en medio sulfúrico produce reacciones de coloración intensa con substancias que contienen grupos fenólicos hidroxílicos y como más adelante, en el cuadro de substancias que reaccionan con el reactivo para dar color, se menciona al triptófano, el Dr. Giral pensó que tal vez con tirosina podría producirse una coloración diferente a la del triptófano y en efecto, se obtuvo una coloración azul intensa para una solución bastante concentrada de tirosina.

La reacción es extremadamente sensible y muy segura, pues se percibe en el fotocolorímetro desde 1 gama de tirosina usando 1 cm³. de reactivo ácido selenioso al 0.5% en H₂SO₄ conc. diluyendo con ácido sulfúrico concentrado hasta un volumen de 5 cm³.

Práctica:

Solución de tirosina conteniendo 200 α/cm³.

Solución Sulfúrica de ácido selenioso al 0.5% en H₂SO₄ concentrado.

Cuando se ponen cantidades considerables de solución de tirosina, la aparición del color se dificulta o no se lleva a cabo. En un principio sospechamos que se debía a la elevación de temperaturas provocada por el agua de la solución y el H₂SO₄ concentrado y procedimos a investigar esto último efectuando la reacción a baja temperatura con hielo; la coloración no se produjo y sólo por calentamiento se produce el color azul aunque no en toda su intensidad.

Procedimos en otra prueba a evaporar la misma cantidad de solución que antes no había reaccionado, en baño María y a baja temperatura para prevenir pérdidas, una vez conseguido que el volumen fuera poco más o menos a la tercera parte y estando frío, se agregó el reactivo, apareciendo inmediatamente la coloración en toda su intensidad.

De todo lo anterior se deduce que la reacción se debe llevar a cabo procurando que exista la menos cantidad posible de agua. La reacción necesita cierta temperatura producida por la mezcla agua-sulfúrico. Al añadir el reactivo sobre la solución de tirosina se debe agitar suavemente para acortar el tiempo en que aparece el color y conforme se van aumentando las cantidades de tirosina, el reactivo se debe ir añadiendo más lentamente, gota a gota; lo mismo cuando se diluye la coloración con sulfúrico. Se debe tener cuidado de agitar bien para que la coloración aparezca uniforme; esto se dificulta debido a la densidad del sulfúrico concentrado y por el pequeño diámetro del tubo de fotocolorímetro.

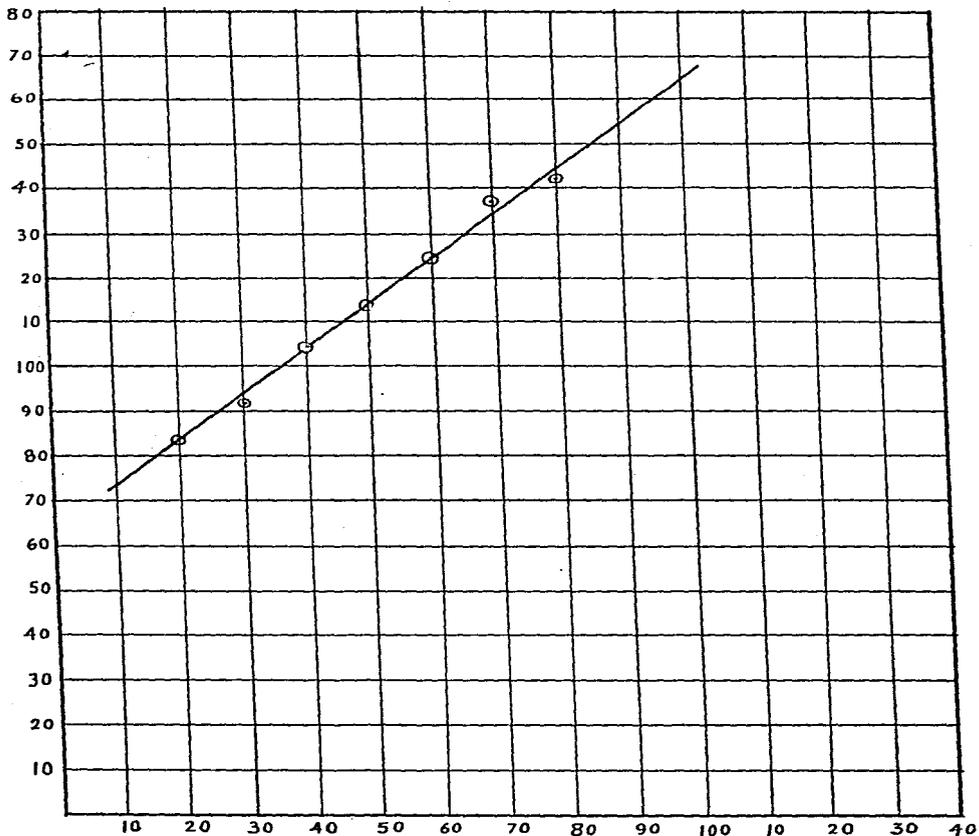
La coloración alcanza su intensidad máxima después de unos 15 ó 20 minutos y permanece inalterable por tiempo indefinido.

Con esta reacción es imposible hacer determinaciones de tirosina y triptófano juntos debido a la sensibilidad del triptófano con el reactivo. Una sola gota de solución de triptófano de 50 gamas por cm³. reacciona con 1 cm³. de reactivo produciendo una coloración amarilla parda que hace imposible distinguir el color azul de tirosina. A continuación está el cuadro de resultados correspondientes y su gráfica.

El aparato empleado fué el mismo colorímetro fotoeléctrico de KLETT SUMMERSON y el mismo filtro.

CUADRO DE SENSIBILIDAD

Tubo N°	Gamas de Tirosina	Reactivo	Acido	Lecturas
Tipo	0	1 cm ³ .	4 cm ³ .	0
1	10	„	3.95 „	20
2	20	„	3.90 „	30
3	30	„	3.85 „	40
4	40	„	3.80 „	48
5	50	„	3.75 „	60
6	60	„	3.70 „	72
7	70	„	3.65 „	81
8	80	„	3.60 „	90



GAMAS DE TIROSONIA

KOLORIMETRO FOTOELECTRICO
 KLETT SUMMERSON
 FILTRO No. 54 5000-570 millmicrons
 REACTIVO: Acido Selenioso, H_2SeO_3
 (al 0.5% en H_2SO_4 concentrado)

Junio 21-49
 Dilución a 5 Cen 3

BIBLIOGRAFIA

- 1.—E. L. EVERITT. J.—Bio. Che., 125, 471 (1938).
- 2.—F. FEIGL.—Qualitative analise mit Hilfe von Tüpfelreaktionen, 2ª ed., pag. 417 (1935).
- 3.—F. C. KOCH.—Practical Methods in Biochemistry, pag. 45 (1937). Baltimore.
- 4.—DR. J. GIRAL.—“Un reactivo específico de tirosina”. Instituto de Investigaciones científicas de la Universidad de Nuevo León, México.
- 5.—I. MELLAN.—Organic Reagents in Inorganic Analysis, pag. 155 (1941). Philadelphia.
- 6.—PROF. FRANCISCO GIRAL.—Productos Químicos y Farmacéuticos. Ed. Atlante. México, D. F. 1946, pag.
- 7.—Industrial and Enginnering chemistry pag. 361 (abril 1942).

C A P I T U L O I V

*TECNICA DE HIDROLISIS DE PROTEINAS Y PRECAUCIONES
NECESARIAS PARA EL CUANTEO DE TIROSINA.*

CAPITULO IV

TECNICA DE HIDROLISIS DE PROTEINAS Y PRECAUCIONES NECESARIAS PARA EL CUANTEO DE TIROSINA.

La clasificación de proteínas que contienen los vegetales y los animales con respecto a su origen, solubilidad, poder de coagulación y otras propiedades físicas, ha sido de inestimable valor para ciertos tipos de investigación pero proporciona relativamente poca información acerca de su constitución química. Lo mismo puede decirse de los resultados del análisis elemental. La composición de los compuestos complejos no puede determinarse de esta manera y así fué reconocido primero por Liebig; él estableció que sólo es posible hacerlo por el análisis de los productos de descomposición. El análisis elemental ayuda solamente en la distinción de proteínas que contienen algún elemento especial, tal como el fierro de la hemoglobina, el fósforo de la caseína etc. Las reacciones de precipitación son también generales para tener algún valor y las reacciones de color de la misma manera no pueden determinar tal o cual proteína ya que algunos colores son característicos de muchas proteínas diferentes.

Las investigaciones de la descomposición de proteínas se vienen llevando a cabo desde hace un siglo, pero solamente desde las últimas dos o tres décadas y debido al trabajo de gran número de investigadores como Hofmeister, Kühne, Kossel, Fischer, etc., se tiene algún concepto claro de la estructura de las proteínas. El resultado de estos estudios ha sido la formación del concepto de que los aminoácidos están ligados a través del grupo amigéno de uno con el grupo carboxil de otro con pérdida de agua formando así una amida substituída.

El método de hidrólisis es el que ha contribuido más hasta el presente para dilucidar la composición química y estructura de la molécula proteica.

La hidrólisis ha sido llevada a cabo principalmente por tres métodos: (1) hirviendo con ácidos. (2) hirviendo con álcalis y (3) por la acción de las enzimas proteolíticas. Bajo las condiciones experimentales, es dudoso saber si alguno de estos métodos produce hidrólisis completa.

De los tres métodos, hervir la proteína con ácidos fuertes es el que con mayor frecuencia se usa para efectuar la hidrólisis. Cuando se hace de esta manera, las proteínas producen una mezcla de amino ácidos, amoniaco y aquellos grupos no proteicos que pueden estar presentes en la pro-

teína bajo investigación. Las dificultades técnicas que envuelve una separación cuantitativa de los productos de descomposición, son tan grandes que no se pueden esperar resultados enteramente satisfactorios. Efectuando determinaciones en una buena cantidad de proteínas, se vió que la cantidad de aminoácidos varía desde 65 a 85%. Para la gelatina 91.3% y para zeína 102%. 110 a 120% representaría una recuperación completa, debido al hecho de que durante la hidrólisis se ha añadido moléculas de agua.

1.—*Acción del ácido sulfúrico.*

Desde el punto de vista histórico y probablemente también desde el punto de vista práctico, el ácido sulfúrico está colocado en primer lugar entre los ácidos que se han usado para hidrolizar proteína. El primer aminoácido aislado de un hidrolizado de proteína fué la glicina. Fué obtenido por Braconnot en 1820 en hidrolizados con ácido sulfúrico de gelatina. El ácido sulfúrico ha sido subsecuentemente usado por casi todos los investigadores de la química de las proteínas. La concentración del sulfúrico usualmente empleado es aproximadamente de 24 por ciento. La mezcla de zeína y ácido se calienta primeramente a baño de vapor de 1 a 3 horas hasta que cese la espuma y después se pone a reflujo en baño de aceite o aire (105°-110°) hasta que la hidrólisis sea completa. El tiempo requerido es usualmente de 12 a 24 horas. Algunas veces se necesita mayor lapso de tiempo o bien poner la materia en autoclave a 135 ó 150° C. durante corto tiempo, dependiendo de la proteína que se está investigando. El autoclave se usa solo rara vez y es dudoso si tiene ventaja sobre el calentamiento a reflujo por periodos más grandes y a presión ordinaria.

La ventaja principal del uso del sulfúrico sobre el clorhídrico, es la facilidad con que el ion sulfato se puede quitar con hidróxido de Bario o hidróxido de bario seguido de carbonato de bario.

2.—*Acido Clorhídrico.*

Fué primero introducido para hidrólisis de proteína en vegetales. El ácido sulfúrico es generalmente preferido si después se va a seguir el procedimiento del alcohol butílico o si las bases van a ser aisladas. El ácido clorhídrico es preferible cuando los monoaminoácidos van a ser determinados y la hidrólisis se lleva a cabo generalmente con 3 a 5 partes de ácido concentrado o 10 a 20 partes de ácido al 20%. La hidrólisis completa puede ser obtenida también con ácido 3N en autoclave a 150° durante 1 ó 2 horas. El tiempo requerido para la hidrólisis usual con clorhídrico es de 6 a 24 horas, cuando es a reflujo en baño de aceite. Algunas proteínas requieren sin embargo 48 horas y la caseína es una de las que más se dificultan hidrolizar por completo. Muchas veces la hidrólisis con este ácido se lleva a cabo en presencia de cloruro estañoso y el objeto es que la solución en lugar de ennegrecerse se conserve incolora, pero esto no siempre es posible. Fischer y otros investigadores no han considerado al cloruro estañoso como necesario, especialmente con ciertas proteínas aún cuando se use ácido muy fuerte.

De acuerdo con Van Slyke, el porcentaje de nitrógeno amínico alcanza un máximo definido cuando la hidrólisis ácida de una proteína es com-

pleta y este máximo es el mismo cuando la hidrólisis se lleva a cabo a 100° C. o a 150° C. Si las proteínas fueran hervidas con 10 a 20 partes de ácido clorhídrico al 20% durante 48 horas, se obtendrían resultados constantes.

Generalmente son necesarias veinticuatro horas en todos los casos, excepto en el de gluten y caseína que requieren 48 horas.

Algunas de estas hidrólisis causan una pérdida pequeña, pero definida de nitrógeno amínico, mientras que la cantidad de amoníaco nunca alcanza un máximo definido.

Para hacer la hidrólisis en autoclave se han usado concentraciones variables, tanto de clorhídrico, como de sulfúrico y los resultados finales han sido encontrados dentro de límites estrechos. Se han usado mezclas de clorhídrico con alcohol, aunque con esto no se logra ventaja alguna. Así mismo se han hecho ensayos con otros ácidos como el fluorhídrico bromhídrico, fórmico fosfórico, acético y anhídrido acético. Con ninguno de ellos se ha logrado obtener ventajas, excepto posiblemente cuando se desea aislar un aminoácido en partículas. El ácido clorhídrico no destruye tanto el triptófano como el H_2SO_4 .

3.—Hidróxidos.

El hidróxido de sodio, hidróxido de potasio e hidróxido de bario, producen una rápida y completa hidrólisis de las proteínas y además tienen la ventaja sobre los ácidos de que no destruyen el triptófano. Por lo tanto, esta clase de hidrólisis se usa siempre que se va a determinar dicho aminoácido. La tirosina casi siempre va acompañada de triptófano en las proteínas y es por eso que en las determinaciones, la hidrólisis debe ser alcalina; si se da el caso de que sólo se requiere cuantear la tirosina, no tiene importancia si la hidrólisis fué ácido o alcalina. La hidrólisis de proteínas con hidróxido de amonio o carbonato de amonio bajo presión, se ha experimentado pero no se han obtenido mejores resultados.

4.—Enzimas.

Este grupo de agentes hidrolíticos lo forman las enzimas proteolíticas. El estudio de la acción de las enzimas vegetales sobre las proteínas fué iniciado por Schulze y sus colaboradores, encontrando que su acción hidrolizante sobre las proteínas no llega a ser completa, aunque bajo ciertas condiciones puede casi igualar a la hidrólisis ácida o alcalina.

Algunos investigadores recientemente reportaron la presencia de grupos resistentes que usualmente contienen todos los de la fenilalanina y prolina de la molécula proteica. Con esto queda perfectamente explicado que no se usa esta clase de hidrólisis, siempre que se trate de la determinación de tirosina, pues esta no es más que la finalalanina con un oxidrilo unido en el ciclo bencénico. Además las enzimas son por sí mismas, proteínas y su empleo induce a error en los cuanteos.

Formación de humina.

La hidrólisis de proteínas con ácidos fuertes, produce usualmente un precipitado amorfo, color pardo nefruzco que comúnmente se denomina Melanina o humina. Una teoría acerca de su formación supone que se

debe a los productos de oxidación de los aminoácidos aunque hay poca evidencia para sostener esta idea. Todos los datos acumulados acerca de esto llegan a la conclusión de que la humina artificial formada durante la hidrólisis ácida de proteína, no es un simple producto de condensación seguida de una oxidación con la formación, por último, de una molécula o moléculas extremadamente resistentes. La naturaleza de las reacciones químicas que se llevan a cabo y la configuración estructural de la molécula de la humina, requieren aún dilucidación. La formación de la humina por lo tanto, interfiere en considerable extensión en el análisis de la molécula proteica; del nitrógeno total de la molécula proteica, se ha llegado a encontrar de 1% a 2% en la humina insoluble; otra pequeña pérdida se debe también a la formación de un color café que casi siempre acompaña a los hidrolizados.

La formación de humina, como es natural, interfiere grandemente cuando se trata de un análisis colorimétrico, como son casi todos los de aminoácidos; hay necesidad imperiosa de separarlos para dejar la solución transparente y lista para producir el color característico que se busca con el reactivo seleccionado. La eliminación de la humina se hace generalmente con carbón activado y esto es causa de una pequeña pérdida de aminoácidos debido a la adsorción que el carbón provoca.

1.—Lugg recomienda llevar a cabo la hidrólisis con hidróxido de sodio 5 N a 110° C. durante 20 a 24 horas con libre acceso de aire cuando se trata de la determinación de tirosina en presencia de diiodotirosina y también cuando hay tirosina junto con triptófano aún en el caso de que exista mucha cistina. También dice Lugg que la tirosina pura no es afectable cuando se calienta de 20 a 30 horas a 100° C. con ácido sulfúrico 7N o sosa 5N ó 5.5 N conteniendo 5% de cloruro estañoso. Sin embargo el mismo demostró que el calentamiento con ácido sulfúrico 7 N en presencia de carbohidratos produce una pérdida considerable de aminoácido.

2.—Jorpes, en un estudio cuidadoso del método de Millon-Folin que puede recobrar de 95.8 a 95.9 de tirosina, después del calentamiento a 100° C., durante 14 a 18 horas con Na OH₅N. Jorpes efectuó 17 determinaciones.

Bolling y Block como resultado de 38 experimentos acerca de la recuperación de la tirosina añadida a lactoglobulina (proteína que parece tener carbohidratos) y seis experimentos con tirosina sola, reportaron una pérdida de 11 a 17% de la tirosina añadida después de 5 horas de hidrólisis con NaOH5N en un baño de aceite a 115°-125° C. Finalmente sugirieron una corrección de 1.18 basada en el término medio de recuperación que es de 85% para ser aplicada a esta proteína bajo las mismas condiciones de hidrólisis.

3.—En el método de Suwerkalow que es una modificación de la reacción de Millan-Weiss, no se efectúa propiamente un hidrólisis, sino una disolución en NaOH diluida. 10 mg. de proteína se disuelven en 1 cm³. de NaOH al 5% y se calienta si es necesario.

4.—La adaptación de Fürth y Fischer al método de Millon efectúa la hidrólisis como sigue: 2.5 gms. de proteína se ponen a reflujo durante 12 horas con 3.5 cm³. de H₂SO₄ y 22.5 cm³. de agua, la solución se diluye a 50 cm³.

5.—En el procedimiento de Folin y Ciocalteu para efectuar la hidrólisis, se pesa un gramo de la proteína y se coloca en un matraz de Kjeldahl,

se agregan 2 cm³. de butanol para prevenir la formación de espuma y también se ponen dos espirales de plata para que si esta se forma, impedir que suba, y 5 cm³. de solución al 20% de hidróxido de sodio. Se pone a reflujo en baño María de 18 a 20 horas con el tapón cubierto con papel estaño. Se agregan 10 cm³. de agua y se hierve 10 minutos para remover el alcohol. Se quita de la flama e inmediatamente se agrega con pipeta de prisa y gota a gota, 10 cm³. de H₂SO₄ 14 N, así se precipita el ácido silícico evitando su solución coloidal. Se agita bien, se enfría, se añaden 5 cm³. más de H₂SO₄ 14 N, se transfiere a un frasco volumétrico de 100 y se lleva hasta la marca, se agita fuertemente y se filtra tapando el embudo con un vidrio de reloj.

6.—La modificación de Folin y Marenzi efectúa la hidrólisis colocando en un tuyo pyrex de 150 x 16 mm., 10 mg. de proteína seca más 2 cm³. de NaOH al 20% y se agita lentamente hasta disolución, se tapa con tapón bien ajustado y rodeado de papel estaño, se mete en un tubo de 50 cm³. de manera que sirva de condensador y se pone a reflujo en baño María de 16 a 18 horas, si se trata de globulinas, y de 12 a 14 horas si se trata de albúminas. Se agrega a la solución caliente 3 cm³. de H₂SO₄ 7N, obteniendo así el precipitado de sílice, pues de otra manera queda en estado coloidal. Se enfría y pasa a un frasco volumétrico de 25 cm³. y se diluye a la marca. Se agregan de 0.2 a 0.5 grs. de caolín, se agita y filtra por papel de 9 cm. cubriendo en los intervalos con un vidrio de reloj el embudo.

7.—Folin y Looney en su método recomiendan efectuar la hidrólisis de la manera siguiente: Se introduce en un matraz de cuello largo de Kjeldahl de 300 cm³. un gramo de la proteína purificada previamente secada durante 48 horas en un desecador de vacío sobre ácido sulfúrico. Se agregan 3.5 cm³. de hidróxido de Bario cristalino y 25 cm³. de agua, se cierra el cuello con un condensador de Hopkins y se pone a reflujo la mezcla sobre un pequeño quemador por 40 a 48 horas. Se agregan 30 cm³. de H₂SO₄ al 20% y se calienta el frasco en baño María de 30 a 60 minutos para quitar el H₂S que se pueda formar. Se enfría, se transfiere a un matraz volumétrico de 100, se diluye a la marca, se mezcla y se filtra a través de papel seco y en un frasco seco.

Como se puede advertir hasta ahora, todos los métodos de hidrólisis difieren entre sí, aunque muy poco. Cada autor sigue su propio método variando tal o cual condición y al final se consigue el objetivo; la separación de los aminoácidos.

En el caso de la tirosina, para obtener la coloración y determinarla con el colorímetro o fotocolorímetro, después de la hidrólisis, sigue la operación de separarla del triptófano, pues este interfiere en la formación de color. Esta separación se efectúa generalmente precipitándolo con sulfato de mercurio y centrifugando la solución.

En la mayoría de los casos, cuando se trata de proteínas de molécula complicada hay formación de humina o una coloración café que también impide la formación del color verdadero al añadir los reactivos para la tirosina y hay necesidad de decolorar la solución.

Como de ordinario, no se parte de proteínas puras, es decir, que además contienen como impurezas carbohidratos, grasas, etc., en las hidrólisis con ácidos fuertes, casi siempre hay formación de huminas y por consiguiente pérdidas que aunque pequeñas en algunos casos, hay que determinar y esto se consigue cuantando el nitrógeno humínico, total etc.

En la mayoría de los casos, como se parte de cantidades pequeñas de proteínas que varían desde 100 mg. hasta 102 gramos, la decoloración se hace agregando pequeñas cantidades de carbón activado como 20 mg. o 50mg. agitando bien y filtrando. En el carbón se quedan pequesísimas cantidades de aminoácidos debido al fenómeno superficial de la adsorción, que efectúa la retención de una micela por otra o bien por iones. Se efectúa la formación del adsorbato que es la unión del cuerpo adsorbente y adsorbido y que no es ni reacción química, ni mezcla, sino una fase intermedia que se ha denominado simplejo.

Generalmente en todos los métodos que se han desarrollado hasta nuestros días, las pérdidas que anteriormente se han explicado no se toman en cuenta y solo alguno que otro investigador les ha dado importancia.

Podríamos haber seguido apuntando muchísimas técnicas de hidrólisis, pero comprendemos que no tiene caso alguno transferir en este trabajo sino las principales, ya que casi todas varían entre sí muy poco y concuerdan en los resultados finales.

B I B L I O G R A F I A

- 1.—CARL E. A. SCHMIDT.—Chemistry of the aminoacids and proteins.
1938 Page 123.
- 2-3.—The aminoacid composition of proteints and Foods.
- 7.—RICHAR J. BLOCK Y DIANA BOLLING.—1945 Pages 85-88.

C A P I T U L O V

**DETERMINACION DE LA TIROSINA EN ALIMENTOS DIVERSOS,
ESPECIALMENTE EN CASEINA, Y LEVADURA DE CERVEZA.**

CAPITULO V

DETERMINACION DE LA TIROSINA EN ALIMENTOS DIVERSOS, ESPECIALMENTE EN CASEINA, Y LEVADURA DE CERVEZA.

La tirosina es sin lugar a duda uno de los aminoácidos más abundantes en la naturaleza, tanto en el reino vegetal, como en el animal. Damos enseguida una somera lista de substancias que la contienen y su respectivo porcentaje, para después exponer los trabajos que hicimos en el laboratorio determinando tirosina en algunos alimentos y aplicando los métodos que según creemos, sean de mayor utilidad y exactitud.

(1) % de tirosina en albuminoides naturales
Vegetales.

Edestina	2.0	5.0
Globulina	1.4	3.1
Legumina	1.5	6.0
Foseolina		2.8
Excelsina		3.0
Amandina		1.1
Glicinina		1.9
Conglutina		2.1
Legumelina (guisantes)		1.6
Leucosina (germen de trigo)		3.3
Avenina (avena)		1.5
Fibrina de gluten		4.4
Glutenina (trigo)	1.9	4.6
Glutelina (maíz)		3.8
Orizenina (arroz)		0.5
Gliadina (trigo)	1.2	3.0
Gliadina (centeno)		1.2
Horbenina (cebada)	1.7	4.0
Secalina (centeno)		1.4

ANIMALES

Gelatina	0.0	0.4
Ovoalbúmina	1.1	6.0

Lactolbúmina		0.9
Seroalbúmina		2.0
Seroglobulina		2.5
Fibrina	3.3	8.5
Caseína	3.5	7.2
Histona	5.2	6.3
Globina		1.3
Queratina	2.9	10.2
Fibroína (seda)	8.0	11.0
Placenta humana		1.7
Concha de tortuga		13.6
Sustancia gris del cerebro		1.5
Sustancia blanca del cerebro		0.7
(2) Elastina		1.5
Colageno		1.0
Neurogelatina		3.5
Hemoglobina	2.0	2.7
Albúmina de huevo	3.7	4.6
Conalbúmina (huevo)		1.7
Vilelina (huevo)	3.3	6.3

(3)

EN ALIMENTOS

Pan		4.2
Cereales	3.0	3.6
Carne	0.6	1.8
Pescado	0.8	1.6
Gelatina (pescado)	0.7	0.9
Mantequilla	1.3	3.0

HORMONAS ANIMALES Y ENZIMAS

Insulina	12.0	12.9
Pepsina	8.7	10.8
Tiroglobulina humana		3.3
Tiroglobulina coloide		3.4
Tripsina		

DETERMINACION DE TIROSINA EN CASEINA

Después de ensayar algunos métodos corrientes para la determinación de este aminoácido, nos decidimos finalmente por el método del α nítroso β naftol y nos propusimos encontrar una marcha que condujera a resultados satisfactorios. Este método, comparativamente con los demás, presenta grandes ventajas por su sencillez cuando ya se tiene el hidrolizado listo; además, la hidrólisis no está complicada debido a la solubilidad de la tirosina.

(4) Primeramente hicimos la determinación siguiendo las instrucciones de un método de Folin —Marenzi— Lugg explicado en el cap. II, que emplea un reactivo hecho a base de sulfato de mercurio, cloruro mercúrico y sulfato de sodio. Se pesó 1 gramo de caseína seca, haciendo la hi-

drolisis con NaOH a 1ON durante tres horas y a reflujo. Una vez efectuada la hidrolisis, el liquido se centrifugó para separar los sólidos y obtener una solución transparente que finalmente se aforó a 25 cm³. Al hacer las lecturas en el fotocolorimetro en tubos, resultaron muy bajas. Tratamos de ver si se debía a la concentración grande y entonces hicimos un hidrolizado con 100 mgr. de caseína y efectuando las lecturas en celdilla y no en tubo, como anteriormente, y aforando cada lectura a 25 cm³.

Antes hice una sencilla curva de sensibilidad con celdilla y poniendo 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8 y 1 mgr. de tirosina (aforando a 25 cm³.), obteniendo unas lecturas de 200, 320, 440, y 500 y 600 respectivamente.

De mi hidrolizado coloqué 2 cm³. en la celdilla, calentando suavemente como indica el método, poniendo 1 cm³. de reactivo de Lugg y 0.5 cm³. de solución de NaNO₂, diluyendo finalmente a 25 cm³. para hacer la lectura que fué de 275 y que corresponde aproximadamente a .4 mgr. de tirosina.

Cálculos: en 2 cm³. hay 0.4 mg.

en 25 cm³. hay 5 mg. (o sea en los 100 mgs. hidrolizados)

en 100 gr. hay 5 mg.

en 1 gr. hay 50 mg.

en 100 gr. hay 500 mg. = 5 δ.

o sea que por este método obtuve un resultado de 5% de tirosina para la caseína.

Por el método del α nitroso β naftol explicado en el Capítulo III y una vez hecha la gráfica de sensibilidad del reactivo, obtuve los resultados siguientes:

Con hidrolisis con sulfúrico diluido al 15%

6.8% de tirosina

Con hidrolisis con sulfúrico menos diluido

5.9% de tirosina

Con hidrolisis con NaOH al 10%

6.65% de tirosina

En las tres ocasiones se pesó un gramo de caseína y el volumen final

una vez centrifugado y separado al triptófano, se aforó a 50 cm³. y al hacer las lecturas hubo necesidad de diluir aún más para que no fueran demasiado altas. En el primer caso, o sea con el de hidrolizados hecho con sulfúrico al 15%, uno de esos 50 cm³. finales se diluyó a 10 cm³. de manera que los cálculos para este primer caso quedaron como sigue:

Un cm³. del hidrolizado de 50 cm³. se diluyó a 10 y de allí tomó 1 cm³. para hacer la lectura que fué de 180 que corresponde en la tabla a 136 gamas; de manera que en esos 10 cm³. habrá 1360 gamas y en los 50 cm³. hay 1360 X 50 = 68.000 gamas.

68,000 gamas en 1 gr.

68 mgr. en 1 gr.

.068 gr. en 1 gr.

6.8% de tirosina

En el segundo y tercer caso fué lo mismo, únicamente cambiando la lectura del colorímetro y por lo mismo el porcentaje.
Determinación en levadura de Cerveza.

Cantidad pesada: 1 gr., hidrólisis con sulfúrico al 10% durante tres horas, decoloración del hidrolizado con celita, volumen final 50 cm³. Método del α nitroso β naftol. 1 cm³. del hidrolizado más 1 cm³. de reactivo más un cm³. de HNO₃. Lectura en el aparato = 360 que corresponden a 231 gamas.

en 50 cm³. hay 11550 gamas o sea en 1 gr. de levadura en 1 cm³. hay 231 gamas.

11550 gamas = 11.5 mg. = .0115 gr. = 1.15% de tirosina en levadura de Cerveza.

B I B L I O G R A F I A

- 1.—Productos Químicos y Farmacéuticos. Prof. Francisco Giral. Ed. Atlante México, D. F. 1946 pág.
- 2.—3.—The amino acid composition of proteins and foods Richard J. Block and Diana Bolling (1945) pág.

CONCLUSIONES.

- 1.—La tirosina o para hidroxifenilalanina es un aminoácido muy abundante en la naturaleza, ya sea en estado libre o combinado, formando diversas proteínas.
- 2.—Hasta la fecha los métodos de cuanteo reportados para la determinación de la tirosina no se pueden considerar como satisfactorios enteramente, debido a la diversidad de resultados que se obtienen comparando unos con otros.
- 3.—Hemos hecho determinaciones cuantitativas de tirosina con algunos de los métodos corrientes y con el método del α nitroso β naftol, para el cual hemos tratado de aplicar un sistema que si no es definitivo, por lo menos es el punto de partida para un nuevo método que venga a substituir a los antiguos.
- 4.—Introducimos un método muy aceptable para cuando se trata de soluciones de tirosina pura, el de ácido selenioso.
- 5.—La tirosina no es un aminoácido de importancia inmediata en la alimentación, pues no figura entre los diez indispensables. El organismo la forma a partir de uno o algunos de esos y la formación en el organismo si ya es indispensable.

Mucha de su importancia radica en la formación de las melaninas que se encuentran diseminadas en la naturaleza.

F I N