

Laboratorio de Fisiología General del C. S. I. C.  
Facultad de Medicina de Valencia  
(Prof. J. García-Blanco)

## La reducción del ácido crómico en solución sulfúrica por los diversos aminoácidos naturales

por J. García-Blanco y A. M. Pascual-Leone

(Recibido para publicar el 12 de mayo de 1955)

En determinadas condiciones una solución de proteína en presencia de ácido sulfúrico concentrado y de pequeñas cantidades de cromato potásico transforma el color amarillo inicial de este reactivo en otro verde-azulado, debido a la reducción del crómico. No encontrando en la bibliografía a nuestro alcance dato alguno referente a este problema, hemos creído de interés estudiar la capacidad reductora de los diversos aminoácidos para el citado compuesto de cromo, en intento de separación analítica de unos ácidos aminados en presencia de otros. En efecto, la gran resistencia que ofrecen algunos de estos ácidos amínicos a su oxidación crómica y la gran sensibilidad que manifiestan otros, como se pone de relieve en este trabajo, abre algunas posibilidades para su diferenciación.

### Material y métodos

Hemos utilizado en todos los casos aminoácidos químicamente puros: metionina, alanina, ácido glutámico, ácido aspártico, glicocola, cisteína, cistina y valina de Merck D. Serina, leucina, isoleucina, tirosina, lisina y prolina de B. D. H. Arginina y fenilalanina de Hoffman-La Roche.

Los ácidos aminados se disolvían en agua, los solubles, y con ayuda de débiles cantidades de ClH los no solubles. La

solución acuosa de un aminoácido no debe contener alcohol, porque este cuerpo da también reacción positiva.

Las reacciones se han efectuado en bañomaría a ebullición. A un tubo de ensayo que se rodeaba de mezcla de hielo y sal se le agregaba: *a*) un centímetro cúbico de la solución del aminoácido a distintas concentraciones, al que se añadía un centímetro cúbico de solución; *b*) preparada inmediatamente antes por adición de un c.c. de cromato potásico N/2 ó N/4 a 20 cc. de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  concentrado (1'80), muy lentamente para evitar subida de temperatura.

Se transportaban los tubos antes indicados al bañomaría hirviente, donde se mantenían diez minutos, observando a intervalos la variación del color.

Al mismo tiempo, y para observar el cambio del color, se introducían en el mismo baño tubos conteniendo solamente los mismos volúmenes de agua, de sulfúrico y de cromato.

La reducción del cromato amarillo a sal crómica verde-azulada nos indicaba el término de la reacción. Tratándose en nuestro caso de una mera reacción cualitativa, hemos considerado como límite de sensibilidad la mínima cantidad de aminoácido que en presencia de la mínima cantidad de cromato da un color verde débil, pero sin matiz amarillo alguno.

Debe tenerse en cuenta que cualquier pequeño exceso de cromato enmascara de amarillo el color verde que hubiera podido producirse. Por otra parte, la reducción total de una gota de cromato N/8 transforma el color amarillo originario en un verde tan débil que se aprecia incoloro.

### Resultados

Los resultados obtenidos con los distintos aminoácidos se resumen en el cuadro siguiente. Por las razones antes expuestas debe entenderse que las cifras correspondientes a la capacidad reductora del ácido aminado para el ácido crómico sólo pueden ser valores medios, dado el viraje amarillo-verde de la reacción; no obstante, debido a la diferencia considerable que existe entre la mayoría de los grupos separados en el cuadro y muy especialmente entre los primeros y los últimos, carecen de valor los pequeños errores de apreciación de valor correspondientes a cada aminoácido.

Generalmente, con las cantidades límites insertas en el cuadro, se operó con un c. c. de una dilución en sulfúrico concentrado de cromato N/4, tal como se indica en el método como mezcla *b*), siendo ésta la dilución mínima en que se apreciaba el color. Con glicocola, histidina, fenilalanina, se empleó el



cromato N/2 en la misma dilución, por dar en su límite de concentración un color amarillo demasiado débil con el N/4.

Se notará en el cuadro antes indicado la ausencia de algunos aminoácidos naturales tales como el triptófano; este cuerpo, en presencia de sulfúrico y cromato, da un intenso color pardo-rojizo oscuro que invalida totalmente la apreciación del color verde característico de la reacción.

Los restantes no han sido investigados por no haber dispuesto de ellos durante las experiencias.

Hemos realizado también algunos ensayos con otros aminoácidos como norleucina, citrullina, ornitina y con alanina-beta; la sensibilidad de esta última es de 0'090 mg. por c.c.

### Discusión

En los resultados precedentes resalta, en primer término, la gran diferencia que ofrecen los diversos aminoácidos a su oxidación crómica. Un primer grupo de dichos cuerpos (isoleucina, serina, tirosina, leucina, arginina, cisteína, cistina, valina, fenilalanina, metionina, histidina) reducen en concentraciones de un octavo de mg. por c.c. a un mg. por c.c. En un segundo grupo encontramos los ácidos aspártico y glutámico, la alanina y la glicocola, que requieren cantidades de 60 mg. a 200 por c.c. para reducir la misma cantidad de ácido crómico en las condiciones experimentales aquí practicadas.

No resulta posible establecer relación alguna entre constitución molecular y capacidad reductora del ácido aminado. Baste indicar que la alanina es quinientas veces más resistente a esta oxidación que la norvalina y ochocientas veces más que la norleucina. La presencia de grupos fenólicos, sulfhidrúlicos, guanidínicos, imidazólicos, no tienen influencia apreciable como indica la simple inspección del cuadro.

Una consecuencia de los resultados anteriores se tiene en la posible eliminación oxidativa específica de ciertos aminoácidos en una mezcla de ellos, conservando otros como glicocola, alanina y ácidos aspártico y glutámico, lo que permitirá la más fácil separación de éstos. Las condiciones en las que habría de realizarse esta oxidación electiva han de ser objeto de estudio ulterior. Este procedimiento complementaría otro (I) basado en la destrucción con ácido nitroso de todos los aminoácidos a excepción de la prolina y oxiprolina.

### Resumen

Se estudian la capacidad reductora de los diversos aminoácidos naturales para el ácido crómico en solución sulfúrica concentrada. Se determina la cantidad mínima de aminoácido disuelta en un c.c. de agua capaz de reducir 1'62 mgr. (0'81 mgr. en otros casos) de cromato potásico disuelto en un c. c. de ácido sulfúrico de 1'80, después de mantener la mezcla diez minutos al bañomaría. En estas condiciones se apreciaron grandes diferencias en la capacidad reductora de unos a otros aminoácidos. Los más oxidables fueron isoleucina y un segundo grupo visible en el cuadro de leucina, tirosina, lisina y serina. Ofrecieron máxima resistencia a la oxidación alanina y glicocola en proporción de ochocientas y mil seiscientas veces con respecto a la isoleucina.

### Summary

The reducing capacity of divers natural amino-acids for chromic acid in a concentrated sulphuric solution is studied. The minimum quantity of aminoacid dissolved in one c.c. of water, capable of reducing 1,62 mg (0'81 mg in other cases) of potasic chromate dissolved in one c.c. of sulphuric acid is determined, after keeping the mixture for 10 minutes in a waterbath. In these conditions, great differences in the reducing capacity of one and other aminoacids were appreciated. The most oxidable were isoleucine and a second group visible in the table of leucine, tyrosine, lysin and paraglobine They offered a maximum resistance to the oxidation of alanine and glycocola in proportion of eight hundred and one thousand six hundred times with respect to isoleucine

### Bibliografía

- (1) HAMILTON, P. B. y ORTIZ, P. J. : *Jour. biol. Chem.*; **184**, 607, 1950

