

CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LOS GRUPOS AMINO LIBRES DE LAS PROTEINAS

por el

Dr. EUGENIO RIESZ

Profesor de la Facultad de Humanidades y Ciencias de Montevideo.
Ex-colaborador del Centro Nacional de la Investigación Científica - Paris.

Para nuestros conocimientos de la estructura de las proteínas es muy importante darse cuenta de los grupos amino a priori libres en ellas. Hablando de los grupos amino libres se trata, bien entendido, de los grupos amino primarios propiamente dichos y de los grupos amino guanidínicos. Muchos investigadores se han ocupado con bastante éxito de este problema, introduciendo diferentes grupos alifáticos y aromáticos en las proteínas. Se trató en la mayoría de los casos de la introducción de restos ácidos. No podemos enumerar aquí todos los trabajos al respecto, nos limitamos a mencionar la benzoilación de las proteínas, en la cual especialmente E. Abderhalden y St. Goldschmidt y sus colaboradores respectivos han logrado resultados interesantes. St. Goldschmidt y sus colaboradores (1) efectuaron la benzoilación de la ovo-albúmina, mientras que E. Abderhalden y sus colaboradores se ocuparon de la benzoilación de la gelatina (2) y de la fibrina de la seda natural (3).

Demostremos aquí, cómo los resultados de St. Goldschmidt en lo que se refiere a la ovo-albúmina fueron comprobados por nosotros según un método muy distinto: la acción del formaldehído-bisulfito sobre la ovo-albúmina, método que hemos elaborado en colaboración con J. Roche, y H. Lehr en el laboratorio de Química Biológica de la Facultad de Medicina y Farmacia de Marsella en 1941 (4).

Daremos además brevemente los resultados de nuestras investigaciones sobre la benzoilación de la lana, trabajo que hemos efectuado hace muchos años de acuerdo con St. Goldschmidt, y cuyos resultados hasta ahora no fueron publicados.

La acción del formaldehído-bisulfito sobre la ovo-albúmina

Los principales resultados de St. Goldschmidt y A. Kinsky (1) con respecto a la ovo-albúmina, fueron los siguientes:

- 1.) La benzoil-ovo-albúmina preparada contenía un 17% de grupos benzoil (C_6H_5-CO-).
- 2.) Los grupos benzoil introducidos pueden ser clasificados en dos grupos según la facilidad y la dificultad respectivamente, con la cual son desplazados por ácido sulfúrico al 70% a 34%; un 6,5% es fácilmente desplazado, un 10,5% difícilmente.
- 3.) Por hidrólisis de la benzoil-ovo-albúmina con ácido sulfúrico al 70% a 100° fué aislada la ϵ -benzoil-lisina, cuyo grupo benzoil es pues difícilmente desplazable. El grupo ϵ -ami-

no de la lisina pertenece entonces a los grupos amino libres de la ovo-albúmina.

- 4.) Al contenido total de lisina en la ovo-albúmina correspondería un 4% de benzoil difícilmente desplazable. Como fué encontrado un 10,5%, deben quedar libres también los grupos amino reales de otros amino-ácidos, contenidos en la ovo-albúmina.

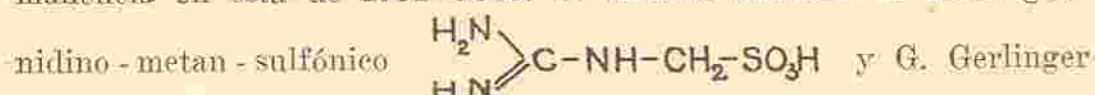
El 6,5 % de benzoil fácilmente desplazable debe estar ligado según St. Goldschmidt y W. Fuener (5) a grupos oxhidrilos, según St. Goldschmidt y W. Fuener (5) y Kiesel (6) también a grupos guanidínicos y según Kiesel (6) también a la histidina y probablemente a la prolina.

En nuestras investigaciones personales hemos utilizado para bloquear los grupos amino libres de la ovo-albúmina el formaldehído-bisulfito $\text{HO}-\text{CH}_2-\text{SO}_3\text{Na}$, presentando este método las ventajas siguientes:

- 1.) El formaldehído-bisulfito reacciona solamente con los grupos amino reales y los guanidínicos y no con los demás grupos.
- 2.) El formaldehído bisulfito se determina fácilmente según el método yodométrico.
- 3.) Se trabaja en solución acuosa y se obtiene también productos solubles en agua, aptos para reacciones posteriores, ev. encimáticas.

A pesar de que la reacción del formaldehído-bisulfito sobre diversas aminas es bien conocida (7), su acción sobre ácidos amínicos, polipéptidos y proteínas no fué estudiada, con excepción de su acción sobre esteres del glicocol, descrita por Scheibler y sus colaboradores (8).

Fuimos incitados a utilizar al formaldehído-bisulfito en la química de las proteínas por los estudios, que nuestros amigos P. Kienzle (9) y G. Gerlinger (10) habían efectuado en la Escuela Superior de Química de Mulhouse (Alsacia) durante nuestra permanencia en ésta de 1931-1935. P. Kienzle sintetizó el ácido guanidino-metan-sulfónico



otros ácidos amino-metan-sulfónicos (derivados de la guanidina, de la cianamida y de la guanilurea). Para la dosificación de estos productos del formaldehído-bisulfito mismo, G. Gerlinger elaboró además un método yodométrico.

Hemos estudiado la aplicación del formaldehído-bisulfito en la química de las proteínas, especialmente la acción del formaldehído-bisulfito sobre un cierto número de amino-ácidos y polipéptidos, en colaboración con J. Roche y H. Lehr (4), utilizando para la determinación cuantitativa de esta acción las informaciones de G. Gerlin-

ger (10), que el formaldehído-bisulfito al calentarlo con acetato de bario se transforma en sulfito de bario y formaldehído libre, de los cuales el último puede ser cuantitativamente destilado. G. Gerlinger dosifica el sulfito de bario y el formaldehído, mientras nosotros hemos limitado a la dosificación del primer producto de reacción, (el sulfito de bario), después de haber evaporado en solución neutra la totalidad del formaldehído. En presencia de formaldehído-bisulfito de un lado y productos de reacción de éste con los diversos amino-ácidos de otro lado, solamente el formaldehído-bisulfito es desdoblado por el acetato de bario, los productos de reacción: los ácidos amino-metan-sulfónicos (resp. sus sales) $RHN-CH_2-SO_3Na$ son estables contra este tratamiento y se necesitan bases cáusticas o ácidos minerales para desdoblar estos productos.

G. Gerlinger descompone así primero con ácido sulfúrico diluído el ácido amino-metan-sulfónico, recupera el ácido sulfuroso y el formaldehído en un balón conteniendo acetato de bario, donde continúa evaporando para recuperar cuantitativamente el formaldehído en un tercer balón. Este método algo complicado no podía servir para determinar en una solución de amino-ácidos y formaldehído-bisulfito, la proporción de este último, que ha entrado en reacción, siendo así desdoblados el formaldehído-bisulfito y los ácidos amino-metan-sulfónicos.

Por esta razón hemos puesto en reacción con los amino-ácidos una cantidad exactamente determinada de formaldehído-bisulfito, tratando después en diferentes intervalos partes alícuotas de la solución con acetato de bario y determinando yodométricamente, lo que quedaba del formaldehído-bisulfito y no había reaccionado. Por la diferencia de la cantidad del formaldehído-bisulfito puesto en reacción y encontrado después por medio del método indicado se podía determinar la cantidad de grupos amino-metan-sulfónicos formados. Como los ácidos amino-metan-sulfónicos, p. e. el ácido guanidino-metan-sulfónico, se descomponen cuantitativamente calentándolos con hidróxido de bario, formándose sulfito de bario y formaldehído, es también posible tratar una parte alícuota de la solución a examinar, con acetato de bario y otra con hidróxido de bario (que descompone naturalmente también el formaldehído-bisulfito), y calcular de la diferencia de sulfito de bario encontrado yodométricamente, la proporción de los grupos amino-metan-sulfónicos formados.

Hemos encontrado que los amino-ácidos necesitan bastante tiempo y un exceso de formaldehído-bisulfito para reaccionar. Sin embargo la reacción en la mayoría de los casos no es cuantitativa. Los amino-ácidos más básicos: lisina y arginina, examinadas después de un mes, habían reaccionado en una proporción mucho más grande que los mono-amino-ácidos especialmente el glicocol. Se deduce de los resultados que en la lisina ha reaccionado casi el 99% de uno de los dos grupos amino, probablemente el de posición ϵ no influido en su basicidad por el grupo carboxílico, y en la arginina casi el 80% del grupo guanidínico. De todos modos la reacción de Saka-

guchi (11), característica para el grupo guanidínico permanecía después de un mes de reacción, aún positiva.

En el trabajo efectuado en Marsella (4) ya mencionamos el hecho, de que el formaldehido-bisulfito reacciona con la ovo-albúmina y que la reacción de Sakaguchi (característica para el grupo guanidínico libre) había desaparecido casi totalmente después de un mes (nota en p. 1071 de la publicación respectiva).

Queremos insistir aquí sobre este hecho y opinamos que en esta reacción la totalidad de grupos ϵ -amino de la lisina y de grupos guanidínicos de la arginina, habían reaccionado con el formaldehido-bisulfito, (ver: reacción casi cuantitativa con la lisina misma, y desaparición del test Sakaguchi, bastante fuerte en la ovo-albúmina normal).

Según este experimento 1 g. de ovo-albúmina había reaccionado con 1,25 milimol de formaldehido-bisulfito, de manera que en 1 g. de ovo-albúmina están presentes también 1,25 milimol de grupos amino (amino reales p. e. de la lisina y guanidínicos de la arginina), lo que es 0,02 g. o el 2%. *La ovo-albúmina contendría pues un 2% en grupos amino, reales y guanidínicos (contando un grupo amino para cada grupo guanidínico). Visto que el contenido total de la ovo-albúmina en arginina es según J. Roche y G. Blanc-Jean (12) un 3,1%, el contenido correspondiente en grupo amino (un grupo amino para cada grupo guanidínico de la arginina) sería un 0,285%. Si se sustrae esto del 2%, quedaría para los grupos amino reales libres un 1,715%, lo que debería corresponder a los grupos amino, que según St. Goldschmidt y A. Kinsky (1) retienen un 10,5% de benzoil difícilmente desplazable con ácido sulfúrico al 70%. Como el peso molecular del grupo benzoil es 105 y lo del grupo amino 16, corresponde al 10,5% de benzoil un 1,6% en grupos amino reales libres, lo que coincide bastante bien con el 1,715% encontrado, respectivamente calculado según el método de aplicación del formaldehido-bisulfito.*

Sería interesante tratar la ovo-albúmina en solución de bicarbonato de potasio primero durante un mes con formaldehido-bisulfito y después con cloruro de benzoil para ver qué cantidad de benzoil puede entrar aún, sin desplazar los grupos metan-sulfónicos formados. Naturalmente sería necesario para esta determinación aislar de la solución el producto de reacción en estado de pureza.

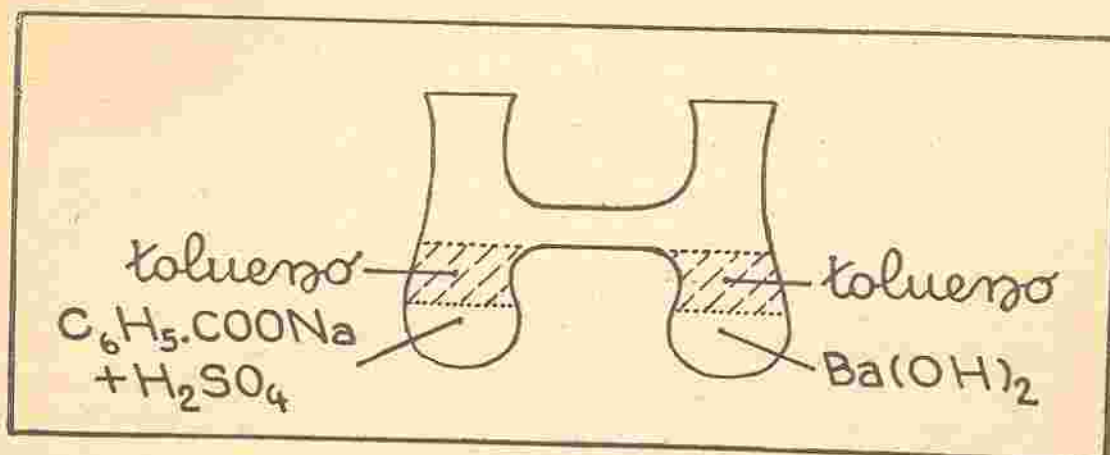
Damos brevemente a continuación los resultados, que hemos obtenido en

LA BENZOILACIÓN DE LA LANA.

La lana, cuyas impurezas más grandes y la lanolina previamente habían sido sacadas, fué hervida con agua para quitar las impurezas minerales y fué liberada de los últimos restos de grasa

por extracción con éter. La lana seca al aire contenía un 10% de humedad, determinado al secarla sobre pentóxido de fósforo en el vacío a 110°. La lana así secada contenía un 16,01% de nitrógeno y un 4,29% de azufre.

Para la benzoilación una parte de la lana en 10 de una solución de bicarbonato de potasio al 15% fué tratada con buena agitación mecánica durante 4 horas con 8 partes de cloruro de benzoilo, agregadas mediante una bola de bromo gota a gota. Después de las 4 horas fué sacada una toma y la benzoilación continuada por 4 horas agregando en las mismas condiciones 8 partes de cloruro de



benzoilo. Se sacó nuevamente una toma y se continuó la benzoilación con otras 8 partes de cloruro de benzoilo 8 horas más. Durante todo este tiempo se agregó bicarbonato de potasio a fin que la reacción del líquido sea siempre un poco alcalina al papel de tornasol. La benzoilación fué efectuada a 0° y 15° sin que la temperatura hubiera influido en el resultado, que fué un aumento del contenido de benzoil de 7 a 8% desde 4 hasta 16 horas de reacción.

tiempo de benzoilación	temperatura 0° % de benzoil encontrado	temperatura 15° % de benzoil encontrado
4 horas	7,29	7,37
8 "	7,58	7,67
16 "	8,07	7,98

El contenido en benzoil fué pues menos que la mitad comparado con el de la ovo-albúmina benzoilada.

Para la determinación del benzoil una toma fué calentada 24 horas con soda cáustica al 5% a 100°. El grupo benzoil aparece entonces en forma de benzoato de sodio, el cual con ácido sulfúrico diluído es transformado en ácido benzoico libre. Este último en un aparato de balanceo (ver figura) es extraído y conducido con tolueno

a una solución de hidróxido de bario $n/10$ o $n/20$ en exceso, donde el ácido benzoico es transformado en benzoato de bario.

Después de neutralizar el exceso de hidróxido de bario con ácido clorhídrico $n/10$ o $n/20$, utilizando fenolftaleína como indicador y filtración del carbonato de bario eventualmente formado, el benzoato de bario es valorado enantitativamente con ácido clorhídrico $n/10$ o $n/20$, utilizando heliantina como indicador, hasta aparición de ácido mineral libre. Esto sucede solamente después de haber sido liberado la totalidad del ácido benzoico.

Este método daba muy buenos resultados, verificados primeramente con ácidos benzoil-amínicos como la benzoil-leucina, la benzoil-diglicilglicina, la dibenzoil-lisina y la dibenzoil-tirosina.

La lana benzoilada y secada sobre pentóxido de fósforo en el vacío, contenía un 14,79% de nitrógeno y un 4,19% de azufre (pues menos que la lana no benzoilada).

Para saber en qué forma el grupo benzoil está ligado a la lana benzoilada, ésta fué hidrolizada con ácido sulfúrico al 70% a 37° y a 100°. La cantidad de benzoil desplazado fué determinada después de 1, 4, 8, 12 y 24 horas. Ya después de 12 horas la cantidad de benzoil desplazado quedó más o menos constante. *Fué desplazado en total algo menos que un 4%, igual a la mitad del benzoil total, tanto a una temperatura de 37° como a una de 100°.* Solamente en la primera hora el desplazamiento del benzoil es mucho más rápido a una temperatura de 100° que a una de 37°. *La mitad del benzoil en la lana benzoilada está pues en diferente ligazón que la otra mitad.*

Fué también determinado, según el método de Van Slike en la lana benzoilada y en la lana normal, la cantidad de nitrógeno, correspondiente a los grupos amino liberados por la acción del ácido sulfúrico al 70%. En la lana benzoilada fué encontrado así un 10,80% de nitrógeno de grupos amino liberados hidrolizando durante 24 horas a 100°; en la lana normal en las mismas condiciones un 11,69%. Como el contenido en nitrógeno total de la lana benzoilada es un 14,79% y en la lana normal un 16,01% en ambos casos solamente un 73% del nitrógeno total fué encontrado en forma de nitrógeno de grupos amino liberados. La diferencia de un 27% debe ser atribuida al contenido en grupos guanidínicos de la arginina, grupos imino de la prolina e histidina, núcleos dicetopiperacínicos difícilmente hidrolizables y en el caso de la lana benzoilada un 0,5% a grupos benzoilamino difícilmente hidrolizables. (4% benzoil).

El contenido en nitrógeno correspondiente a los grupos amino liberados fué determinado según Van Slike también durante la hidrólisis de la lana benzoilada con ácido sulfúrico al 70% a una temperatura de 37°. Fué muy interesante ver que en las primeras 4 horas ningún nitrógeno amínico fué liberado, y solamente después de 8 horas de hidrólisis un 1,2% de nitrógeno amínico y después de

24 horas un 6,17%. El hecho de que después de 4 horas de hidrólisis a 37° ningún nitrógeno amínico, pero sí un 3,24% de benzoil fuera liberado — (siendo la totalidad del benzoil fácilmente desplazable un 3,97%) — nos da la prueba convincente, que éste 3,24% de benzoil no pudo haber estado ligado a grupos amino reales, si no a grupos oxhidrilos de la tirosina y serina, a grupos imino de la prolina e histidina y eventualmente a grupos guanidínicos de la arginina. La hidrólisis con ácido sulfúrico al 70% desdobra pues primeramente este tipo de ligazón del grupo benzoil y solamente después ligazones —CO—NH— probablemente polipépticas.

HIDRÓLISIS CON ÁCIDO SULFÚRICO AL 70%

tiempo de hidrólisis horas	temperatura 37° lana benzoilada		temperatura 100°		
	% de benzoil encontrado	% de (NH ₂) N encontrado	% de benzoil encontrado	% de (NH ₂) N encontrado	% de (NH ₂) N encontrado
1	2,27	0	3,39	7,67	7,93
4	3,24	0	3,49	9,44	9,63
8	3,43	1,24	3,54	9,61	10,08
12	3,83	3,31	3,71	10,12	10,98
24	3,97	6,17	3,90	10,80	11,69

En fin hemos comparado las propiedades tintoriales de la lana benzoilada frente a colorantes ácidos y básicos con las de la lana pura. En el caso de los colorantes ácidos, la diferencia tintorial fué muy neta, la lana benzoilada no fué más coloreada, faltando los grupos básicos, responsables para la primera etapa de asociación del colorante ácido con la lana. En el caso de los colorantes básicos se manifestó solamente una disminución en la intensidad de la coloración de la lana benzoilada en comparación, con la de la lana pura. En el caso de los colorantes básicos los dos ácidos dicarboxílicos: el ácido glutamínico y el ácido asparagínico parecen intervenir en la primera etapa de asociación. Pero para la tintura sólida, que suministra los colorantes ácidos y básicos a la lana normal, parecen ser responsables los grupos —CO—NH— de la lana, formando por resonancia y polarización complejos estables con los colorantes respectivos.

RESUMEN

La propiedad del formaldehído-bisulfito de desdoblarse por acción del acetato de bario en formaldehído y sulfito de bario, la cual no poseen los productos de acción del formaldehído-bisulfito sobre compuestos con grupos amino o guanidínicos — los ácidos amino-metan-sulfónicos mucho más estables — fué utilizada para la determinación de los grupos amino libres de la ovo-albúmina, habiendo J. Roche, H. Lehr y E. Riesz ya estudiado este método en el caso de diversos amino-ácidos y polipéptidos. Haciendo reaccionar un exceso bien determinado de formaldehído-bisulfito durante un mes sobre una solución acuosa de la ovo-albúmina con bicarbonato de potasio, dosificando después yodométricamente la cantidad de formaldehído-bisulfito, que no había entrado en reacción y que era transformada por acetato de bario y volatilización simultánea del formaldehído en sulfito de bario, fué encontrado un 2% de grupos amino libres (reales y guanidínicos). Sustrayendo de este valor de 2% un 0,285%, que corresponde a los grupos guanidínicos según el contenido total de la ovo-albúmina en arginina (3,1%) y contando siempre un grupo amino para cada grupo guanidínico, queda un 1,7% para los grupos NH_2 reales libres, valor que coincide bastante bien con el encontrado por Goldschmidt y Kinsky (1,6%) calculado del 10,5% de grupos benzoil difícilmente desplazables, en la benzoil-albúmina, con ácido sulfúrico al 70%.

Por benzoilación se pudo introducir un 8% de benzoil en la lana, del cual la mitad es fácilmente, la otra difícilmente desplazable por ácido sulfúrico al 70%. El 4% de benzoil fácilmente desplazable está probablemente ligado a grupos oxhidrilos, imino (de la histidina y prolina) y guanidínicos de la arginina, el 4% de grupos benzoil difícilmente desplazable a grupos amino reales. Solamente un 73% del nitrógeno total de la lana y de la lana benzoilada respectivamente fué encontrado después de la hidrólisis con ácido sulfúrico al 70% y por determinación del nitrógeno amínico según el método de Van Slike. La parte restante del nitrógeno (27%) debe ser atribuída al contenido en grupos guanidínicos de la arginina, grupos imino de la prolina e histidina, núcleos dicetopiperazínicos difícilmente hidrolizables y en el caso de la lana benzoilada también a grupos benzoilamino difícilmente hidrolizables.

Bibliografía

- 1.) St. Goldschmidt y W. Schoen, Zeitschrift, f. physiol. Chem. 165, p. 279 (1927), St. Goldschmidt y A. Kinsky. Zeitschrift, f. physiol. Chem. 183, p. 244 (1929).
- 2.) E. Abderhalden y A. Schmitz, Zeitschrift f. physiol. Chem. 190, p. 101, Chem. Centralblatt 1933 I, p. 3087.
- 3.) E. Abderhalden y H. Brockmann, Biochem. Zeitschrift 211 p. 395 (1929), 226 p. 209 (1930), E. Abderhalden y A. Bahn, Zeitschrift f. physiol. Chem. 210, p. 246 (1932), Chem. Centralblatt 1933, I. p. 3093.
- 4.) Jean Roche, Hanina Lehr y Eugène Riesz, Bulletin de la Société de

- Chimie biologique t. 25 N.º 1 p. 1064 (1943). Por equivocación figura en esta publicación el nombre de Ernest Riesz en vez de Eugène Riesz.
- 5.) St. Goldschmidt y W. Fuener, Liebigs Annalen 483 p. 195 y 202 (1930).
 - 6.) Kiesel Chem. Centralblatt 1936 I. p. 3850, 1937 II. p. 3468.
 - 7.) Knoevenagel, Ber. D. Chem. Ges. 38 p. 217 (1905), Bucherer y Schwalbe, Ber. D. Chem. Ges. 39 p. 2796 (1906).
 - 8.) Scheibler y Colaboradores, Ber. D. Chem. Ges. 55 p. 1358 (1922). Chem. Centralblatt 1922 III. p. 359, Ber. D. Chem. Ges. 59 p. 1500 (1926). Chem. Centralblatt 1926 II. p. 1530.
 - 9.) P. Kienzlé, Thèse Doct. Univ. Paris (mention Sciences) 1934. Jouve et Cie. edit. Paris.
 - 10.) G. Gerlinger, Contribution à l'étude des acides amino-méthane-sulfoniques dérivés de la guanidina, de la dicyandiamide et de la guanylurée. Thèse Doct. Univ. Strasbourg (mention Sciences) 1936, Jouve et Cie., edit., Paris; M. Battegay y G. Gerlinger, Bull. Soc. Chim. 1934 p. 1618, G. Gerlinger, Bull. Soc. Chim. 1936, p. 47.
 - 11.) Sakaguchi, Journ. of Biochem. 5 p. 13, 25, 159, Chem. Centralblatt 1925 II. p. 1547, C. Dumazert y R. Poggi, Bull. Soc. Chim. biol. t. 21 p. 1381 (1939).
 - 12.) J. Roche y G. Blanco Jean, Bul. Soc. Chim. Biol. 23. p. 1006 (1941).