

## ***Estudio sobre la determinación del triptófano en el hidrolisado proteico Prothydrol***

Por los Dres.:

ARGIMIRO RODRÍGUEZ,<sup>(5)</sup> IVAN POPDIMITROV <sup>(6)</sup> y ANA PAKMAN <sup>(7)</sup>

La importancia del triptófano para la evaluación de las propiedades químicas y biológicas de los hidrolisados proteicos proviene de su condición de ser el más lábil, en las hidrólisis ácidas, entre los aminoácidos indispensables y de ser también el limitante en cuanto al aprovechamiento de los mismos por el organismo. Aunque últimamente esta propiedad limitante se le discute al triptófano en favor de la isoleucina,<sup>1,3</sup> todavía la gran mayoría de los autores reconocen la prioridad y la importancia del triptófano y estima las posibilidades de aprovechamiento y actividad biológica de los hidrolisados o de las proteínas en general, por la presencia del último. Esta puede ser la explicación de la marcada atención que le prestan los investigadores desde su descubrimiento por *Hopkins and Coló* (1901) (citado por<sup>7</sup>) hasta hoy día.

Durante todo el tiempo del trabajo experimental y clínico, en los últimos tres años, cuando teníamos que comprobar las propiedades y luchar por el derecho de existencia y prosperidad del nuevo hidrolisado proteico para uso parenteral Prothydrol, nos enfrentamos continuamente con una infinidad de problemas sobre la no destrucción y conservación, sobre la determinación exacta de este aminoácido, sobre las posibilidades y errores de su evaluación en los hidrolisados, en fin, sobre la naturaleza tan singular del triptófano.

En este trabajo nos impusimos la tarea de presentar algunos de los pasos realizados en el intento de descubrir ciertas particularidades:<sup>1</sup> en torno a la presentación del triptófano, revelado con distintos métodos clásicos; 2, su manifestación en distintas condiciones de conservación y con el tiempo. El fin deseado era, descifrando los factores que influyen sobre la evidencia del aminoácido, demostrar indiscutiblemente su presencia en el Prothydrol como también aclarar algunas de las fuentes de error para los que tienen que estimar las propiedades químicas y biológicas de los hidrolisados proteicos en general.

En el trabajo se ensayaron los métodos colorimétricos de determinación cuantitativa de *My and Rose*,<sup>6</sup> *Chambers*,\* *Kraus*<sup>5</sup> y *Tilintan*\* y cualitativas de identificación, sea del triptófano como también de algunos otros aminoácidos indispensables más, por cromatografía en papel.<sup>2</sup>

---

<sup>5</sup> Director Técnico del Laboratorio de la Sección de Desarrollo Técnico, Empresa Consolidada de Productos Farmacéuticos, Reina, 310, Habana, Cuba.

<sup>6</sup> Candidato de las Ciencias Médicas de la República de Bulgaria. Colaborador Científico Superior del Laboratorio de la Sección de Desarrollo Técnico de la Empresa Consolidada de Productos Farmacéuticos. Reina, 310, Habana, Cuba.

<sup>7</sup> Colaboradora Técnica del Laboratorio de la Sección de Desarrollo Técnico de la Empresa Consolidada de Productos Farmacéuticos. Reina, 310, Habana, Cuba.

De paso se hicieron algunas determinaciones comparativas con otros hidrolisados de procedencia extranjera que teníamos a nuestro alcance: (Amigen U.S.A., Hydrolysine L-103 URSS y el Español). Como confirmación de las propiedades biológicas del triptófano, no revelado por los métodos clásicos, se hizo también un experimento con ratones. Las determinaciones colorimétricas se hicieron con fotocolorímetro chino.

*Resultados experimentales:*

En la tabla 1 y gráfico 1 presentamos los datos de valoración del triptófano en una escala de diluciones de 10 a 100 mg% por 1, tres métodos clásicos: de *My and Rose*, *Chambers y Kraus*.

El estudio comparativo de las tres escalas demuestra, que en nuestras condiciones, el método de *My and Rose* da una irregularidad de la curva, sin considerar la parte práctica, que para desarrollar la reacción se emplean cantidades relativamente grandes de ácido

clorhídrico. Además nos fue posible observar un aumento de la intensidad de la coloración irregular que a veces duraba hasta el cuarto día.

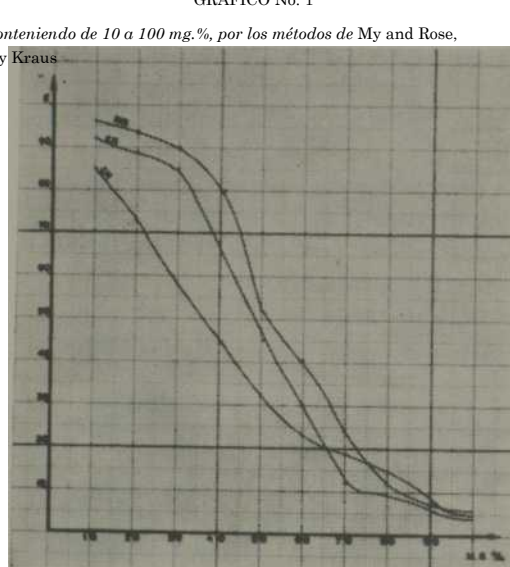
Las otras dos escalas de *Chambers y Kraus* podrían servir mejor presentándose rectas en el tramo de máximo empleo de las curvas. En el mismo sentido de razonamiento, la curva de la escala del método de *Kraus* resulta la más apropiada, puesto que comprende en su parte recta los valores entre 12 y 85 mg%. No obstante eso, el método de *Kraus* se nos impuso también por manifestarse algo más sensible que el de *Chambers*, revelando valores del triptófano superiores aproximadamente en un 10%. De manera que la parte fundamental de los estudios se realizó por el método de *Kraus*.

Para aclarar el fenómeno del gradual descenso de los valores del triptófano que habíamos observado tanto en nuestro hidrolisado (Prothydrol) como en los demás de procedencia foránea, tuvimos en cuenta antes que nada la influencia del bisulfito sódico.

TABLA No. 1

| Triptóf.<br>Escalas de los<br>en mg.% | Extinciones<br>de los métodos<br>Chambers y Kraus |          |          |
|---------------------------------------|---|----------|----------|
|                                       | My and<br>Rose                                    | Chambers | Kraus.   |
| 10                                    | 96  | 84.8     | 92.5     |
| 20                                    | 93  | 72.8     | 89.6     |
| 30                                    | 90  | 58       | 85       |
| 40                                    | 81  | 45.4     | 68       |
| 50                                    | 52  | 32       | 45       |
| 60                                    | 41  | 23.2     | 29.5     |
| 70                                    | 24  | 19       | 12       |
| 80                                    | 12  | 15       | 10.5     |
| 90                                    | 8   | —        | 7        |
| 100                                   | 6   | 5.4      | 5.5      |
| Cifras<br>promedio<br>de:             | 4 lotes.  | 5 lotes. | 6 lotes. |

GRAFICO No. 1



Como es sabido, el bisulfito de sodio se emplea universalmente en los hidrolisados proteicos como preservantes de la oxidación de algunos de los aminoácidos. La dosis más frecuentemente usada para este fin es de 0.5 gr.‰

Analizando exprofezo en 10 lotes distintos el valor del triptófano se pudo determinar un descenso promedio de 6 mg.‰ del mismo en las pruebas que tenían 0.5 gr.‰ de bisulfito sódico en comparación con las de testigo, que estaban exentos del reductor. Cantidades experimentales más alta de 1 gr.‰ y de 2 gr.‰ redujeron aún más los valores del triptófano bailados. (Vea tabla 2).

TABLA No. 2

| No.       | Metabisulfito en mg.‰ |     |     |     |
|-----------|-----------------------|-----|-----|-----|
|           | 0.0                   | 0.5 | 1.0 | 2.0 |
| 86        | 57                    | 54  | -   | -   |
| 87        | 18                    | 40  | 37  | 35  |
| 80        | 18                    | 42  | -   | -   |
| 102       | 49                    | 46  | -   | -   |
| 102/1. h  | 74                    | 70  | -   | -   |
| 102/1.5h  | 85                    | 83  | -   | -   |
| 102/3. h  | 77                    | 63  | -   | -   |
| 102/3.5 h | 74                    | 63  | -   | -   |
| 102/4.5h  | 63                    | 58  | -   | -   |
| 112       | 57                    | 53  | -   | -   |

Dependencia de los valores del triptófano por la cantidad del bisulfito sódico utilizado.

A continuación se hizo un estudio de la disminución de los valores del triptófano con el tiempo. Para este fin se ampuló hidrolisado de los lotes 86, 87 y 89. Las ampulas del lote 87 se guardaron en distintas condiciones: (véase gráfico 2) en refrigerador (4°-8°C.) (N), a temperatura y luz ambiente, (30°-32°C.) (A) y a temperatura ambiente en obscuridad (0).

Como se puede apreciar por las curvas presentadas en el gráfico 2, las muestras

expuestas a temperatura y luz ambiente presentan un descenso de 21- 30% del triptófano inicial en un plazo de 48 a 120 días (Véase pág. siguiente).

La diferencia que muestran los tres lotes en la rapidez de disminución la referimos a variaciones en la preparación de los distintos lotes, debidas a las condiciones de producción todavía no estandarizadas, lo que en definitiva con firma la misma tesis de la labilidad del triptófano frente a diferentes factores a veces imponderables.

Las muestras guardadas bajo refrigeración y en la oscuridad difieren muy poco, con menos de 10%, respecto a la disminución de los lotes citados.

Claro está que la presencia de bisulfito sódico ha de tenerse en cuenta en estas determinaciones por su propiedad de combinarse con los aldehidos, reduce la intensidad del color de la reacción dando determinaciones más bajas como es muy fácil comprobar.

Otro factor que podía influir en la valoración del triptófano era el alcohol etílico que empleamos en el Prothyrol como fuente calorígena, o la glucosa de algunos hidrolisados foráneos.

Un estudio detallado en este sentido reveló interesantes interrelaciones entre la función aldehídica de la dextrosa y el acetaldehido que se forma en las soluciones de alcohol etílico y el triptófano. Es sabido, que la mayoría de las reacciones colorimétricas empleadas para la determinación del triptófano, (*My and Rose, Chambers, Kraus, Tilintan, etc.*), están fundamentadas en la conjugación del grupo aldehídico del reactivo, (para-dimetil-amino-benzaldehido o bien 3-metoxi 4 hidroxibenzaldehido o vainillina, bien ácido glioxílico, metanal, acetaldehido, etc.) que al combinar el oxígeno de su función aldehídica con el hidrógeno amínico del

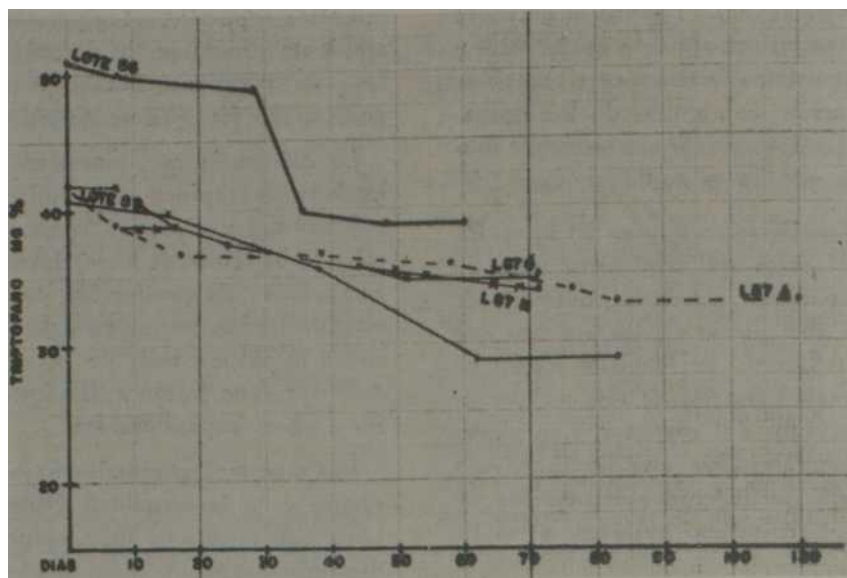


GRAFICO No. 2  
Fig. No. 1  
Aparente disminución del triptófano con el tiempo.  
Gradual descenso de los valores del triptófano por influencia del formaldehído.  
Método de Kraus.

triptófano forman un derivado conjugado del indol de color azul, púrpura o amarillento.

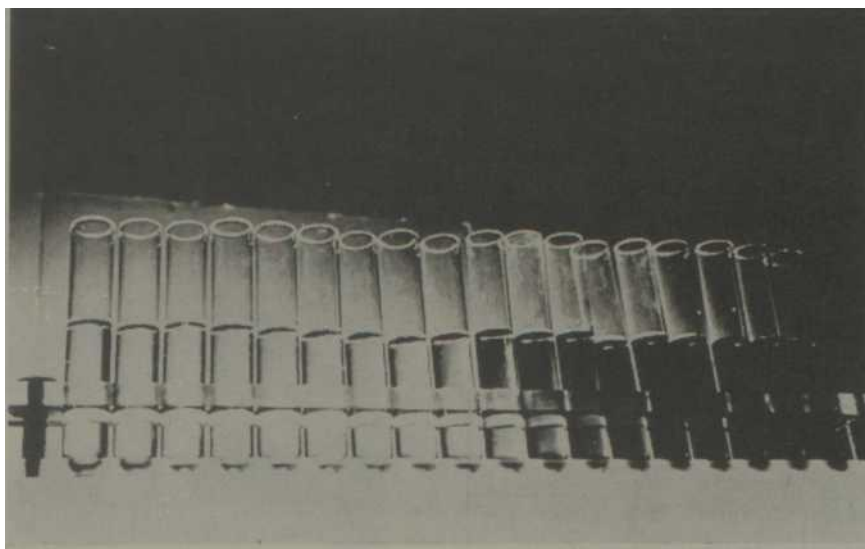
Siempre insistiendo en nuestro cometido de esclarecer la causa de la reducción de los valores del triptófano en sus sucesivas etapas después de la producción de un hidrolisado proteico, se llegó lógicamente a la conclusión de que podían ser bien la glucosa como aldehído, bien el acetaldehído contenido en el alcohol etílico, los causantes de este fenómeno.

Para confirmar esta conclusión, se montaron ensayos apropiados que a continuación describimos sucintamente:

1. en primer lugar por medio de la reacción de Schiff, se demostró que el alcohólico envasado contiene ordinariamente acetaldehído.
2. Se demostró la acción bloqueante del grupo aldehídico empleando para este fin formaldehído. Al efectos se preparo una solución valorada de triptófano de 60 mg.

En once tubos de ensayo se distribuyeron 2 mi. de esta solución en cada uno. El primero se dejó como testigo y a los otros diez se añadieron cantidades crecientes de 0.1, 0.2, 0.3... 0.9, 1.0 mi. de solución de formol al 0.4%. Pasada una hora se practicó con todos los tubos la reacción de *Kraus* que nos reveló una gradual disminución de los valores del triptófano, hasta desaparecer, según aumentaba el contenido de formol en los tubos. (Fig. No. 1).

3. En otra prueba se mezcló la misma solución de triptófano (60 mg%) en un tubo con 2% de alcohol y en otro con 5% de glucosa (cantidad de alcohol que usamos en el Prothydrol y de glucosa que se usa en diversos hidrolisados extranjeros). Se pudo observar que el tubo testigo acusó la presencia de 60 mg/% de triptófano, sea en el día del ensayo como también a los 15 y a los 30 días más tarde, mientras los valores del triptófano en la mezcla con alcohol y con



glucosa fueron bajando gradualmente. (Tabla 31.

Basados en estos ensayos y algunas pruebas con la reacción del TillmanAlt, que confirmaron la misma regularidad, surgió la idea de crear un nuevo método para determinar el triptófano bien "libre" o bien bloqueado por aldehidos-"enmascarado", en los hidrolisados proteicos, empleando como reactivos los mismos o semejantes agentes, que

producen el error o sea, la glucosa y el acetaldehido. Los trabajos sobre este asunto no están terminados.

Además de la identificación y determinación del triptófano por métodos colorimétricos, este fue también identificado conjuntamente con otros aminoácidos, por cromatografía, según distintos métodos seleccionados.<sup>8</sup>

En la figura 2 y tabla 4 presentamos algunas de estas determinaciones cromatográficas.

TABLA No. 3

|                                 | Reacción de Kraus |         |         |
|---------------------------------|-------------------|---------|---------|
|                                 | Inmediata         | 15 días | 30 días |
| Triptóf. 60 mg.%                | 60                | 60      | 60      |
| Triptóf. 60 mg.% más 2% alcohol | 57                | 53      | 53      |
| Triptóf. 60 mg.% más 5% glucosa | 47                | 43      | 38      |

*Disminución de los valores del triptófano en presencia del alcohol y glucosa. Método de Kraus.*

| Rf | BUTANOL<br>ACETICO<br>AGUA | ETANOL<br>77% | ETANOL<br>AC<br>SULFURICO | BUTANOL<br>AMONIACO | BUTANOL<br>AMONIACO |
|----|----------------------------|---------------|---------------------------|---------------------|---------------------|
| 90 |                            |               |                           |                     |                     |
| 80 |                            |               |                           |                     |                     |
| 70 | • IUCUI<br>• ISOLEUC       |               |                           |                     |                     |
| 60 | • ENALAN                   | • TIROS       |                           |                     |                     |
| 50 |                            | • TRIPTOF     |                           |                     | • METION            |
| 40 | • ALINA<br>• TRIPTOF       |               | • TRIPTOF                 |                     |                     |
| 30 | • TIROS                    |               |                           |                     |                     |
| 20 |                            | • KISTIO      |                           | • TRIPTOF           |                     |
| 10 |                            | • TREON       |                           |                     |                     |
|    |                            |               |                           |                     | • CISTINA           |

TABLA No. 4



Determinaciones cromatográficas del triptófano y algunos aminoácidos más, Fig. 2 empleando distintos solventes.

tográficas, con las que pusimos énfasis en detectar el triptófano. Una comparación global, por el momento, de la característica cromatográfica del Protliydrol con otros hidrolisados de procedencia extranjera, como Amigen, Hydrolysin L-103 y el Español, muestra aparente identidad en los grupos de aminoácidos presentes. En un futuro, nos proponemos un estudio cuantitativo más detallado de los aminoácidos de nuestro producto.

Después de haber demostrado la existencia del triptófano en distintas condiciones de

conservación, o sea, habiéndose aclarado que los métodos convencionales de determinación de este aminoácido revelan solamente aquella parte que no está enmascarada por la presencia del metabisulfito o la acción de los aldehidos del alcohol o de la glucosa, se nos presentó una interrogante de orden biológico:

Podíamos estar seguros de que este aminoácido, que juega papel tan importante en el metabolismo de las proteínas, poseía las mismas virtudes en estado libre como enmascarado? Más específicamente: Podían cubrirse

los requerimientos diarios de triptófano en un animal, administrándole el aminoácido en forma químicamente combinada? Era de capital importancia resolver este problema ya que de su solución depende la evaluación biológica de los hidrolisados en general.

Para poder responder a esta pregunta se montaron experimentos apropiados con ratones. Se ensayaron tres grupos de 4 ratones cada uno. Los animales se alimentaron durante 20 días con las siguientes dietas:

*Grupo O:* Con una mezcla de gelatina, (proteína que no contiene triptófano), azúcar y almidón de maíz más los requerimientos diarios de vitaminas A, B, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, Nicotinamida y Vitamina C, (ausencia del triptófano comprobada por *Kraus*).

*Grupo T:* La misma alimentación más la dosis suficiente de triptófano adicionado.

*Grupo T + a:* La misma alimentación del grupo T, pero con el triptófano enmascarado por medio del formaldehído, de forma que comprobado por el método de *Kraus* 110 daba coloración alguna; o sea, dieta que

químicamente aparentaba igual a la del grupo O.

Se chequeó el peso de estos ratones cada 4 días así como su comportamiento (Vea tabla 5).

Por la tabla se puede apreciar, que el grupo O, cuyos ratones recibieron una alimentación carente de triptófano, perdieron en los 20 días 30 gramos, o sea 27% del peso total del lote; además, uno de ellos murió a los 17 días, otro a los 21 y otro a los 24 días del inicio del experimento.

Los ratones del grupo T, que tenían alimentación con triptófano, mantuvieron prácticamente su peso ganando 2 gramos.

Los del grupo T + a, o sea que no les faltaba triptófano, pero que lo tomaron en forma combinada ("enmascarado"), sorpresivamente aumentaron 9 gramos, (más del 10%) y lucían los más lustrosos y vivaces. El triptófano, en forma 110 detectable por las reacciones convencionales, por estar conjugado con 1111 aldehído, se había comportado biológicamente tan eficiente si cabe, tal vez más aún que en forma libre.

|     | FECHA → | 25-XI-65 | 29-XI-65 | 3-XII-65 | 7-XII-65 | 11-XII-65 | PESOS DEL LOTE |       |
|-----|---------|----------|----------|----------|----------|-----------|----------------|-------|
|     |         |          |          |          |          |           | INICIAL        | FINAL |
| O   | C-R     | 18 gm.   | 16 gm.   | 14 gm.   | 13 gm.   | 12 gm.    | 82             | 52    |
|     | C-A     | 24 "     | 22 "     | 19 "     | 17 "     | + (15g)   |                |       |
|     | L-R     | 20 "     | 18 "     | 16 "     | 14 "     | 13 gm.    |                |       |
|     | L-A     | 20 "     | 18 "     | 15 "     | 13 "     | 12 "      |                |       |
| T   | C-R     | 20 "     | 18 "     | 20 "     | 21 "     | 22 "      | 86             | 88    |
|     | C-A     | 22 "     | 21 "     | 21 "     | 22 "     | 22 "      |                |       |
|     | L-R     | 22 "     | 21 "     | 20 "     | 20 "     | 20 "      |                |       |
|     | L-A     | 22 "     | 19 "     | 20 "     | 23 "     | 24 "      |                |       |
| T+a | C-R     | 23 "     | 20 "     | 22 "     | 23 "     | 24 "      | 84             | 93    |
|     | C-A     | 22 "     | 22 "     | 25 "     | 26 "     | 28 "      |                |       |
|     | L-R     | 23 "     | 23 "     | 25 "     | 25 "     | 25 "      |                |       |
|     | L-A     | 16 "     | 15 "     | 16 "     | 16 "     | 16 "      |                |       |

TABLA No. 5

Cambios del peso de ratones alimentados con dietas: Con triptófano (T), exenta de triptófano (O) y con triptófano enmascarado (T+a).

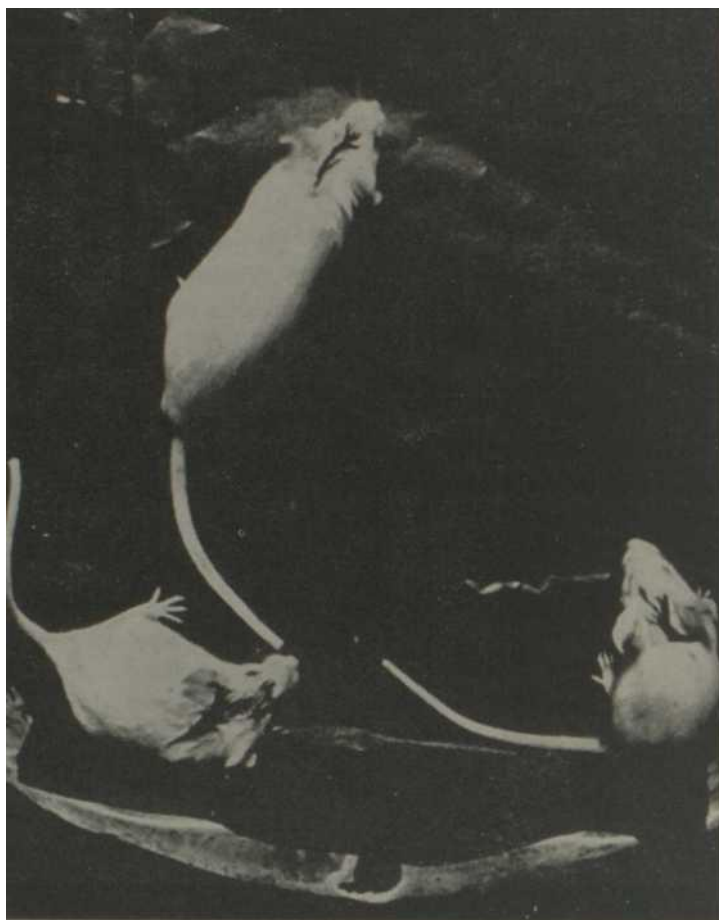


Fig. 3

Aspecto ile los ratones de los ,i grupos a los 20 días de alimentación experimental.

Esta figura de ratones, alimentados con triptófano “libre” y “enmascarado”, frente al grupo privado totalmente de este aminoácido, demuestra lo que es conocido, que el triptófano es incondicionalmente indispensable para el metabolismo normal de las proteínas. Si nos atenemos a las reacciones convencionales, la de *Kraus* en este caso, podíamos creer que el grupo de ratones alimentados con triptófano enmascarado, no había recibido este aminoácido esencial. En realidad la prueba demos

tró su perfecta actividad biológica, quizás superior que en su forma “libre”.

#### CONCLUSIONES

Con el estudio practicado sobre las propiedades químicas y biológicas del triptófano, consideramos que hemos podido explicar algunos fenómenos, que pueden ocasionar cierta desorientación en las apreciaciones. No son raros los casos cuando, apoyándose en las pruebas convencionales de la determinación de este aminoácido, se sacan conclusión



nes erróneas en cuanto a la propiedad más importante de un hidrolizado proteico. No es menor tampoco la importancia que refleja el asunto en la práctica, en la economía. Por bajos valores del contenido en triptófano que 110 corresponden a lo declarado, pueden ser reducidas injustamente las fechas de vencimiento de un hidrolizado de proteínas, sin establecerse fuera de ésta, alteraciones de ninguna clase. Pueden ser desechadas cantidades de un producto tan valioso por la misma causa del error metodológico, que dan los métodos convencionales. Claro está por los estudios presentados, que con el tiempo, los valores del triptófano originalmente establecidos, pueden ir bajando. Aparentemente el triptófano disminuye. En el fenómeno interfieren factores como el bisulfito sódico, que con su propiedad reductora influye también en cualquier reacción coloreada. Gran importancia tiene también la composición química "aldehído aminoácido" que se manifiesta entre el triptófano y la glucosa o el acetaldehído contenido en el etanol. Tiene su importancia también, como en todos los fenómenos químico-físicos el factor tiempo. Cuanto más grande es el lapso de tiempo transcurrido entre la elaboración de un hidrolizado de proteínas y la fecha de comprobación de su contenido en triptófano, tanto mayor puede ser el error de evaluación.

En breve, sería oportuno considerar el triptófano de los hidrolizados proteicos presente en dos formas químicamente diferentes: no enmascarado o libre y enmascarado. Es de esperar, que la manera de detectar conjuntamente estas dos formas de la misma sustancia por métodos sencillos se logrará.

Lo importante es, que el triptófano conserva sus propiedades biológicas independientemente de sus combinaciones

químicas. En definitiva el hidrolizado proteico Prothydrol, que es fuente de inspiración y objetivo fundamental de este trabajo está provisto, merced a su técnica de preparación, de suficiente cantidad de triptófano para, que aún enmascarándose, queda libre para su determinación por métodos corrientes, un nivel superior al que se calcula necesario para la utilización de los demás aminoácidos, (30 a 40 mg%).

#### KESUMEN

Con motivo de explicar algunos fenómenos observados en el comportamiento del triptófano en los hidrolizados proteicos, los autores realizan un estudio detallado sobre la naturaleza de este aminoácido.

Determinan (pie en los hidrolizados proteicos el nivel del triptófano, valorado con los métodos clásicos colorimétricos de determinación, baja gradual mente con el tiempo. Con apropiado) ensayos logran demostrar, que en el fenómeno interfieren 3 factores: la acción reductora del bisulfito sódico, la conjugación de cierta parte del triptófano con los grupos aldehídicos, sea del alcohol (por oxidación y formación de acetaldehído) que lleva el Prothydrol, o de la glucosa que llevan otros hidrolizados y el factor tiempo.

De manera que se considera que el triptófano en cualquier hidrolizado o la venta se manifiesta en dos formas distintas: "libre" apreciable por los métodos clásicos colorimétricos y "enmascarado", aparentemente 110 identificado por los mismos métodos.

A continuación siguiendo el camino de la lógica demuestran, en experimento sobre ratones, que el triptófano "enmascarado" es biológicamente tan activo, o tal vez más, que el libre.

Además del aporte teórico en el estudio de la naturaleza del triptófano en los hidrolisados proteicos, los resultados tienen una repercusión importante en la práctica, en la evaluación de las propiedades químicas y biológica de los hidrolisados en general.

NOTA

Agradecemos al Hospital de Becados "Cira García Reyes" su colaboración en este trabajo donde se hicieron las pruebas biológicas en ratones, en particular a su Director Dr. A. Acosta tiorges por su cordial acogida, al Dr. Pando por su ayuda técnica y al técnico de su laboratorio, Sr. Eberto García por su entusiasta colaboración.

#### BIBLIOGRAFIA

1. *Allison, J. B. and Anderson: Nutrition, 29, 413.*
2. —*Block, R. J.: Aminoacids handbook. U.S.A. Illinois, 1956.*
3. — *Bocurestliev, A. R. Tzecova y B. Casurov: Vap. na. hematolog. y cravopr. T-VII, 1960, 43.*
1. —*Kraus, R.: J. Biol. Chem. 1925 63: 157, 18.*
5. —*My and Rose: J. Biol. Chem. 1922. 54, 213*
6. —*Melville, S.: Outline of the amino-ácids and proteins, 1944.*
7. —*Spies Y. R. and D. C. Chambers: Anal Chem., 21, 1949, 1249.*
8. —*Tilintan Alt.: The Index Merck, V edition 1938.*