

95. ESTUDIO DE LA CISTINA Y DE SU ESPECTRO DE ABSORCIÓN, *por D. Barnés.*

SUMMARY.

We have made the spectrographic study of the absorption spectra of cystine and alanine dissolved in hydrochloric acid using a sector-photometer with small quartz spectrograph to analyse the light which has absorbed by the aminoacid in a Baly tube.

The source of light was a discharge through pure hydrogen at a pressure which gives a continuous spectrum.

The results obtained are shown graphically, plotting the molecular absorption coefficient against the wave-length and they agree with Ward's results (within experimental error).

The curves obtained with alanine and cystine are similar and showing no selective absorption. The absorption of alanine begins further in the ultraviolet and its curve incomplete because of the limit of the sensitivity of the instruments used. The intensity of absorption undoubtedly increases with short wave-length.

We conclude that the structure of cystine is aliphatic.

From the determination of wave-length at which the absorption begins we have made the calculation of the energies of dissociation i , e for cystiae

$$hv = 4,9 \times 10^{-12} \text{ erg per molecule}$$

which gives a heat of dissociation

$$H = 70.800 \text{ cal per gram molecule}$$

and from alanine

$$hv = 5,75 \times 10^{-12} \text{ erg per molecule}$$

which gives a heat of dissociation

$$H = 83.000 \text{ cal per gram molecule.}$$

This means that cystine is more easily dissociated than alanine, perhaps because the molecule is broken at the sulfur bend, sulfur being extremely active.

INTRODUCCIÓN

La cistina es un alfa-amino-ácido que constituye, según Fischer, una piedra fundamental de la proteína, que a su vez es la base de la materia viva.

Teniendo en cuenta que hasta 1922, año en que Mueller aisló por primera vez la tioamina, la cistina era el único amino-ácido conocido conteniendo azufre en su molécula, y por esta razón responsable del metabolismo de la proteína, resulta natural el creciente interés mostrado por su estudio.

La bibliografía química sobre la cistina en los últimos treinta años es muy abundante. Los resultados obtenidos muestran todavía muchos puntos dudosos, por ejemplo la separación de sus dos formas cristalinas isómeras, la posición del azufre en la molécula, la extracción de la materia proteica, su metabolismo, la relación entre la alimentación proteica y la presencia del azufre en la orina, etc,

RESEÑA HISTÓRICA

Hacia ya mucho tiempo que el azufre de la molécula de proteína había sido comprobado calentándola con un álcali, en presencia del acetato de plomo, cuando en 1797, Grouard descubrió la producción de SH_2 en la putrefacción de la carne. Este simple hecho, fué el que inició el estudio del S en la proteína, pero hasta 1810 no se hizo en este sentido ningún descubrimiento importante.

Los resultados sucesivos y en parte contradictorios de Wollaston (1), Morner (2), Embden (3), los anteriores de Fleitmann (4) confirmados por Danilewski, los de Kruger (5), los posteriores de Johnson (6) y (7) y de Morner (8), se resumen críticamente en las siguientes palabras de Lewis (9): El azufre de los sulfuros orgánicos ($-\text{C}-\text{S}-\text{C}-$) es oxí-

(1) Wollaston, *Phil. Trans. Roy. Soc.*, 223, 1801.*

(2) Morner, *Z. physiol. Chem.*, 28, 504, 1899.

(3) Embden, *Z. physiol. Chem.*, 22, 94, 1900.

(4) Liebig, *Ann. Chem.*, 65, 121, 1846; and Fleitmann, 65, 380, 1846.

(5) Kruger, *Pflüger's. Archiv.*, 43, 243, 1883.

(6) Johnson, T. B., *J. Biol. Chem.*, 9, 439, 1911.

(7) Johnson, T. B., *J. Biol. Chem.*, 9, 330, 1911.

(8) Morner, *Z. physiol. Chem.*, 18, 585, 1899.

(9) Lewis, *Physiol. Rev.*, 1924.

dado con dificultad. Azufre bivalente, reemplazando oxígeno bivalente, como en la thiourea o la thiopiridina, no es atacado. La oxidación parcial de los ácidos sulfónicos impide mayores oxidaciones en el organismo.

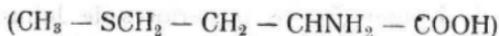
Emden (10) aísla la cisteína, que considera como producto de descomposición de la cistina, a causa de no poder aislarla. Pero luego los trabajos de Kozlowski (11) confirman la presencia de cisteína libre en las cáscaras verdes y en las semillas verdes del guisante (*pisum sativum*).

Okuda (12) opina que cistina y cisteína son productos primarios de la descomposición de la proteína. El no poder obtener cisteína, de la proteína, se debe a que los métodos de preparación nos llevan a su oxidación en cistina.

Drechsel observó la producción de un sulfuro volátil en la hidrólisis de la keratina, por el ácido clorhídrico y pensó que era un sulfuro de etilo, idéntico al que había aislado Abel en la orina. Mueller y Seeman describen un sulfuro que contiene una substancia, todavía no bien conocida, que han separado de la albúmina de huevo.

Morner (13) deduce la existencia de otra clase de azufre en la cistina, por no concordar los valores obtenidos con los teóricos.

Hay un periodo, durante el cual todos los investigadores interesados en el azufre de la proteína aportaron nuevos datos para admitir la existencia de otro compuesto sulfurado, unido a la cistina. Morner y Osborne (14), Dakine (15) y Mueller (16), trabajaron para encontrar este nuevo compuesto de azufre, el cual, finalmente, aisló Mueller por primera vez en la hidrólisis de la caseína, determinando su fórmula empírica. Más tarde, nuevas investigaciones corrigieron esta fórmula y comprobaron la existencia de este compuesto thio-ácido, no solamente en la caseína, sino también en la albúmina de huevo y la lana. Recientemente Odake (17) comprobó la presencia del thio-ácido de Mueller en el alcohol extraído de la levadura, y coincide con él en darle la fórmula empírica $C_5H_{11}SNO_2$. Barger y Coyne (18), han demostrado que el thio-ácido de Mueller tiene la constitución de un ácido alfa-amino-beta-metil-thiol-*n*-butírico



y le han dado el nombre de «methionina».

-
- (10) Emden, *Z. physiol. Chem.*, **32**, 94, 1900
 (11) Zozlowski, *Biochem. J.*, **20**, 1346, 1926.
 (12) Okuda, *Proc. Imp. Japan.*, **11**, 277, 1926.
 (13) Morner, *Z. physiol. Chem.*, **34**, 207, 1902
 (14) Osborne, T. B., *J. Biol. Chem.*, **9**, 333, 1911.
 (15) Dakin, H. D., *J. Biol. Chem.*, **44**, 499, 1920
 (16) Mueller, *J. Biol. Chem.*, **56**, 157, 1923.
 (17) Odake, *Biochem. Z.*, **161**, 1925.
 (18) Barger and Coyne, *J. Biol. Chem.*, **78**, 111, 1928.

Con el descubrimiento de la methionina, el interés por encontrar un nuevo sulfo-amino-ácido en la molécula de proteína ha crecido.

Vigueaud, Jensen y Winterstein (19), trabajando en la cristalización de la insulina, observaron que, hidrolizada con un ácido, obtenían sólo la mitad del valor total de azufre, correspondiente a la cantidad de cistina medida por el método Sullivan, mientras que por el método de Folin-Looney encontraron aproximadamente la cantidad correspondiente al total de azufre.

Es muy importante esta observación, porque según la teoría de Sullivan, su método es específico para el grupo ($-SH-$) de la cistina, mientras que el método de Folin-Looney lo es del grupo ($-S-S-$). Parece ser, por lo tanto, que hay otra ligadura del azufre a la que hasta el presente no se ha prestado atención.

El descubrimiento por Hopkins en 1921 (20) de la glutathiona, puede decirse que es el punto culminante del estudio del azufre de la proteína. En varios trabajos posteriores (21) sobre la constitución y propiedades del glutathiónico, Hopkins afirma que es un dipéptido conteniendo ácido glutámico y cisteína autooxidante que juega un papel muy importante en el metabolismo celular como promotor de las oxidaciones y reducciones; y ha supuesto que esta propiedad es debida al hidrógeno del grupo $-SH$ de la cistina.

Resulta un hecho interesante observar que en 1909 (22), mucho antes del descubrimiento de la glutathiona, Mathews y Walker publicaron un trabajo en el que preveen la importancia biológica de la cistina, en la dinámica química de la célula. Como la cisteína es espontáneamente oxidable y como la auto-oxidación es extremadamente sensible al medio, y a causa de la coincidencia entre el punto óptimo de la oxidación de la cisteína con la acidez del medio protoplásmico, consideran la oxidación de la cisteína como oxidación protoplásmica. Esta es la idea que años después Hopkins y sus colaboradores sostuvieron.

Sin embargo, hay trabajos recientes sobre los complejos de thiol-ácidos con el hierro (23), en los cuales se admite que estos complejos constituyen sistemas reversibles de oxidación-reducción. La importancia de tal hipótesis para la actividad química y biológica de los sistemas $R-SH$ y $R-S-S-R$ es obvia y sugiere la idea de que puede ser la influencia catalítica debida a los indicios de hierro, lo que regula la interesante relación de glutathiona en la respiración de los tejidos. Desde los trabajos publicados por Cannan y Richardson, la cuestión del glutathiónico ha tomado un nuevo incremento, y según las últimas

(19) Vigueaud, Jensen, and Wintersteiner, *J. Pharm. Exp. Ther.*, **23**, 366, 1928.

(20) Hopkins, H. G., *Biochem J.*, **15**, 286, 1921.

(21) Hopkins, H. G., *Biochem J.*, **19**, 787, 1925.

(22) Mathews and Walker, *J. Biol. Chem.*, **6**, 21, 1909.

(23) Canan, R. K., and Richardson, G. M., *Biochem J.*, **23**, 1247, 1929.

investigaciones parece ser que la glutathiona es un tripéptido. Sin embargo, el hecho de la respiración glutathiónica y el papel preponderante que juega el grupo thiol en este fenómeno, es indiscutible.

MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE LA CISTINA

La bibliografía sobre la cistina muestra que los diferentes investigadores la obtuvieron por procedimientos muy variados. En primer lugar se obtuvo de los cálculos urinarios; luego de la fibrina, y más tarde, Emmerling, la aisló por hidrólisis de la caseína.

Se ve, no obstante, que los procedimientos más usados son a partir de la lana y el pelo y los últimos trabajos muestran que aparece en más cantidad en las escleroproteínas de ambos. Ward (24), en sus trabajos sobre el espectro de absorción de varios aminoácidos, dice que la presencia de la cistina en la lana y en el pelo es de importancia fisiológica, por proteger el organismo de los efectos perjudiciales de la acción prolongada de la luz solar.

El hecho es que la gran concentración de la cistina en el pelo y en la lana, hace de estas dos escleroproteínas, las principales fuentes para su obtención.

La obtención cuantitativa de la cistina, aun en las mejores condiciones, presenta muchas dificultades. La separación cualitativa de la cistina se basa siempre en procesos hidrolíticos, en medio alcalino o ácido. En la actualidad, la mayoría de los investigadores emplean la hidrólisis ácida y todos están de acuerdo con el siguiente método, dado por Folin (25):

Se ponen 50 a 500 gr. de pelo o lana (yo he usado pelo) en un frasco de Jena y se añade ácido clorhídrico (200 c. c. por cada 100 gr. de pelo). Para que el ácido llegue bien al fondo, se pone primero una parte de éste, después el pelo y finalmente lo que queda de ácido. Se pone un refrigerante de reflujo y se hierve la mezcla, hasta que la reacción de biuret sea completamente negativa. Esto quiere decir que la molécula de proteína se ha desintegrado completamente en sus elementos constituyentes. El pelo se disuelve

(24) Ward, *r. W.*, *Biochem. J.*, **17**, 898, 1923.

(25) Folin, *J.*, *J. Biol. Chem.*, **9**, 8, 1910.

en pocos momentos, y si se quiere mayor cantidad de cistina, puede añadirse más pelo y más ácido. La duración de la hidrólisis varía según los autores.

Hemos seguido este método observando que con las cantidades antedichas de pelo y de ácido clorhídrico concentrado, ocho horas, son suficientes para obtener el máximo rendimiento.

A la solución caliente del aminoácido así obtenida, se le añade en seguida un exceso de acetato sódico, hasta que la reacción del rojo-Congo para el ácido mineral, sea completamente negativa. El precipitado oscuro voluminoso contiene prácticamente toda la cistina obtenida. Se deja unas horas a la temperatura ambiente y se filtra, lavando con agua fría.

La cistina bruta se disuelve en ácido clorhídrico al 3,5 por 100, se hierva la solución y se decolora con carbón de huesos privado de fosfato cálcico. El filtrado debe ser claro del todo. Esta condición es muy importante, porque yo he observado que las impurezas hacen más difícil la cristalización de la cistina. Si no es perfectamente incoloro, se repite el tratamiento por carbón animal. El último filtrado se calienta a ebullición y la cistina precipita, añadiendo una solución concentrada y caliente de acetato sódico, pero teniendo cuidado de añadir éste poco a poco. Al llegar a este punto, la mayor dificultad es determinar el P_H más favorable para obtener el máximo rendimiento de cistina.

Hemos observado que los mejores resultados se consiguen destilando en el vacío la sustancia hidrolizada, según Gortner y Sinclair (26), con objeto de expulsar en todo lo posible el ácido clorhídrico. El líquido siruposo se diluye, filtra y hierva con suficiente *Norit* para decolorar, se concentra y neutraliza con acetato sódico.

El rendimiento es mayor eliminando el exceso de clorhídrico, porque así se gasta menos cantidad de acetato de sodio y no resulta una concentración tan grande de cloruro sódico, que impediría la cristalización de la cistina.

Otros investigadores usan hidróxido de sodio para la primera parte de la neutralización, pero en este caso hay que tener más

26) Gortner, R. A., Sinclair, W. B., *J. Biol. Chem.*, **88**, 1929.

cuidado al alcalinizar, por la descomposición que puede experimentar la cistina.

La actividad de ésta decrece rápidamente, porque se forma cisteína y ion sulfuro, desprendiéndose amoníaco.

Los valores del P_H dados por diferentes autores varían mucho, siendo muy difícil obtener resultados concordantes. Parece ser que hay muchos factores que influyen en este problema. Uno es el cambio que se produce cuando se hierve mucho tiempo la cistina con 20 por 100 de CIH. Hoffman y Gortner (27) dicen que en estas condiciones ocurre la racemificación de la cistina levogira en una inactiva, que difiere, en ciertas propiedades físicas y químicas de sus soluciones, de la cistina normal. Así, que si variamos su coeficiente de solubilidad, es necesario cambiar las condiciones para la cristalización. Si queremos obtener solamente cistina en bruto, podemos aceptar el valor dado por Merrill (28).

Así se tiene cistina en bruto. Para obtenerla pura y cristalina, el problema es más complicado.

El producto primitivo hidrolizado por mí contenía 15-16 por 100 de cistina; después de tratada con *Norit* la cistina en bruto, precipita en una proporción de un 13 por 100 y la pura y cristalizada llega solamente a un 10 por 100. Estos resultados están de acuerdo con Remington (29), quien encontró que solamente dos tercios de la cistina de los tejidos, comprobada colorimétricamente, puede aislarse en forma pura.

Disolvimos la cistina en bruto en la menor cantidad de ácido clorhídrico de 3 por 100, decolorándola luego sin añadir solución alcalina. He obtenido cristales exagonales bien formados, que al microscopio presentan el aspecto siguiente (fig. 1):

Las aguas madres dan todavía reacción positiva de azufre, pero solamente una pequeña parte del remanente de cistina puede cristalizar en una concentración de hidrogeniones $P_H = 4$, en forma de «agujas» (fig. 2).

Otra vez al tratar de cristalizar cistina bruta, hirviéndola con CIH y justamente con $P_H = 4$ o 5, obtuve abundantes cristales

(27) Hoffman and Gortner, R. A., *J. Biol. Chem.*, **83**, 631, 1929.

(28) Thompson, Merrill, A. R., *J. Am. Chem. Soc.*, **43**, 2693, 1921.

(29) Frank-Campbell, S., *Biochem J.*, **22**, 1499, 1928.

que al principio tienen aspecto de esferas sólidas, semejantes a las *bolas de cristal* de la tiroxina. Observadas con una lente de gran aumento, se comprobaba que eran prismas muy finos, de base



Fig. 1.



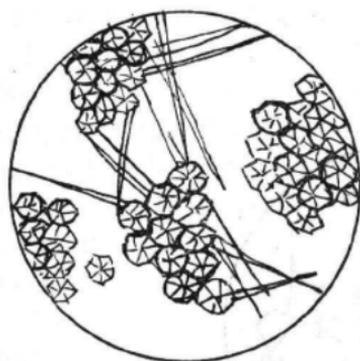
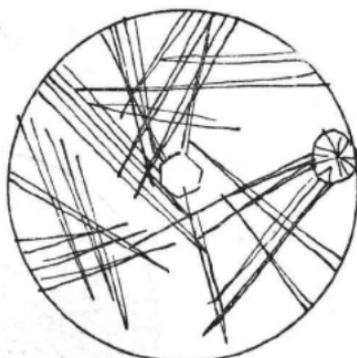
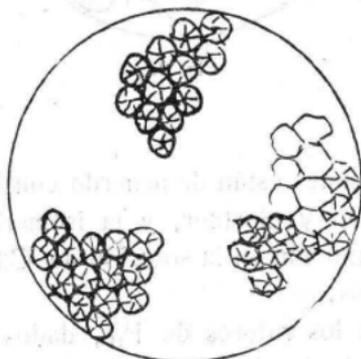
Fig. 2.

exagonal. Estos cristales están de acuerdo con la cistina isomérica descrita por Hoffman y Gortner, y la isomerización debe tener lugar durante la ebullición en la solución de ClH , de acuerdo con sus primeros trabajos.

La variedad de los valores de P_H , dados por los diferentes investigadores y el hecho de que haya yo obtenido cistina en una

disolución concentrada de ácido, me sugirió la idea de que es posible obtener la cistina entre límites muy amplios. Para comprobarlo he disuelto cistina en la menor cantidad de ácido de 3 por 100 y he dividido la solución en tres porciones, ajustando la concentración de los iones de cada una a un valor del P_H completamente diferente. La primera, con una reacción ácida muy fuerte; la segunda, con un $P_H = 3$ (con bromo-fenol, azul), y la tercera, con un $P_H = 5$ (bromo-fenol).

En el primer caso, después de mucho tiempo (algunas horas), aparecen algunos cristales que presentan el aspecto de la figura 3, *a*; en el segundo caso, cristaliza un poco antes que en el primero y los cristales son mayores (fig. 3, *b*); en el tercero, precipita inmediatamente un polvo blanco cristalino (fig. 3, *c*).

Fig. 3, *a*.Fig. 3, *b*.Fig. 3, *c*.

He disuelto los cristales obtenidos en el primer caso en una cantidad muy pequeña de ácido de 3 por 100 para obtener una solución de cistina muy concentrada, y después de muchas horas de reposo, he obtenido la forma cristalina siguiente (fig. 4):

He observado que, en general, se obtienen cristales mejores cuando haya una macrocristalización y, en cambio, el aspecto es pulverulento cuando se hacía la precipitación con un valor del P_H de 5 a 6. Sin embargo, este polvo blanco estaba formado por agujas muy pequeñas. Recordando que las condiciones necesarias

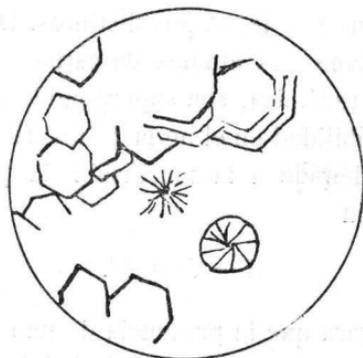


Fig 4.

para una buena cristalización son espacio, reposo y tiempo, no es extraño que se obtengan cristales mejores cuanto menor sea el número de iones en la solución, y por tanto haya mayor espacio.

La experiencia me ha mostrado además que debe de haber alguna relación entre el valor del P_H necesario para la cristalización y la concentración de la cistina en la solución. Para comprobar esto, hice un experimento contrario al que he descrito. Disolví cantidades diferentes de cistina en la misma cantidad de ácido al 3 por 100; 0,1 gr., 0,2 gr., 0,3 gr. y 0,4 gr., cada vez en 20 c. c. de ácido, y he tratado de precipitarlos añadiendo 0,5 c. c. de una solución concentrada de acetato sódico. Por adición de 5 c. c. de acetato sódico, precipita sólo la solución más concentrada. Era necesario añadir otros 5 c. c. para precipitar las otras.

Finalmente, he obtenido los siguientes resultados, que demuestran la gran relación entre el valor del P_H y la concentración de cistina:

Ejemplo.	Gramos de cistina.	Conc. de HCl.	P_H
I	0,4	3 %	ácido fuerte
II	0,3	»	4
III	0,2	»	5,2
IV	0,1	»	6,5

Los diferentes estudios sobre las formas cristalinas de la cistina, nos enseñan que hay tres tipos distintos. Debía haber cuatro, porque la cistina tiene dos átomos de carbono asimétricos; pero las formas meso y racémica, son superponibles. J. Andrews (30) ha estudiado la solubilidad en el agua de las tres formas isoméricas de la cistina y ha llegado a la conclusión de que las tres corresponden a la ecuación

$$d - l = dl.$$

Este autor asegura que la presencia de uno influye en la solubilidad de los otros. La curva de solubilidad ha sido calculada en cada fase y los resultados nos indican que la forma dextró puede ser cuatro veces aproximadamente más soluble que la forma levo, siendo posible que ésta pierda una gran cantidad de cistina cuando la lavamos estando sin purificar. Es muy importante acordarse de esto, porque la hipótesis hecha sobre la existencia de más compuestos de azufre en la molécula de proteína, está basada en la diferencia entre la cantidad de azufre en dicha proteína y la que se encuentra en la cistina. Remington (31), después de estudiar la relación entre la cantidad de cistina y el azufre total que se encuentra en la lana, llega a la conclusión de que todo se separa bajo la forma de cistina, cuando se hidroliza la proteína por un ácido y no hay pruebas de ningún otro compuesto de azufre que intervenga en su composición.

(30) Andrews, J. G., *J. Phys. Chem.*, **32**, 1031, 1921.

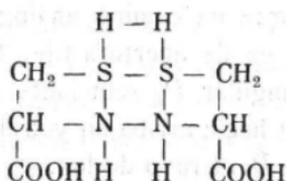
(31) Remington, C., *Biochem J.*, **23**, 31, 1929.

Yo he analizado el producto obtenido antes de hacer su estudio espectroscópico. He usado los métodos de Kjeldahl y van Slyke y el de Parr, de la bomba, para determinar el azufre. Los resultados obtenidos, comparados con los valores teóricos, vienen en el siguiente cuadro:

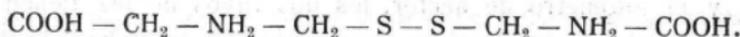
	N total.		N amínico.		Azufre.	
	Teórico.	Hallado	Teórico.	Hallado.	Teórico.	Hallado.
Cistina en bruto.	11,67 %	9,24 % 9,10 %	11,67 %	10,02 % 10,81 %	20,32 %	
Cistina exagonal en placas.	11,67 %	10,86 % 11,20 % 10,92 %	11,67 %	11,87 % 11,56 % 11,93 %	20,32 %	18,62 % 18,63 %
	media..	10,99 %	media..	11,75 %	media..	18,65 %

ESTUDIO ESPECTROSCÓPICO DE LA CISTINA

Después de recurrir al estudio de la cistina, por el método espectrográfico Ward (loc. cit.), dijo que los hechos se podrían explicar mejor admitiendo que la cistina posee una estructura ciclíca en vez de alifática, siendo su fórmula la siguiente:



en vez de



Nosotros hemos hecho el estudio del espectro de absorción de la cistina y alanina, disuelta en ácido clorhídrico, con el propósito

de confirmar las conclusiones de Ward y también de la forma de la cistina en agujas, disuelta en agua.

Los argumentos de Ward están basados solamente en la intensidad relativa del espectro de absorción de la cistina y del otro amino-ácido en la región de 300-200 μ . μ .

BREVE DESCRIPCIÓN EXPERIMENTAL

Hemos usado un espectrofotómetro, del tipo Hilger, con pequeño espectrógrafo de cuarzo, ambos construídos por «Gaertner Scientific Comporation», para analizar la luz que ha sido absorbida por el amino-ácido en un tubo Baly.

La iluminación usada en nuestras experiencias fué la descarga a través de hidrógeno puro, que a presión determinada da un espectro continuo (32). Consideramos este manantial de luz como el mejor, porque su homogeneidad y propiedades hacen la observación del espectro de absorción más fácil que en el caso del espectro de muchas líneas producido por la chispa debajo del agua, comúnmente usada.

El diagrama muestra el camino seguido por la luz hasta llegar a la rendija del espectrógrafo, pudiendo venir por dos caminos distintos. Un rayo de luz pasa a través del sector de rotación S , cuya abertura puede variarse. El rayo de luz pasa a través del prisma triangular P y siguiendo un biprisma B colocado en frente de la abertura del espectrógrafo, es desviado por la parte inferior del prisma para pasar a lo largo del colimador.

El segundo haz sigue un camino análogo, pero el sector de rotación es más bajo, es de abertura fija. El haz de luz pasa a través del prisma triangular P_1 semejante a P , pero de tal manera, que desvía la luz hacia arriba en vez de hacerlo hacia abajo. Siguiendo el biprisma B el rayo de luz, es desviado por la parte superior y pasa tangencialmente a lo largo del colimador del espectrógrafo, como la primera vez. Entre el sistema de iluminación y el fotómetro de sector, los dos rayos de luz tienen que pasar a través de los líquidos absorbentes en los tubos de Baly.

(32) Hulbert. *Phys. Rev.*, **28**, 926, 1926.

El tubo bajo contiene la solución de la sustancia problema y el alto, el líquido disolvente. Tenemos dos razones fundamentales

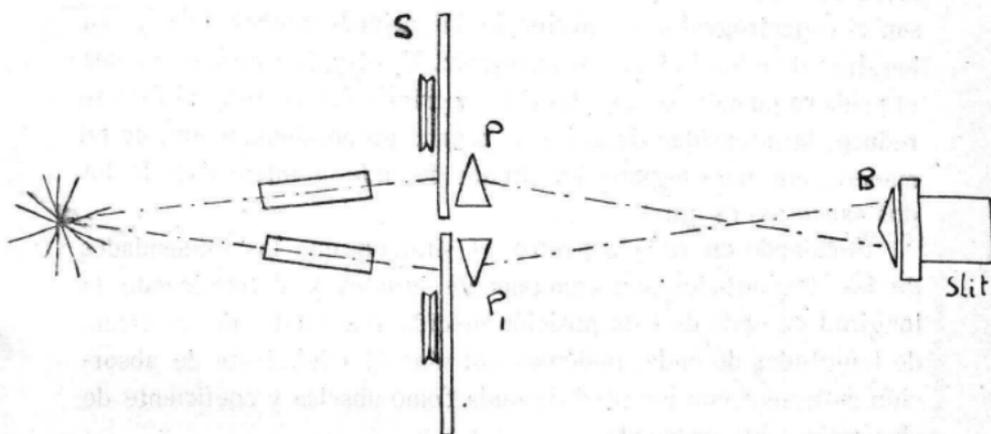


Fig. 5.

para estudiar el líquido disolvente: una, eliminar el efecto de éste, y la otra, para producir caminos ópticamente equivalentes. Los tubos de Baly tienen ventanas de cuarzo y una longitud conocida de disolución, compensada en el camino alto, por un tubo similar, que contenga la misma longitud de disolvente, de tal manera, que produzca igual retardo en los dos rayos de luz y los reuna en un foco situado en el plano de la abertura. Los dos tubos han de ser de idéntico diámetro para que las imágenes sean de la misma intensidad.

De este modo, el espectrógrafo es atravesado por dos rayos: uno, capaz de variar en intensidad cambiando la abertura del sector de rotación; el otro, sujeto a la absorción de una capa de líquido equivalente al que estamos observando. El sector de abertura variable está graduado para que tengamos $\log \frac{I_0}{I}$ del coeficiente de extinción, en el cual I_0 e I son las intensidades de la luz, que llegan al espectrógrafo por la parte alta y baja de los haces respectivos.

El ajustado del espectrógrafo es muy difícil. El manantial de luz se ha de colocar de tal manera, que coincida en línea recta con

el eje del colimador y forme ángulo recto con el eje largo de la base del fotómetro de sector.

Si observamos las fotografías, vemos que hay dos espectros fotografiados, correspondientes a los dos haces de luz que atraviesan el espectrógrafo, el inferior de intensidad menor en toda su longitud debido al efecto de absorción. El otro es más intenso que el primero cuando se usa toda la abertura del sector. Si ésta se reduce, la intensidad de la luz se reduce proporcionalmente, de tal manera, que para algunas longitudes de onda la intensidad de los dos espectros es igual.

Señalando en cada espectro el sitio en que las intensidades de las dos mitades son exactamente iguales y determinando la longitud de onda de esta posición medida por medio de la escala de longitudes de onda, podemos calcular el coeficiente de absorción molecular con longitud de onda como abscisa y coeficiente de absorción como ordenada.

El coeficiente de absorción K viene dado por la ecuación

$$K = \frac{\alpha \cdot c}{d}$$

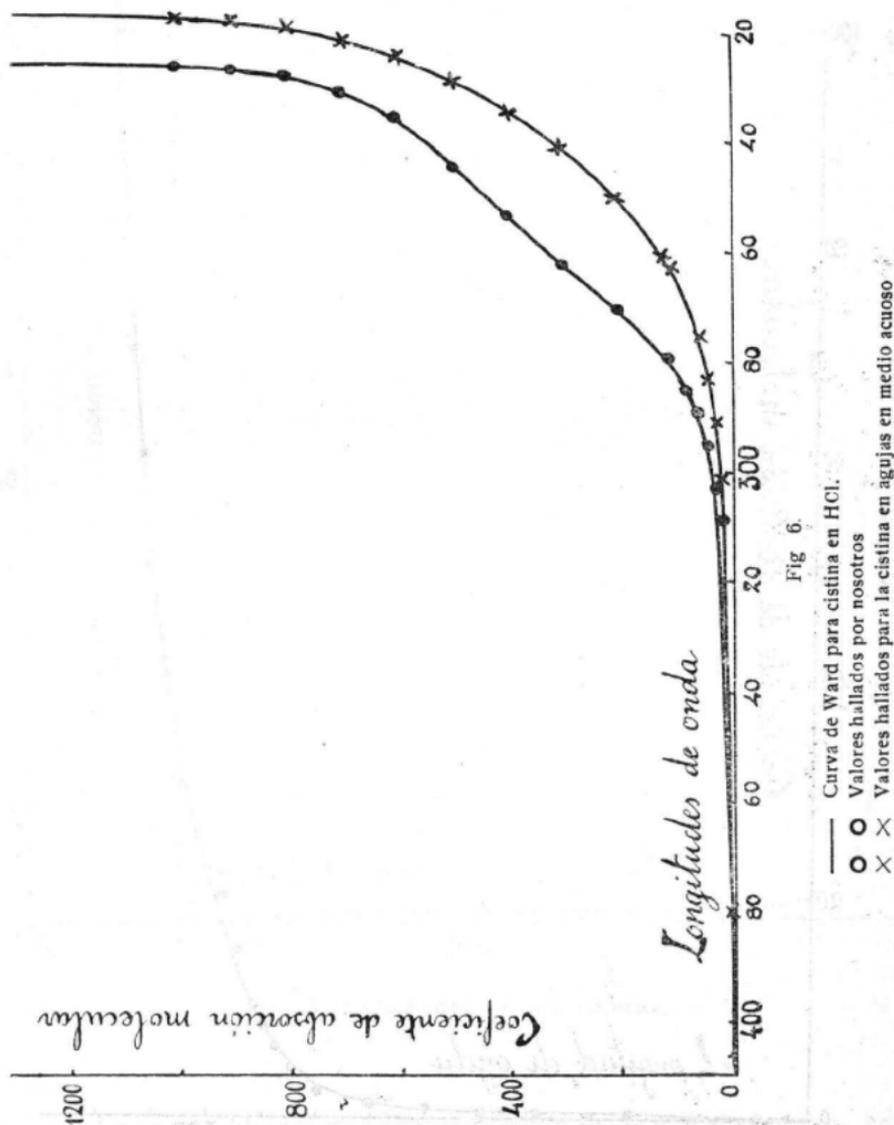
siendo α el llamado coeficiente de extinción, cuyo valor leemos directamente en el fotómetro de sector; c es la concentración molecular de la solución, y d la longitud de la solución en centímetros (longitud de camino), dada directamente en la escala de los tubos de Baly.

Usamos concentraciones diferentes de cistina para obtener diferentes valores en el coeficiente de absorción molecular K , teniendo el producto de la concentración molecular de cistina y el porcentaje de ácido clorhídrico de valor constante 370. Se observa, al preparar las soluciones, que la cistina es insoluble en ácido concentrado y también en soluciones de ácidos débiles. Vemos, también, que la cistina en agujas es muy soluble en agua (0,432 gramos por 1000 c. c. de agua); la de laminillas lo es muy poco.

Se repite el experimento con objeto de observar si el ácido origina algún cambio isomérico en la constitución molecular de la cistina. Hemos visto (33), que el espectro de absorción de la

(33) Ke'ecinski, I., and Marchlewski, L., *Acad. Pol. Sct. d. Lettres*, 7 A, 317, 1929.

maltosa, después de añadir ácido clorhídrico, muestra un cambio



inesperado en la absorción, y con objeto de observar este efecto en la solución de cistina, repetimos la experiencia con ésta.

Los resultados obtenidos podemos trazarlos gráficamente to-

mando como coordenadas el coeficiente de absorción molecular y

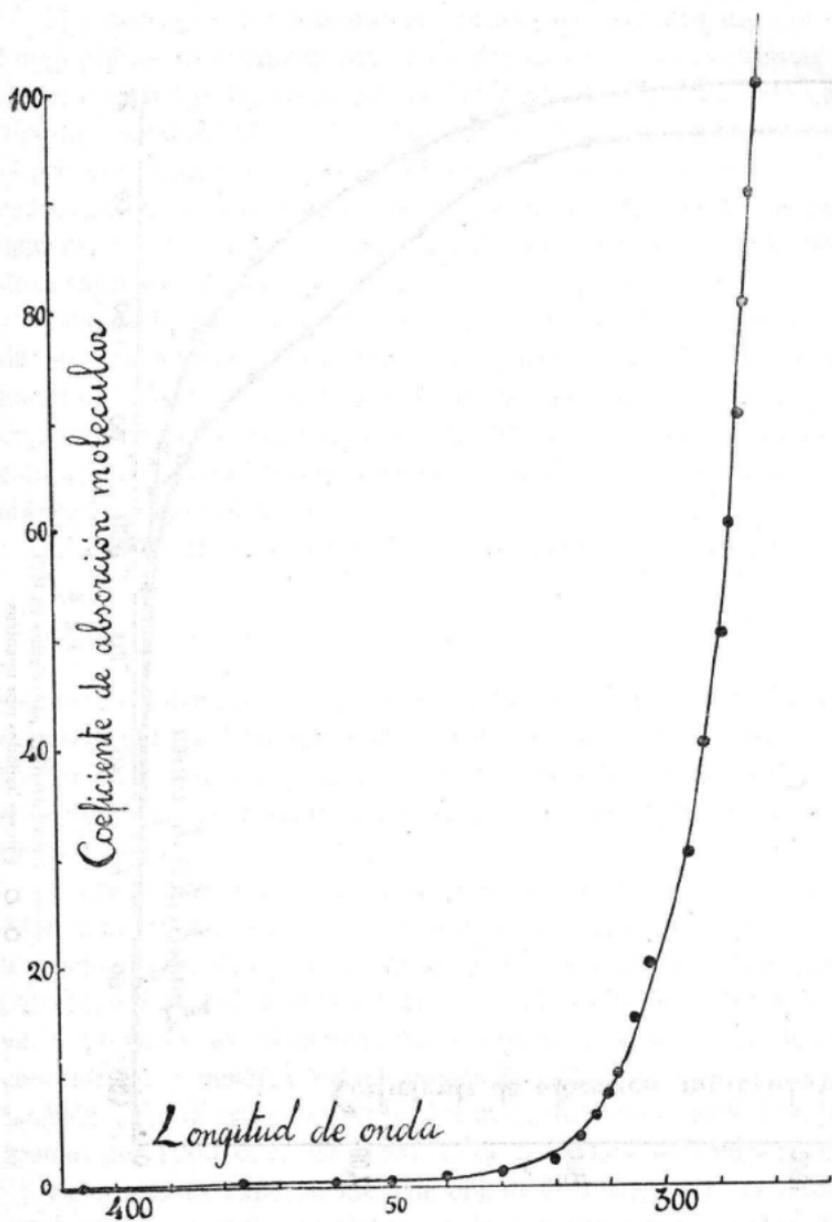


Fig. 7.—Curva de absorción para la cistina.

la longitud de onda; los resultados concuerdan con los de Ward dentro del error experimental, según muestra la figura 6.

La figura 7 reproduce la parte baja de la curva de la cistina en ácido clorhídrico con más detalle. En la figura 8 vemos la curva obtenida con alanina en ácido clorhídrico.

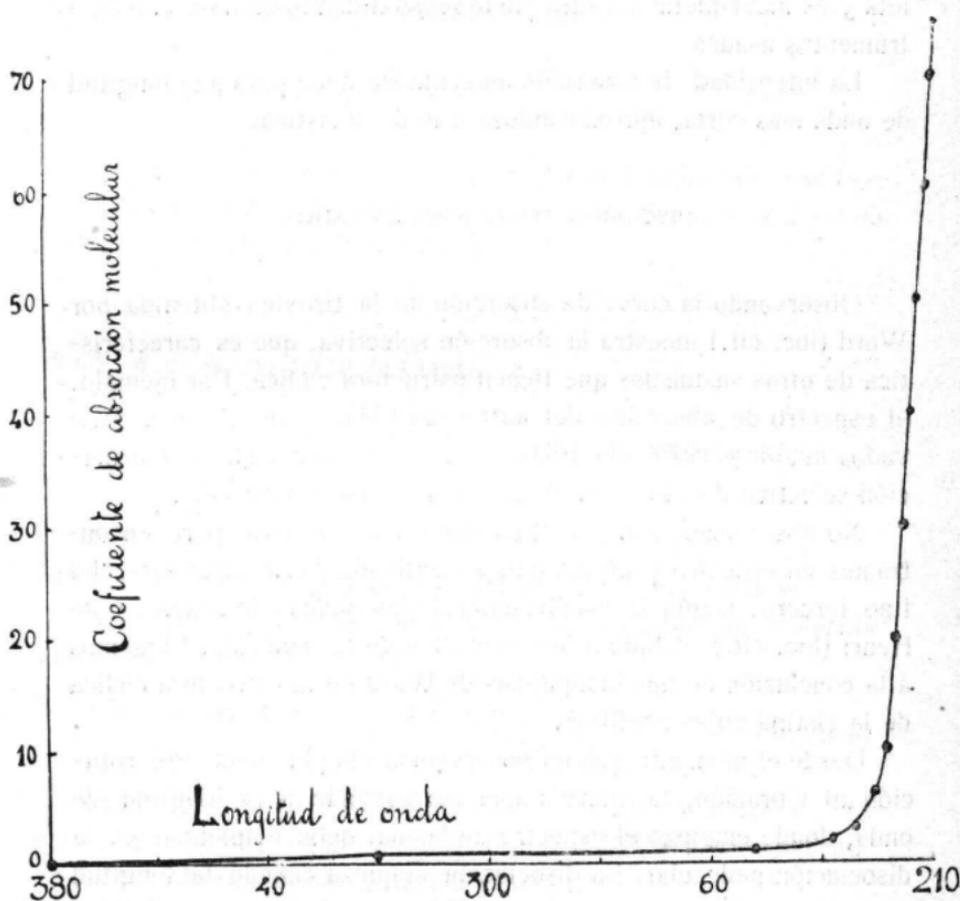


Fig. 8.—Curva de absorción para la alanina.

La curva obtenida con cistina disuelta en ácido clorhídrico, es del mismo tipo que la de la cistina disuelta en agua, estando esta última más allá del ultravioleta. Repetimos el experimento con un valor diferente para el producto de la concentración molecular de la cistina y el porcentaje de ácido, pero los resultados obtenidos

están de acuerdo, dentro del error experimental, con los previstos para el ácido.

Las curvas obtenidas con alanina y cistina, son similares, no mostrando absorción selectiva.

La curva de alanina (fig. 8), empieza más lejos del ultravioleta y es incompleta a causa de la sensibilidad limitada de los instrumentos usados.

La intensidad de absorción aumenta sin duda para una longitud de onda más corta, aproximándose a la de la cistina.

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Observando la curva de absorción de la tiroxina obtenida por Ward (loc. cit.) muestra la absorción selectiva, que es característica de otras sustancias que tienen estructura cíclica. Por ejemplo, el espectro de absorción del antraceno (34), el de algunos derivados indólicos del ácido úrico, etc., todos nos muestran la absorción selectiva debida a los efectos de rotación y vibración.

No observamos con la cistina absorción selectiva, pero encontramos un espectro continuo que se extiende hacia el violeta, del tipo tercero, según la clasificación de las bandas de absorción de Henri (loc. cit.), debido a la disociación de la molécula. Llegamos a la conclusión de que la hipótesis de Ward de la estructura cíclica de la cistina no se confirma.

Desde el momento que no observamos ningún efecto de rotación ni vibración, la energía que corresponde a la longitud de onda, donde empieza el espectro de banda, debe emplearse en la disociación molecular. La disociación empieza cuando la longitud de onda absorbida es alrededor de 400, y por esto la probabilidad de disociación es pequeña, debida al hecho de que el ángulo de colisión entre el cuanto de energía y el eje de la molécula tiene todos los valores posibles y, en general, el componente del momento del cuanto en la dirección necesaria para producir disociación, es insuficiente. Sin embargo, como la energía del cuanto aumenta con la disminución de la longitud de onda, es probable

(34) Henri and Laszlo, *Proc. Roy. Soc.*, **105**, 662, 1924

que este componente del momento fuera suficiente para producir un incremento en la disociación, resultando esta máxima a la longitud de onda correspondiente a 226 μ .

Para la cistina disuelta en agua, la disociación empieza aproximadamente con la longitud de onda 340 μ y es completa a 215 μ .

Según esto, tenemos la siguiente ecuación:

$$V = \frac{c}{l}$$

en la cual c es la velocidad de la luz y l la longitud de onda de la radiación absorbida; podemos calcular la frecuencia de esta radiación y la energía de disociación

$$\Sigma = h \cdot v$$

donde h es la constante de Planck,

$$V = \frac{3 \times 10^{10}}{4 \times 10^{-3}} = 0,75 \times 10^{15} = 7,5 \times 10^{14} \text{ amper sec.}$$

$$\Sigma = 6,5 \times 10^{-27} \times 7,5 \times 10^{14} = 4,9 \times 10^{-12} \text{ erg.}$$

que corresponde a un potencial de ionización de 3,1 voltios.

Expresado en calorías, el calor de disociación por molécula gramo, es:

$$\frac{\Sigma \times \text{núm. de mol/gr. mol.}}{J} = \frac{4,92 \times 10^{-12} \times 6,06 \times 10^{23}}{4,19 \times 10^7} = 71.000 \text{ cal.}$$

La energía que produce la disociación completa a 226 μ es poco más o menos, según los cálculos, $8,7 \times 10^{12}$ erg por molécula gramo o 124.000 cal por molécula gramo.

Es necesaria una mayor energía para producir la disociación de la alanina que la de la cistina, extendiéndose su curva de absorción más allá del ultravioleta. Esto es, seguramente, debido al hecho de que es menos difícil disociar cistina, ya que rota la unión molecular entre los átomos de azufre éstos presentan gran actividad.

En resumen podemos decir:

1. El estudio histórico del metabolismo del azufre queda virtualmente reducido al del metabolismo de la cistina. Este descubrimiento hecho por Hopkins y el papel importantísimo desempeña-

do por el grupo tiol en la respiración de la célula, como promotor de las oxidaciones y reducciones, da una gran importancia al estudio de la cistina.

2. Hemos demostrado que el rendimiento obtenido para la forma cristalina de la cistina, depende p_H del líquido.

3. Hemos demostrado asimismo, que el valor de p_H varía con la concentración en cistina.

4. No hemos podido comprobar la absorción selectiva para la cistina. La hipótesis de Ward, atribuyendo a aquélla una estructura cíclica, no se confirma. Nuestros resultados coinciden de tal modo con los Ward, gráficamente, que no es posible admitir absorción selectiva debida a efecto vibratorio ni al rotatorio. Por tanto, la estructura de la cistina es alifática.

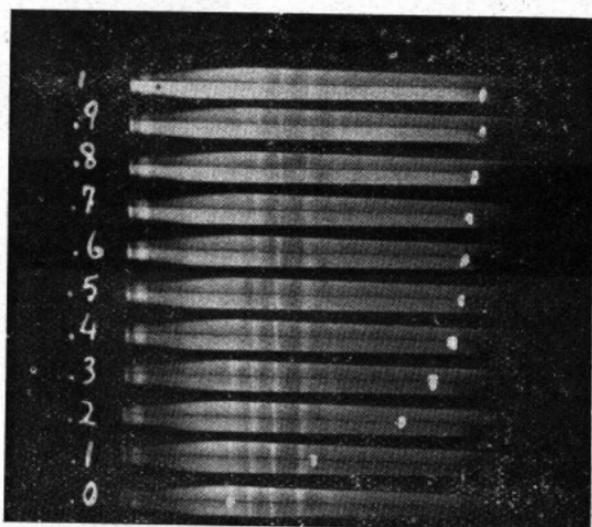
5. Hemos calculado el calor de disociación a partir de la longitud de onda en que empieza la absorción. Como el calor de disociación de la cistina es menor que el de la alanina, se deduce de ello que, la molécula de cistina puede romperse en $-S-S-$, puesto que el azufre es extremadamente activo.

*
**

Me es grato expresar aquí mi agradecimiento a la Prof. Mary L. Foster y a la Prof. auxiliar Gladys A. Anslow por sus consejos y constante ayuda.

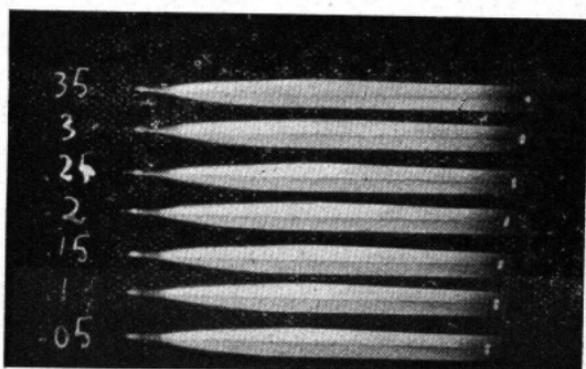
Smith College, 1930.—Northampton, Mass.

LÁMINA I



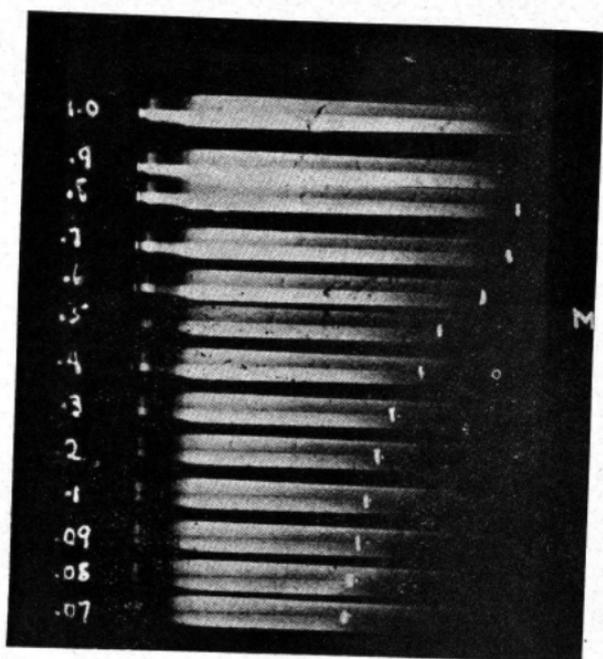
I.—Alamina. Concentración molecular: $M/20$.
Longitud de trayectoria: 5 cm.
 $K = 4 \alpha$

Los puntos blancos indican, en éste y en los restantes espectrogramas, la posición correspondiente a una misma intensidad.

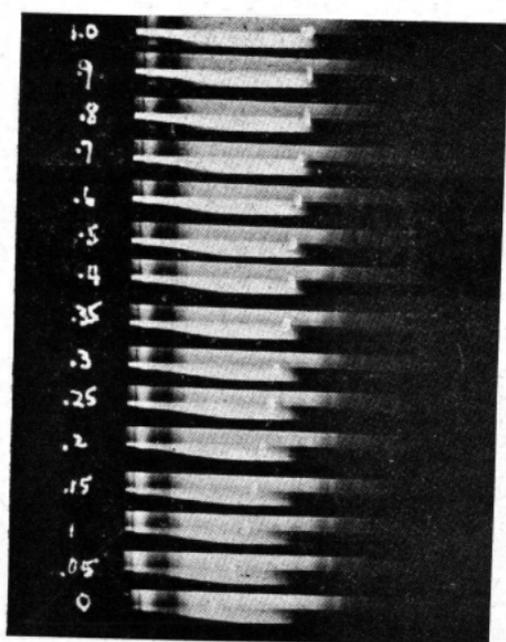


II.—Alamina. Concentración molecular: $M/100$.
Longitud de trayectoria: 5 mm.
 $K = 2.0 \alpha$

LÁMINA II



I.—Cistina. Concentración molecular: M/1000. 8 H Cl.
Longitud de trayectoria: 1 cm.



II. - Cistina. Concentración molecular: M/20. 18 H Cl.
Longitud de trayectoria: 5 cm.