

## Tesis de Posgrado

# Fraccionamiento de aminoácidos en proteínas vegetales y valoración cromatográfica de alanina y prolina

Algranati, Israel David

1957

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Algranati, Israel David. (1957). Fraccionamiento de aminoácidos en proteínas vegetales y valoración cromatográfica de alanina y prolina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_0939\\_Algranati.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0939_Algranati.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Algranati, Israel David. "Fraccionamiento de aminoácidos en proteínas vegetales y valoración cromatográfica de alanina y prolina". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1957.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_0939\\_Algranati.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0939_Algranati.pdf)

FCEN-BA.

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

--o--

FRACCIONAMIENTO DE AMINOACIDOS EN PROTEINAS VEGETALES Y  
VALORACION CROMATOGRAFICA DE ALANINA Y PROLINA

por

ISRAEL DAVID ALGRANATI

T E S I S

para optar al título de

DOCTOR EN QUIMICA

TESIS: 900

1 9 5 7

939

FRACCIONAMIENTO DE AMINOACIDOS EN PROTEINAS VEGETALES Y VALORACION  
CROMATOGRAFIA DE ALANINA Y PROLINA

por

Israel David Algranati

--o--

RESUMEN de la Tesis presentada para optar al título de DOCTOR EN QUIMICA

Se preparó zeína a partir de gluten de maíz por el método de Nolam y Vickery modificado por Larco.-

La zeína obtenida y la "alfa proteína" de soja preparada por Glidden Co. fueron hidrolizadas por ebullición a reflujo con ClH 6N.-

Se realizó el análisis cualitativo de los hidrolizados proteicos por cromatografía circular y bidimensional sobre papel.-

Se ensayaron los siguientes métodos de cromatografía cuantitativa sobre papel: 1) determinación del area de las manchas; 2) método de elución; 3) medida de la densidad total de color; 4) determinación de la densidad máxima de color de cada mancha. Este último método, que es el más exacto, fue utilizado para valorar alanina y prolina en los hidrolizados de zeína y de "alfa proteína" de soja.-

Para separar los aminoácidos que aparecían juntos después de un desarrollo de 16 horas se empleó cromatografías con desarrollo de 80 horas.

Se describió una técnica de desarrollo múltiple en pequeñas cajas de Petri.-

El envejecimiento del solvente butanol-ácido acético-agua (4:1:5 v/v) produjo la disminución de los valores R<sub>f</sub>. Realizando cromatografías con mezclas de butanol-ácido acético-agua-acetato de butilo en varias proporciones se demostró que la disminución de los R<sub>f</sub> se debía a la esterificación parcial del solvente.-

Se estableció la siguiente relación entre los valores R<sub>f</sub> obtenidos por cromatografías circular y monodimensional ascendente:

$$R_{f(circular)}^2 = R_{f(ascendente)}$$

Se estudiaron varios métodos de fraccionamiento de mezclas de aminoácidos. Para realizar el procedimiento de extracción continua de Dakin se usó el aparato propuesto por Woolley con algunas modificaciones; este método no produjo separaciones cuantitativas.-

La electrodiálisis realizada una sola vez en una cámara de madera de tres compartimentos con electrodos de grafito resultó insuficiente para separar cuantitativamente los grupos de aminoácidos neutros, básicos y dicarboxílicos.-

-Res de Tesis: 933 *Algranati*  
R939

A MIS PADRES

PADRINO DE TESIS

Dr. Ventura Morera

# POENA

Deseo expresar mi agradecimiento al Dr. Ventura Morera por su constante preocupación y valiosos consejos;

al Dr. José María Quevedo (h) y personal técnico del Instituto de Biología Animal del Ministerio de Agricultura y Ganadería de la Nación, que hicieron posible este trabajo poniendo a mi disposición los laboratorios de dicho Instituto;

a los Laboratorios Brandt que me facilitaron la muestra de "alfa proteína" de soja;

y a los Sres. Orsi, Moneo y Beovide que realizaron las fotografías.-

## I N T R O D U C C I O N

Innumerables trabajos realizados desde mediados del siglo pasado hasta la actualidad, han demostrado que las proteínas cumplen funciones diversas de extraordinaria importancia en los organismos vivientes.-

Ya en 1851 Boussingault señaló el valor de las proteínas en la nutrición. Dicho valor varía con el origen de las proteínas, como lo demostró Rubner en 1897.-

Desde los trabajos de Henderson y Dean (1), Willcock y Hopkins (2), y Osborne (3), se llegó a la conclusión de que el valor nutritivo de una proteína depende de su composición en aminoácidos.-

Osborne y Mendel (4), y más tarde Rose (5), clasificaron los aminoácidos en "esenciales" y "no esenciales"; esto explica porqué, durante muchos años, sólo se dosaron los aminoácidos considerados "esenciales" para comparar el valor nutritivo de los distintos alimentos.-

El conocimiento de que muchas enzimas y hormonas son de naturaleza proteica, impulsó a los investigadores, en los últimos quince años, a perfeccionar los métodos de análisis de aminoácidos. Estos esfuerzos dieron por resultado notables trabajos en los que se realizaron análisis completos de proteínas, determinaciones de secuencia de aminoácidos y estudios detallados sobre la estructura espacial de la cadena proteica.-

-----0-----

### LAS PROTEINAS VEGETALES .-(6)

Kessel-Meyer en 1759 y más tarde Rouelle, aislaron del trigo y otros vegetales sustancias similares a las obtenidas a partir de organismos animales. En 1809 Gren estableció que dichas sustancias vegetales contenían hidrógeno, nitrógeno, carbono, oxígeno y azufre.-

Ritthausen realizó los primeros estudios serios sobre las proteínas vegetales, aislando muchas de ellas y determinando aproximadamente sus composiciones.-

Las proteínas de las plantas se encuentran disueltas en los fluidos circulantes, semi-disueltas en el protoplasma de las células, y

en estado sólido como material de reserva, en las semillas, bulbos y raíces.-

En los organismos vegetales escasean las albúminas y abundan, en cambio, las globulinas. Estas cristalizan con relativa facilidad, y son más difíciles de precipitar por sales y de coagular por calor que las globulinas animales.-

Las proleminas y glutelinas son dos tipos de proteínas de exclusivo origen vegetal. Las primeras se caracterizan por su solubilidad en alcohol de 70 a 90 % de concentración. No coagulan por el calor, son muy poco solubles en agua neutra, y se disuelven fácilmente en soluciones ácidas o alcalinas. Osborne (7) las llamó prolaminas porque entre sus productos de hidrólisis abundan la prolina y el amoníaco. Además producen mucho ácido glutámico y muy pequeñas cantidades de arginina, histidina y lisina. Las más conocidas son la gliadina, aislada del trigo por Taddei en 1819, y la zeína, aislada del maíz por Gerham en 1821.-

Las glutelinas son insolubles en agua neutra, soluciones salinas o alcohol. Se disuelven en álcalis y ácidos diluidos, y coagulan por el calor. Las únicas bien conocidas son la glutenina del trigo y la orizeína de la cebada, aunque se cree que existen otras en las demás semillas, que no se han podido estudiar por la dificultad de los métodos de extracción.-

-----o-----

#### HIDROLISIS DE PROTEINAS.-

Existen muy pocos métodos que permiten el dosaje de aminoácidos en proteínas enteras. Entre ellos mencionaré el de Holiday (8) para determinar tirosina y triptofano, el de Mirsky y Anson (9) para la cistina y cisteína, y el de Horowitz (10), que usó una mutante de la "neurospora crassa" para dosar leucina en caseína sin hidrolizar.-

Para realizar un análisis completo de una proteína es necesario hidrolizarla previamente.-

La hidrólisis tiene por objeto romper las uniones peptídicas de la cadena, dejando libres los aminoácidos.-

a) Hidrólisis con ácidos.- Los más usados son el  $\text{SO}_4\text{H}_2$  8N, ClH 6N y IH al 57 %. Algunos autores han empleado mezclas de ClH y ácido fórmico, o ClH y  $\text{Cl}_3\text{Ti}$ ; y notaron que se reduce el tiempo de hidrólisis

y la cantidad de humina.-

También se usaron con cierto éxito algunos ácidos orgánicos como el trifluoracético, cetilsulfónico, dodecilsulfónico y dodecilsulfúrico.-

Se han investigado otros ácidos como el fosfórico, acético, láctico, glucónico, etc, y se vió que todos ellos no son apropiados para hidrolizar proteínas.-

Generalmente la hidrólisis ácida se realiza hirviendo a reflujo durante 20 a 24 horas. Este período se puede reducir trabajando a presión en un autoclave.-

Si se emplea ácido sulfúrico como agente de hidrólisis, su exceso se elimina agregando sales de calcio o bario. El precipitado que se forma presenta el inconveniente de adsorber cierta cantidad de aminoácidos. Cuando se usa ácido clorhídrico, se puede eliminar su exceso evaporando al vacío, o haciendo pasar la solución a través de una resina intercambiadora de aniones (11).-

La hidrólisis ácida destruye todo el triptofano y produce la dismutación de algunas cantidades de cistina, serina, treonina y ácidos aspártico y glutámico (12). Además forma huminas, que son productos insolubles originados por condensación de triptofano con restos de aldehídos o carbohidratos. (Según algunos autores la tirosina en presencia de trazas de metales como el hierro también forma huminas).

b) Hidrólisis alcalina.-Generalmente se usan NaOH 5N o Ba(OH)<sub>2</sub> al 14%; éstos no forman huminas ni destruyen el triptofano, pero producen la racemización completa de los aminoácidos y la destrucción parcial de la arginina, cistina, treonina, lisina y otros.-

c) Hidrólisis enzimática.- Sólo requiere condiciones suaves de pH y de temperatura, evitando así la destrucción y racemización de los aminoácidos. Sin embargo tiene varias desventajas: es lenta, casi nunca es completa, y además, como las enzimas son proteínas, parte de los aminoácidos provienen de su autólisis.-

Como se ve todos los procedimientos de hidrólisis tienen sus inconvenientes; unos son incompletos y otros destruyen algunos aminoácidos.-

El mejor método para seguir la hidrólisis, consiste en determinar el nitrógeno alfa amínico y el nitrógeno total, estableciendo

luego la relación entre ambos valores. Cuando dicha relación es máxima, la hidrólisis es completa, es decir, se han roto todas las uniones peptídicas de la cadena proteica.-

Se ha estudiado detalladamente la velocidad de hidrólisis proteica y la influencia sobre la misma de la temperatura y la presión (13).-

-----o-----

#### MÉTODOS DE FRACCIONAMIENTO DE AMINOACIDOS.-

Existen numerosos procedimientos químicos y fisicoquímicos para fraccionar la mezcla compleja de aminoácidos que resulta de hidrolizar una proteína. Los más importantes son los siguientes:

Método de los ésteres de Fischer.- Los ésteres etílicos de ciertos aminoácidos pueden separarse por destilación fraccionada a presión reducida.-

Fcreman (14) eliminaba los aminoácidos dicarboxílicos con hidróxido de calcio y alcohol, y luego precipitaba las sales de plomo de los demás aminoácidos calentando el hidrolizado con un exceso de litar-girio. Las sales de plomo se secaban y suspendían en alcohol absoluto, saturando luego esta suspensión con ácido clorhídrico gaseoso.-

Se filtraba el cloruro de plomo precipitado y se neutralizaba la solución con alcohol absoluto amoniacal hasta pH 6. Una vez separado el cloruro de amonio se evaporaba el etanol, y se tomaba el residuo con cloroformo seco. Los clorhidratos de los ésteres se neutralizaban con hidróxido de bario seco a baja temperatura; se filtraba el cloruro de bario formado, y después de evaporar el cloroformo, se destilaban al vacío los ésteres de los aminoácidos.-

Este método, muy usado a principios de siglo, fué luego abandonado pues sólo permitía recuperar alrededor del 60 % de cada aminoácido.-

Método de extracción con butanol normal.- Dakin (15) descubrió que extrayendo con alcohol butílico caliente una solución concentrada de aminoácidos a pH aproximadamente neutro, éstos se distribuyen entre dos fases: agua saturada con butanol, y butanol saturado con agua. Los aminoácidos dicarboxílicos y los diaminoácidos quedan en la solución

acuosa, mientras que los restantes pasan a la fase butílica. Usando etanol y ácido fosfotúngstico, los dos grupos anteriores pueden originar las siguientes cinco fracciones:

- 1) Los Monoaminoácidos alifáticos y aromáticos, que son extraídos por el butanol e insolubles en alcohol etílico. (La glicocola y la serina son muy difíciles de extraer (16).
- 2) La prolina, también extraída con butanol, pero soluble en etanol.
- 3) Diketopiperazinas, extraídas por el alcohol butílico y débilmente solubles en etanol y en agua.-
- 4) Los aminoácidos dicarboxílicos, no extraídos por el butanol, y
- 5) Los diaminoácidos, que tampoco se extraen con alcohol butílico, y que se pueden separar de la fracción anterior por precipitación con ácido fosfotúngstico.-

Como en este método se requieren altas temperaturas para hervir el butanol, algunos aminoácidos se convierten en sus anhídridos (diketopiperazinas). Esta dificultad fué salvada en parte por el mismo Dakin (17) utilizando un extractor continuo a presión reducida, con lo que la temperatura de ebullición del alcohol butílico desciende hasta 45 ó 50°C.-

El extractor modificado por Woolley (18) evita completamente la formación de diketopiperazinas.-

El método de Dakin no es conveniente para el fraccionamiento cuantitativo de los aminoácidos. Johns y Jones (19) encontraron alanina y serina en la fase acuosa y ácido glutámico en el extracto butílico. Otros investigadores obtuvieron resultados similares (20 y 21).

#### Fraccionamiento de las sales de cobre de los aminoácidos (22).

Estas sales se preparan hirviendo un hidrolizado proteico con un exceso de hidróxido o carbonato cúprico. La solución resultante se evapora hasta consistencia siruposa y las sales se secan completamente con acetona.

Por extracción sucesiva con diferentes solventes se obtienen tres grupos de sales de aminoácidos:

- 1) Contiene las sales de cobre de la leucina, fenilalamina y ácido aspártico, que son insolubles en agua.-
- 2) Las sales de alanina, tirosina, ácido glutámico, histidina,

arginina, lisina y glicocola, son solubles en agua, pero insolubles en metanol seco.-

3) La valina, prolina, isoleucina, y algo de tirosina y leucina, forman sales de cobre solubles en agua y en metanol anhidro.-

Electrodiálisis.- Martin y Synge (23) propusieron el nombre de ionoforesis para los métodos de este tipo, que consisten en el movimiento de iones relativamente pequeños dentro de un campo eléctrico.-

En 1909 Ikeda y Suzuki patentaron un procedimiento electrolítico para preparar ácido glutámico. Usaban una celda de tres compartimientos, de los cuales el central y el catódico se cargaban con un hidrolizado de proteína. Se aplicaba un potencial de 4 a 6 volts entre el ánodo de zinc, hierro o aluminio y el cátodo de hierro. Las membranas eran de tela impregnada en gelatina, que luego se insolubilizaba mediante un tratamiento con formaldehído. El ácido glutámico migraba hacia el compartimiento anódico.-

Foster y Schmidt (24) usaron un método similar para preparar aminoácidos básicos. En este caso los electrodos eran de grafito, y se mantenía el pH agregando hidróxido de bario al compartimiento central y anhídrido carbónico al catódico.-

Cox, King y Berg (25) emplearon membranas de papel pergamino.-

Albanese (26) usó la electrodiálisis para analizar los aminoácidos básicos de un hidrolizado proteico.-

Theorell y Akeson (27) desarrollaron una microtécnica que les permitió trabajar con 20 ó 30 miligramos de hidrolizado. El aparato de vidrio tenía tres compartimientos separados entre sí por pequeñas membranas de pergamino. Los electrodos eran de alambre de platino enrollados en forma de espiral, y se colocaban frente y muy cerca de las membranas. El tamaño reducido de las mismas y la pequeña distancia existente entre los electrodos disminuye los fenómenos de difusión.-

Durante el proceso se hacía circular agua para refrigerar, y se agitaba el contenido de la celda mediante una corriente de aire.-

Al final de la operación los aminoácidos dibásicos se encontraban en el compartimiento catódico, los monoaminomonoácidos en el central, y los dicarboxílicos en el anódico.-

Macpherson (28) indicó que una simple electrodiálisis no es suficiente para separar estos tres grupos de aminoácidos, debiendo re-dializar por separado cada fracción para obtenerla pura.-

Consden, Gordon y Martin (29) separaron los aminoácidos básicos, neutros y ácidos, usando un soporte de sílica gel saturada con agua, en cuyos extremos colocaban un cátodo metálico y un ánodo de grafito.-

#### Métodos cromatográficos.-

El análisis cromatográfico comprende todas las técnicas en las cuales el flujo de un solvente o de un gas a través de un medio poroso, causa la migración diferencial de los componentes de una mezcla.-

Aunque los orígenes de estos métodos se remontan a los primeros trabajos de Pliny y a los posteriores estudios de Runge, Schönbein y Goppelsroeder que datan del período 1850-1900, se considera que la primera experiencia de cromatografía tal como se entiende hoy, fué realizada en 1910 por el botánico Tswett. Este hacía pasar un extracto etéreo de hojas verdes a través de una columna de carbonato de calcio; el material coloreado quedaba retenido en la parte superior de la columna. Luego lavaba con éter de petróleo, y observaba que la banda coloreada comenzaba a migrar desdoblándose en dos zonas netamente separadas y de diferentes colores, que correspondían a la clorofila A y B respectivamente.-

Fraccionamiento de los aminoácidos por cromatografía de adsorción. Si se hace pasar un hidrolizado neutro de proteína a través de una columna de sílice, los aminoácidos básicos quedan adsorbidos, mientras que los dicarboxílicos y neutros pasan con las aguas de lavado. La arginina, lisina e histidina se eluyen con ClH 0,1 N.

Los aminoácidos dicarboxílicos se pueden adsorber sobre una columna de alúmina previamente tratada con ácido, eluyéndolos luego con ClH 2N a 85 ó 90°C.

Los aminoácidos neutros pasan cuantitativamente en el filtrado sin ser retenidos por la alúmina. De todos ellos, solamente los aromáticos (fenilalanina, triptofano y tirosina) son adsorbidos con carbón activado y pueden eluirse con acetato de etilo (30 y 31).-

Cromatografía de intercambio iónico.(32).- Ciertas resinas intercambiadoras de cationes, como la "Duolita C-1" y la "Amberlita IR-100", fijan cuantitativamente arginina y lisina. La histidina y el resto de los aminoácidos que pudieran haber quedado adsorbidos se eluyen con piridina muy diluida. Después de eliminar la piridina se hace pasar la mezcla a través de una resina intercambiadora de aniones ("Amberlita IR-4B o "Duolita A-3"), que retiene selectivamente los ácidos aspártico y glutámico.(33).

-----o-----

#### DETERMINACION CUANTITATIVA DE LOS AMINOACIDOS.-

Cromatografía de partición.- Después de los estudios preliminares (34) sobre la separación de acetilaminoácidos basándose en sus diferentes coeficientes de partición entre el cloroformo y el agua, Martin y Synge (35) crearon la cromatografía de partición. En esta técnica las sustancias se separan por su diferente distribución entre dos fases líquidas no miscibles; una móvil (el solvente de desarrollo), y otra estacionaria, que se encuentra retenida por un material inerte. Gordon, Martin y Synge (36) han desarrollado un método para analizar cuantitativamente una mezcla de aminoácidos acetilados obtenidos a partir de un hidrolizado de proteína. La solución de acetilaminoácidos se transfiere a una columna de sílica gel, que es el soporte inerte de la fase acuosa estacionaria; luego se eluye con mezclas de butanol-cloroformo y de propanol-ciclohexano en diversas proporciones. Los distintos líquidos de desarrollo permiten separar fenilalanina, valina, alanina, prolina, tirosina, metionina y triptofano, que se pueden dosar por cualquier método colorimétrico.-

En 1944, Consden, Gordon y Martin (37) usaron la cromatografía de partición para analizar mezclas de aminoácidos sin acetilar; en este método, emplearon la celulosa en forma de hojas de papel de filtro como soporte de la fase estacionaria. Este trabajo dió origen a la cromatografía sobre papel, que a partir de entonces cobró un impulso extraordinario y comenzó a usarse con gran éxito para desdoblar mezclas complejas de sustancias naturales, sintéticas, orgánicas e inorgánicas.

Posteriormente Synge (38) usó una columna de almidón como

soporte inerte de la fase estacionaria. Esta técnica fué puesta a punto por Moore y Stein (39), que lograron desarrollar uno de los métodos más exactos para analizar cuantitativamente mezclas de aminoácidos.-

Distribución en contracorriente.-Las sustancias que tienen diferentes coeficientes de distribución entre dos solventes inmiscibles, pueden separarse si la distribución entre dichos solventes se repite un número suficiente de veces.-

Este método, que ha sido muy usado para fraccionar mezclas de hormonas, antibióticos y péptidos, también puede emplearse para la separación y dosaje de aminoácidos (40,41).-

Se han ideado numerosos aparatos para realizar extracciones en contracorriente, pero el más usado actualmente es el de Craig (42 y 43).-

Tanto los métodos de distribución como los cromatográficos, deben complementarse con alguna técnica colorimétrica o fluorométrica que permita determinar cuantitativamente las sustancias separadas.-

Producto de solubilidad de sales de aminoácidos.- Bergmann y sus colaboradores demostraron que el producto de solubilidad de la sal de un aminoácido y un ácido sulfónico depende de la presencia de otros aminoácidos en la solución. En cambio resulta constante la relación entre los productos de solubilidad correspondientes a dos diferentes proporciones de ácido sulfónico y aminoácido.-

De esta manera se puede calcular la cantidad de aminoácido presente en una solución, si se determinan las solubilidades de su sal sulfónica en dos alícuotas a las que se ha agregado distintas proporciones de reactivo precipitante (44-48); éste no debe precipitar ningún otro aminoácido en las condiciones de la experiencia.-

La principal desventaja de este método consiste en que son distintas las solubilidades de las sales de los dos isómeros ópticos y del racémico de un mismo aminoácido.-

Dilución isotópica.- Si a un hidrolizado de proteína se agrega un exceso medido de un aminoácido rico en  $N^{15}$ , y de la mezcla total se aísla y purifica dicho aminoácido determinando su contenido en el isótopo mencionado, se puede calcular la cantidad del aminoácido presente en el hidrolizado original (49).-

Ussing (50) ha descripto una técnica similar empleando aminoá-

cidos ricos en deuterio, y Cannan y colaboradores (51-52) utilizaron los p-iodofenilsulfonil derivados de los aminoácidos con iodo radioactivo.-

En estas determinaciones el error es independiente del procedimiento de obtención de la sustancia pura y de su rendimiento: los únicos factores importantes son la pureza del compuesto añadido y del aminoácido aislado, y la exactitud del análisis isotópico.-

Aunque este método es de los más exactos, su uso es limitado porque requiere aparatos caros y técnicas complicadas.-

#### Métodos microbiológicos y enzimáticos.-

El conocimiento de las necesidades nutritivas de ciertas bacterias y el perfeccionamiento de medios sintéticos de desarrollo, permitieron la elaboración de métodos para determinar cuantitativamente cada uno de los constituyentes de dichos medios.-

Si se elimina un componente esencial del medio de desarrollo de un microorganismo, y se lo reemplaza por una solución que contenga una cantidad desconocida de dicho constituyente, éste puede dosarse midiendo el crecimiento de la bacteria.-

Un medio ideal de desarrollo es aquél que esté completamente exento de la sustancia que se desea determinar, y que contenga todos los otros nutrientes esenciales o estimulantes del crecimiento del microorganismo (53).-

Para dosar aminoácidos se emplean bacterias lácticas como el "Lactobacillus casei", "Lactobacillus arabinosus", "Streptococcus fecalis", "Leuconostoc mesenteroides" y otros. El crecimiento de estos organismos se mide por turbidimetría o por titulación del ácido láctico producido.-

Kuiken (54), Mc Mahan y Snell (55), Dunn (56) y otros investigadores, han puesto a punto técnicas para la determinación cuantitativa de arginina, lisina, valina, leucina, isoleucina, ácido glutámico, triptofano y fenilalanina.-

También se han usado mutantes de la "Neurospora crassa" para el dosaje de algunos aminoácidos (57). El crecimiento de la neurospora se mide pesando su micelio. Rockland y Dunn (58) emplearon el protozoo "Tetrahymena geleii" para determinar algunos aminoácidos en proteínas sin hidrolizar.-

Los métodos enzimáticos se conocen desde hace muchos años en

el análisis de mezclas de aminoácidos. La determinación de arginina por la acción sucesiva de arginasa y ureasa es uno de los más exactos(59).

Ciertas bacterias contienen decarboxilasas específicas para algunos aminoácidos(60). Estas enzimas actúan liberando anhídrido carbónico que puede medirse con un respirómetro de Warburg o un aparato manométrico de Van Slyke.-

Los métodos biológicos son muy específicos y sensibles. No requieren un equipo complicado de laboratorio y son similares para todos los aminoácidos; además se pueden adaptar admirablemente a los trabajos de rutina.

En cambio presentan el inconveniente de dosar sólo los isómeros naturales de los aminoácidos.-

-----0-----

## PARTE EXPERIMENTAL

### Obtención de zeína.-

Se usó la técnica de Nalam y Vickery (61) modificada por Larco(62): 200 gramos de gluten de maíz se extrajeron durante dos horas con 800 ml de etanol 96% a una temperatura de 60°C. El extracto enfriado y filtrado primero a través de una gasa y luego por un Büchner, se mezcló con igual volumen de éter agitando enérgicamente. Se formó un floculado de zeína cruda que se dejó decantar, separando el líquido sobrenadante que volvió a agitarse para recuperar el total de la zeína de la solución.-

La proteína cruda se disolvió en un pequeño volumen de alcohol 96% a 60°C., y después de enfriar se agregó un volumen igual de éter. La zeína precipitó y las materias grasas y los colorantes quedaron en la solución.-

Se repitió una vez más la disolución en alcohol y la precipitación con éter. La proteína obtenida se disolvió a 60°C en un pequeño volumen de etanol 96% y la solución alcohólica se vertió lentamente sobre un volumen 10 veces mayor de agua destilada. Esta última etapa se realizó con agitación continua para evitar la formación de flóculos grandes de zeína que pudieran incluir impurezas.-

El precipitado se dejó decantar varias horas, se separó el líquido sobrenadante y luego se filtró la proteína a través de un Büchner al vacío para extraerle la mayor parte del agua.-

La zeína se colocó en un cristizador formando una capa de poco espesor y se secó con una corriente de aire frío.-

### Análisis de la zeína.-

La determinación de humedad se realizó secando a 105°C hasta constancia de peso.-

El nitrógeno se dosó según la siguiente técnica (63):

En un baloncito de aproximadamente 12 cm de altura y 3,5 cm de ancho máximo se colocaron unos 10 mg de proteína exactamente pesada, 40 mg de HgO, 0,5 g de  $SO_4K_2$  y 1,5 ml de  $SO_4H_2$  concentrado. Se calentó suavemente hasta la desaparición de la espuma, y luego se aumentó la temperatura continuando el calentamiento hasta unas dos horas después que la solución se volvió incolora. Se dejó enfriar, se agregó una gota de

alcohol y volvió a calentarse hasta que la mezcla se decoloró nuevamente.-

La solución ácida se diluyó con 8 ml de agua y se pasó al aparato de destilación de Pregl-Parmas-Wagner (64), al que previamente se había agregado una segunda trampa de Kjeldahl. Se lavó el baloncito con porciones de 3 ml de agua para que la transferencia fuera cuantitativa y se agregó por el embudo 6 a 7 ml de solución 40% de HONa y 5% de  $S_2O_3Na_2 \cdot 5H_2O$  hasta alcalinizar fuertemente la mezcla. Se cerró el sistema y se abrió la conexión con el balón que contenía el agua para el arrastre.-

Se recogieron 10 ml de destilado en un erlenmeyer con 5 ml de  $BO_3H_3$  al 2% y una gota de indicador que se preparó mezclando soluciones alcohólicas de rojo de metilo y de verde de bromocresol al 0,2% en proporción 1 a 5 en volumen.-

Se lavó con una pequeña cantidad de agua y se tituló el amoniaco con ClH 0,02N. Paralelamente se realizó un blanco con los reactivos.

Resultados:

Humedad: 7,89 %

Cenizas: 0,51 %

Nitrógeno: 16,6 %

#### "Alfa protefna" de soja.-

Siguiendo los métodos ya descriptos se analizó una mezcla de proteínas denominada "alfa protefna" de soja, preparada por Glidden Co. de Cleveland (Ohio, U.S.A.)

Los resultados fueron los siguientes:

Humedad : 8,97 %

Cenizas : 1,28 %

Nitrógeno: 16,2 %

En todos los casos el porcentaje de nitrógeno se refiere a protefna seca y libre de cenizas.-

#### Hidrólisis.-

Alrededor de 0,5 gramos de protefna se hidrolizaron por ebullición a reflujo durante 24 horas con 100 ml de HCl 6N tridestilado. Esta operación se realizó en un aparato totalmente de vidrio.

El hidrolizado se evaporó al vacío hasta sequedad para eliminar el ácido, y el residuo se disolvió en solución acuosa de isopropanol

al 10 % en volumen con algunas gotas de HCl 6N llevando a un volumen conocido.-

En el caso de la zeína se hidrolizó 0,4818 g; como no se formaron huminas, el residuo seco resultante de la evaporación se tomó con isopropanol al 10% y se llevó a 50 ml.-

En forma análoga se hidrolizaron 0,4952 g de "alfa proteína" de soja. Se evaporó hasta sequedad y el residuo se disolvió en alcohol isopropílico al 10%. Las huminas se separaron por filtración y la solución de aminoácidos se llevó a 50 ml de volumen.-

Se usó isopropanol por ser un buen conservador de las soluciones de aminoácidos, y porque no interfiere en las determinaciones cromatográficas.-

En ambos hidrolizados se determinó el nitrógeno, obteniendo los siguientes valores:

Hidrolizado de zeína:	16,2 %
Hidrolizado de "alfa proteína" de soja:	15,9 %

-----0-----

CROMATOGRAFIA CUALITATIVA SOBRE PAPEL DE HIDROLIZADOS PROTEICOS.-

A) Cromatografía circular.-

Reactivos y aparatos.-

Ninhidrina al 0,25% en acetona.

Isatina al 0,2% en acetona conteniendo 4% de ácido acético glacial. Esta solución se filtró para separar el insoluble formado.-

Solventes de desarrollo.- Solución de 70% de fenol, 5% de isopropanol y 25% de agua bidestilada en peso. Este solvente se preparó fundiendo 500 gramos de fenol "May & Baker", y agregándole luego 178,5 ml de agua y 45,5 ml de alcohol isopropílico.-

Butanol normal-ácido acético-agua (40:10:50 en volumen). Se mezclaron 4 partes de butanol normal redestilado (punto de ebullición: 117-118°C) con 1 parte de ácido acético glacial y 5 partes de agua bidestilada. Después de agitar se dejó en reposo, formándose entonces dos capas: la superior se usó como solvente y la inferior se desechó (65).-

En todos estos casos se usó agua bidestilada en aparatos de vidrio para eliminar cualquier traza metálica que pudiera interferir en los ensayos cromatográficos.-

Soluciones de aminoácidos.- Se prepararon dos soluciones en isopropanol al 10% acidificado con algunas gotas de HCl concentrado, para facilitar la solubilidad de los aminoácidos.-

Cada solución contenía 5 milimoles por litro de cada uno de los aminoácidos que se mencionan a continuación:

Solución A: leucina, fenilalanina, triptofano, valina, prolina, hidroxiprolina, treonina, glicina, ácido aspártico y lisina.-

Solución B : isoleucina, metionina, tirosina, alanina, ácido glutámico, serina, arginina, histidina y cistina.

Papel de filtro Schleicher y Schüll No. 589, banda azul, en discos de 18,5 cm de diámetro.

Cajas para cromatografía de vidrio "Termiglas", de 170 mm de diámetro exterior y 85 mm de altura, con tapa plana de vidrio esmerilado de 190 mm de diámetro y 2,5 mm de espesor.-

Pipetas de 0,1 ml de capacidad graduadas en microlitos.-

Método:

Se usó una técnica similar a las descritas por Giri y Rao(66),

y por Saifer y Oreskes (67-68).-

En el centro de cada disco de papel se depositó una gota de 3 a 5  $\mu$ l de la solución a cromatografiar. El diámetro de estas gotas fué siempre inferior a 8 mm. Se dejó secar a temperatura ambiente, y luego se hizo un corte de 4 mm de longitud en el centro del papel con una hoja de afeitar. En esta ranura se insertó una tira de papel de 4 mm de ancho y 25 mm de largo.-

Cada disco de papel así preparado se colocó en posición horizontal sobre una caja para cromatografía, con la tira sumergida en un vaso de 150 ml lleno con solvente de desarrollo (fig. 1).

La tira quedó perpendicular al plano del papel que se hallaba a 2 cm de distancia de la superficie del líquido de desarrollo.

Se colocó la tapa de vidrio sobre el disco de papel cerrando la cámara, que de esta manera se saturó rápidamente con los vapores del solvente. Este ascendió por capilaridad por la tira hasta alcanzar el plano del disco. Se dejó desarrollar el cromatograma durante la noche (12 a 16 horas); en este período el solvente recorrió una distancia radial de aproximadamente 8 cm desde el centro del papel.

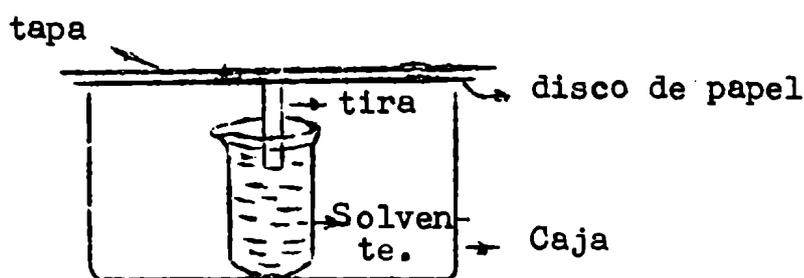


Fig. 1

Terminado el desarrollo se sacó el disco de papel, se marcó con lápiz el límite al que llegó el solvente (frente líquido) y se dejó secar al aire.-

Antes de realizar cada cromatografía se debe reponer el solvente gastado.

Los papeles desarrollados con mezcla de fenol-isopropanol-agua se lavaron dos veces con acetona para eliminar las trazas de fenol y acelerar el secado.-

Los cromatogramas secos se cortaron por la mitad en dos partes: una de ellas se sumergió en el reactivo de isatina y la otra en el de

ninhidrina; luego se dejaron secar.-

El color de la ninhidrina se desarrolló en varias horas a temperatura ambiente. Los papeles sumergidos en isatina se colorearon calentándolos a 100°C durante 15 minutos.-

La mayoría de los aminoácidos aparecieron como arcos de color púrpura sobre fondo blanco, en las porciones que habían sido sumergidas en ninhidrina, o de distintos colores sobre fondo amarillo, en las teñidas con isatina.-

En cada cromatograma se trazaron varios radios; sobre cada uno de éstos se marcó el centro de cada banda coloreada y se calculó los Rf. a lo largo de cada radio de la siguiente manera:

$$R_f = \frac{\text{Distancia en mm desde el centro del papel hasta el centro de cada banda}}{\text{Distancia en mm desde el centro del papel hasta el frente líquido}}$$

El Rf. de cada componente se determinó promediando todos los valores obtenidos para dicho componente sobre los distintos radios trazados.

En nuestro caso se realizaron 30 cromatografías diarias, 15 con cada uno de los solventes mencionados. La temperatura fué controlada con un termógrafo colocado sobre la mesa donde estaban las cámaras cromatográficas.-

Las cajas que se usaron con la mezcla fenol-isopropanol-agua se mantuvieron en la oscuridad dentro de armarios, pues el fenol se polimeriza rápidamente en presencia de luz.-

Para determinar la posición de cada aminoácido, se realizaron cromatografías de las mezclas estándar a las que se agregó un exceso de un aminoácido distinto por vez. El componente en exceso se localizó notando cuál era la banda más intensa o más ancha.-

Después de haber fijado la secuencia de todos los aminoácidos, se hicieron cromatografías de hidrolizados de zeína y de "alfa proteína" de soja. Comparando los Rf. de las bandas obtenidas con aquéllos determinados a partir de las mezclas estándar, se pudo realizar un análisis cualitativo de los hidrolizados mencionados.

Todas las mezclas que se debían cromatografiar se neutralizaron con NaOH N antes de ser depositadas sobre el papel.-

#### Resultados.-

Se realizaron 50 cromatografías de cada mezcla estándar con

cada uno de los solventes. En los tres meses que duraron estas experiencias la temperatura del laboratorio varió entre 19 y 23°C; por lo tanto no fué necesario regularla.

CUADRO I

Valores promedios de los Rf. obtenidos con mezclas estándar de aminoácidos empleando butanol-ácido acético-agua (4:1:5) como solvente de desarrollo.

(Papel S y S No. 589, banda azul)

Aminoácido	Rf.	Desviación Standard	Color con ninhidrina	Color con isatina calentando 15' a 100°C.	Color con isatina 2 hrs. después de haber calentado.
Cistina	0,18	+ 0,018	púrpura	violác.rosado	verde grisác.
Lisina	0,19	+ 0,032	Púrp.violác.	lila	azul verdoso
Histidina	0,22	+ 0,031	Púrp.violác.	violác.azulado	celeste verd.
Arginina	0,25	+ 0,027	Púrp.violác.	violác.rosado	plat.violác.
Ac.Aspartico-glicina	0,29	+ 0,026	púrpura	azul verdoso	verde grisác.
Serina	0,31	+ 0,025	púrpura	rosado violác.	verde muy claro
Hidroxiprolina	0,32	+ 0,024	amarillo	celeste	desaparece.
Treonina	0,34	+ 0,026	Púrp.violác.	rosa salmón	ros.muy claro
Acido glutámico	0,36	+ 0,023	Púrp.rojizo	violác.azulado	verde grisác.
Alanina	0,39	+ 0,021	Púrp.azulado	azul violáceo	azul claro
Prolina	0,40	+ 0,024	amarillo	azul intenso	azul intenso
Tirosina	0,50	+ 0,026	púrpura	verde azulado	verde grisác.
Valina	0,51	+ 0,022	Púrp.violác.	rosa violác.	ros.muy claro
Triptofano	0,54	+ 0,026	Púrp.violác.	gris azulado	pardo claro
Metionina	0,55	+ 0,021	Púrp.violác.	violáceo	verde grisác.
Fenilalanina	0,62	+ 0,026	Púrp.violác.	verde azulado	verde claro
Isoleucina	0,68	+ 0,023	Púrp.violác.	rosa salmón	ros.muy claro
Leucina	0,69	+ 0,023	Púrp.violác.	rosa salmón	ros.muy claro

Nota:-En mezclas estándar con todos los aminoácidos los grupos histidina-arginina, ácido aspártico-glicina-serina, treonina-ácido glutámico, valina-triptofano-metionina e isoleucina-leucina, aparecen cada uno como una so-

la banda.-

Es interesante comparar los colores indicados en el cuadro I con los mencionados por Saifer y Oreskes (69).-

CUADRO II

Valores promedios de los Rf obtenidos con mezclas estándar de aminoácidos y fenolisopropanol-agua (70:5:25) como solvente de desarrollo.

(Papel S y S No. 589, banda azul)

Aminoácido	Rf	Desviación Stándard
Acido aspártico	0,16	+ 0,011
Cistina	0,21	+ 0,038
Lisina	0,24	+ 0,013
Histidina	0,30	+ 0,025
Serina	0,34	+ 0,024
Arginina	0,35	+ 0,024
Glicina	0,37	+ 0,013
Acido glutámico	0,40	+ 0,032
Treonina	0,44	+ 0,016
Alanina	0,53	+ 0,011
Tirosina	0,60	+ 0,021
Hidroxiprolina	0,66	+ 0,011
Valina-Triptofano	0,74	+ 0,014
Metionina	0,77	+ 0,030
Fenilalanina-leucina-isoleucina	0,85	+ 0,020
Prolina	0,89	+ 0,012

Nota.- En mezclas estándar con todos los aminoácidos los grupos histidina-serina-arginina, valina-triptofano y fenilalanina-leucina-isoleucina aparecen cada uno como una sola banda. La histidina, serina y arginina forman una banda difusa en la cual se pueden distinguir tres zonas. La cistina también da una banda difusa que a veces se superpone con la de ácido aspártico.-

Los cromatogramas coloreados no pueden conservarse mucho tiempo. El color de la ninhidrina se aclara hasta desaparecer después de 2 ó 3 días, y el de la isatina después de pocas horas; por esta razón fueron fotografiados.-

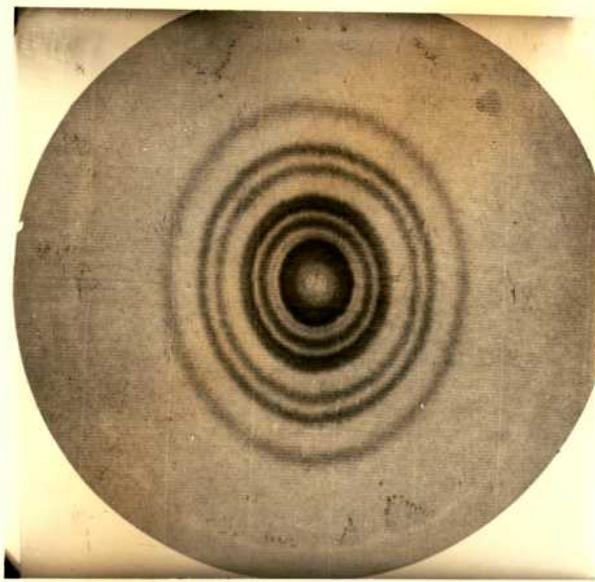


Fig. 2- Cromatograma Circular

Se hicieron 40 cromatografías de cada hidrolizado con cada uno de los solventes ya mencionados.-

CUADRO III

Valores Rf obtenidos con hidrolizado de zeína, empleando butanol-ácido acético-agua (4:1:5) como solvente de desarrollo.

(Papel S y S No. 589, banda azul)

Banda No.	Rf.	Desviación estándar	Color con isatina	Aminoácidos correspond.
1	0,16	-	violáceo rosado	cistina
2	0,29	+ 0,023	azul verdoso	Ac. aspártico-serina-glic
3	0,34	+ 0,022	violáceo	Treonina-ácido glutámico
4	0,37	+ 0,021	azul violáceo	alanina
5	0,40	+ 0,019	azul intenso	prolina
6	0,47	+ 0,020	verde grisáceo	tirosina
7	0,53	+ 0,020	rosa violáceo	Valina - metionina
8	0,64	+ 0,026	verde azulado	Fenilalanina
9	0,70	+ 0,024	rosa salmón int.	Leucina - isoleucina

CUADRO IV

-21-

Valores Rf. obtenidos con hidrolizado de zeína y fenol-isopropanol-agua como líquido de desarrollo. (Papel S y S No. 589, banda azul).

Banda No.	Rf.	Desviación estándar	Color con isatina	Aminoácidos correspondientes
1	0,16	+ 0,012	azul grisáceo	Acido aspártico
2	0,22	+ 0,019	rosa violáceo	cistina
3	0,30	+ 0,014	rosa anaranjado	Histidina-serina-arginina
4	0,38	+ 0,016	violáceo	Acido glutámico-glicina
5	0,45	+ 0,016	rosa claro	treonina
6	0,54	+ 0,011	azul violáceo	alanina
7	0,82	+ 0,021	rosa violáceo	Fenilalanina-leucina-isoleucina.
8	0,89	+ 0,015	azul	prolina.

De acuerdo con los datos consignados en los cuadros III y IV el hidrolizado de zeína contenía los siguientes aminoácidos: cistina, histidina, arginina, ácido aspártico, serina, glicina, ácido glutámico, treonina, alanina, prolina, tirosina, metionina, valina, fenilalanina, leucina e isoleucina.

CUADRO V

Valores Rf. obtenidos con hidrolizado de "alfa proteína" de soja, desarrollando con butanol-ácido acético-agua. (Papel S y S No. 589, banda azul)

Banda No.	Rf.	Desviación estándar	Color con isatina	Aminoácidos correspondientes
1	0,14	+ 0,007	violáceo claro	cistina
2	0,18	+ 0,011	lila	lisina
3	0,27	+ 0,012	verde azulado	Ac. Aspártico-serina-glicina
4	0,33	+ 0,011	violáceo	Treonina-ácido glutámico
5	0,34	+ 0,019	azul violáceo	alanina
6	0,38	+ 0,011	azul intenso	prolina
7	0,45	+ 0,011	verde grisáceo	tirosina
8	0,51	+ 0,015	rosa	Valina-metionina
9	0,62	+ 0,017	verde grisáceo	Fenilalanina
10	0,67	+ 0,019	rosa salmón intenso	Leucina-isoleucina

CUADRO VI

Valores Rf. obtenidos con hidrolizado de "alfa proteína" de soja y fenol-isopropanol-agua como solvente de desarrollo.

(Papel S y S No. 589, banda azul)

Banda No.	Rf.	Desviación estándar	Color con isatina	Aminoácidos correspond.
1	0,16	+ 0,012	azul grisáceo	ácido aspártico
2	0,23	- 0,015	violáceo claro	cistina - lisina
3	0,29	+ 0,015	violáceo anaranj.	Histidina-serina-arginina
4	0,37	- 0,016	violáceo	Glicina-ácido glutámico
5	0,44	+ 0,017	rosa	Treonina
6	0,53	- 0,013	azul violáceo	Alanina
7	0,75	+ 0,020	violáceo claro	Valina-metionina
8	0,81	- 0,018	rosa violáceo	Fenilalanina-leucina-isoleucina.
9	0,88	+ 0,014	azul intenso	Prolina

Según los cuadros V y VI el hidrolizado de "alfa proteína" de soja contenía cistina, lisina, ácido aspártico, histidina, arginina, serina, glicina, ácido glutámico, treonina, alanina, prolina, tirosina, valina, metionina, fenilalanina, leucina e isoleucina.

Cromatografía circular con desarrollo de 80 horas.-

Los datos de los cuadros I y II indican que algunos aminoácidos se superponen dando bandas difusas. En ciertos casos hemos encontrado que se puede solucionar este inconveniente realizando cromatografías de desarrollo prolongado. De esta manera la histidina, serina y arginina, que en la cromatografía circular con fenol-isopropanol-agua daban una banda difusa, se separaron netamente después de un desarrollo de 80 horas con el mismo solvente. En este período, tanto el frente líquido como también la tirosina, hidroxiprolina, valina, triptofano, metionina,

fenilalanina, isoleucina, leucina y prolina alcanzaron el borde del papel circular; por esta razón calculamos los  $R_{alanina}$ , para caracterizar las bandas obtenidas.

$$R_{alanina} = \frac{\text{Distancia en mm desde el centro del papel hasta el centro de cada banda}}{\text{Distancia en mm desde el centro del papel hasta el centro de la banda de alanina}}$$

CUADRO VII

Cromatografía con fenol-isopropanol-agua  
(Papel S y S No. 589, banda azul)

Aminoácido	Valores Rf. después de un desarrollo de 12-16 horas (Promedios de 50 determin.)	Valores $R_{alanina}$ después de un desarrollo de 80 horas (Promedios de 50 determin.)
Histidina	0,30 ± 0,025	0,41 ± 0,023
Serina	0,34 ± 0,024	0,61 ± 0,027
Arginina	0,35 ± 0,024	0,55 ± 0,025

Los desarrollos de 80 horas también se aplicaron a la cromatografía con butanol-ácido acético-agua.-

Técnica de desarrollo múltiple (70).-

En el centro de un disco de papel de filtro se cortó una ranura de 4 mm de longitud, y luego se trazó con lápiz una circunferencia de 4 cm de diámetro; sobre esta circunferencia se depositaron alternadamente, y a 15 mm de distancia una de otra, 4 gotas de soluciones estándar de aminoácidos y otras 4 de hidrolizados proteicos. Las gotas tenían 2 a 3  $\mu$ l de volumen y 4 a 5 mm de diámetro, por lo que nunca llegaban a tocarse.-

Se dejó secar a temperatura ambiente y se insertó en la ranura una tira de 4 mm de ancho y 25 mm de largo. El papel así preparado se colocó en la cámara cromatográfica con la tira sumergida en el solvente.-

Terminado el desarrollo se sacó el cromatograma, se dejó secar y se volvió a desarrollar de la misma manera dos veces más (desarrollo múltiple). Finalmente se sumergió el papel seco en el reactivo de coloración.-

Los aminoácidos aparecieron como arcos concéntricos de distintos radios. Los componentes de las muestras desconocidas se identificaron refiriendo los arcos a aquéllos formados por los aminoácidos conocidos de las mezclas estándar (66,71 y 72).-

Cuando se colocaban las gotas muy cerca unas de otras al principio de la cromatografía, los arcos correspondientes a los aminoácidos conocidos y desconocidos aparecían juntos formando círculos.-



Fig. 3 - Cromatograma Múltiple

Los desarrollos múltiples producen una mayor y más neta separación de las bandas.-

Cromatografía circular en pequeñas cajas de Petri.-

Hemos adaptado un método análogo al descrito en la página 15 desarrollando un gran número de cromatogramas en discos de papel de filtro Schleicher y Schüll No. 589, banda azul, de 11 cm de diámetro. En este caso el solvente ascendía por una tira de 3 mm de ancho y 20 mm de largo que se había insertado en la ranura de 3 mm realizada en el centro del papel.-

La cámara cromatográfica era una caja de Petri común de 95 mm de diámetro externo y 23 mm de altura, con su correspondiente tapa de 102 mm de diámetro y 21 mm de altura.-

Después de apoyar el disco de papel sobre los bordes de la caja cargada con 50 ml de solvente, se colocaba la tapa presionando el papel como lo indica la figura 4.-

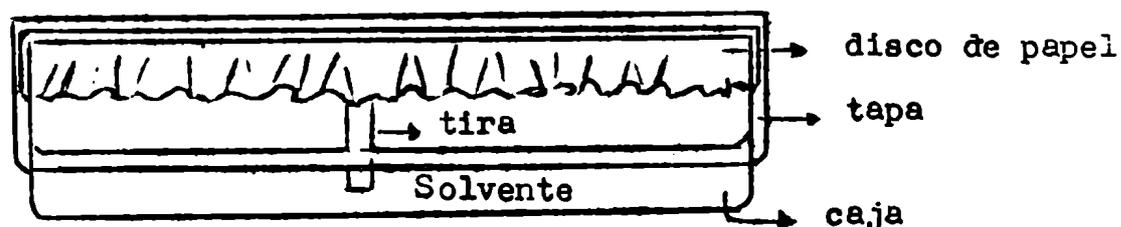


Fig. 4

El desarrollo se completaba en 2 a 3 horas; se dejaba secar el cromatograma y luego se lo desarrollaba dos veces más, cuidando que el frente líquido llegara siempre a la misma posición.-

La cromatografía circular en pequeñas cajas de Petri es una técnica muy simple y cómoda pues no requiere ningún aparato especial; además es rápida y da valores  $R_f$ . perfectamente reproducibles.-

## CUADRO VIII

Valores  $R_f$ . obtenidos por cromatografía circular en pequeñas cajas de Petri. (Solvente: butanol-ácido acético-agua 4:1:5; Papel S y S No. 589, banda azul)

Aminoácido	$R_f$ . (Valores promedios de 50 determinaciones)	Desviación estándar
Cistina-lisina	0,15	+ 0,011
Histidina	0,19	+ 0,011
Acido aspártico	0,20	+ 0,017
Arginina-glicina	0,24	+ 0,016
Hidroxiprolina	0,28	+ 0,012
Serina	0,29	+ 0,014
Treonina	0,34	+ 0,020
Acido glutámico	0,36	+ 0,014
Prolina-alanina	0,41	+ 0,018
Tirosina	0,53	+ 0,019
Valina-triptofano	0,59	+ 0,014
Metionina	0,63	+ 0,014
Fenilalanina	0,71	+ 0,017
Isoleucina	0,77	+ 0,013
Leucina	0,78	+ 0,009

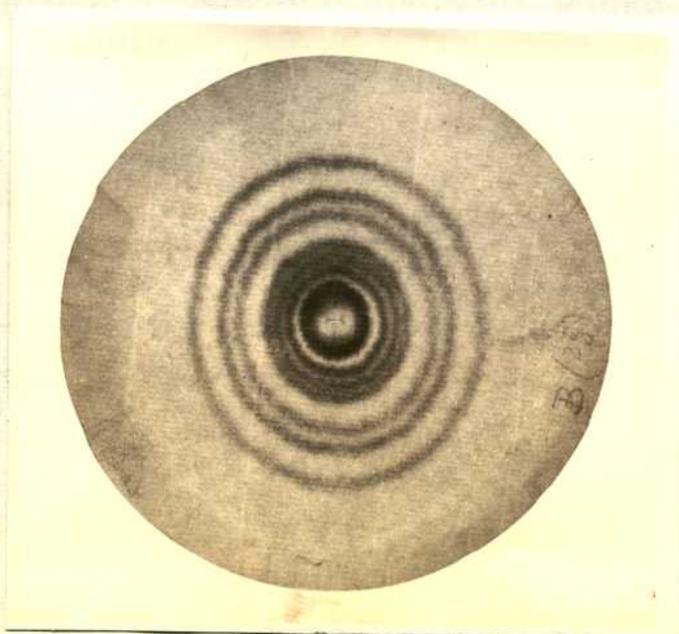


Fig. 5

Cromatograma realizado en caja de Petri chica.

CUADRO IX

Aminoácido	Valores Rf. obtenidos con mezcla de butanol-ác. acético-agua (4:1:5) recientemente preparada.	Valores Rf. obtenidos desarrollando con el solvente butanol acético-agua (4:1:5) envejecido durante 75 días.	Valores Rf. obtenidos desarrollando con butanol-acético-acetato de butilo (39:10:48:3) 10v/v	Valores Rf. obtenidos con la mezcla de butanol-acético-acetato de butilo (4:1:5:5)
Arginina	0,26	0,14	0,19	---
Serina	0,32	0,21	0,29	---
Ac. glutámico	0,37	0,27	0,34	---
Alanina	0,39	0,30	0,35	---
Prolina	0,43	0,34	0,40	0,11
Tirosina	0,50	0,41	0,46	0,21
Metionina	0,56	0,49	0,52	0,21
Leucina	0,71	0,65	0,67	0,36

(Promedios de 6 determinaciones)

Cromatografía con solvente viejo y con mezclas de butanol-ácido acético -agua-acetato de butilo en distintas proporciones.

A medida que el solvente butanol-ácido acético-agua envejecía, observamos que disminuían los valores  $R_f$ . de las distintas bandas. Esto se atribuyó a la esterificación parcial del ácido acético con el alcohol butílico (73); para comprobarlo se realizaron cromatografías con solvente fresco, con el mismo líquido de desarrollo después de 75 días de haber sido preparado y con varias mezclas de butanol-ácido acético-agua-acetato de butilo en diversas proporciones.-

Los resultados fueron los siguientes:

La mezcla butanol-ácido acético-agua-acetato de butilo (36:9:45:10 v/v) se obtuvo agregando 15 ml de acetato de butilo a 135 ml de butanol-ácido acético-agua (4:1:5 v/v) recientemente preparados.-

El solvente butanol-ácido acético-agua-acetato de butilo (39:10:48:3 v/v) se preparó añadiendo 5 ml de acetato de butilo a 145 ml de la mezcla de butanol-ácido acético-agua (4:1:5 v/v).-

El cuadro IX muestra que al aumentar el porcentaje de acetato de butilo disminuyen los valores Rf. de todas las bandas.-

Cuando se usó la mezcla de butanol-ácido acético-agua (4:1:5) 75 días después de preparada, los Rf. resultantes fueron aproximadamente iguales a los obtenidos con butanol-ácido acético-agua-acetato de butilo (36:9:45:10 v/v). Esto indicaría que el solvente envejecido contenía 10 % de ester.-

-----o-----

#### B) Cromatografía bidimensional.-

Se usaron hojas cuadradas de papel de filtro Schleicher y Schüll No. 2043 B. de 24 cm de lado.-

La gota de la solución a cromatografiar se depositó en un ángulo de la hoja a 2 cm de distancia de cada borde. Cuando la solución era diluída se depositaban varias gotas superpuestas, dejando secar después de cada agregado.-

La hoja así preparada se colgó verticalmente de dos broches de acero inoxidable colocados en una varilla de vidrio que estaba sostenida por un armazón de madera (fig. 6).

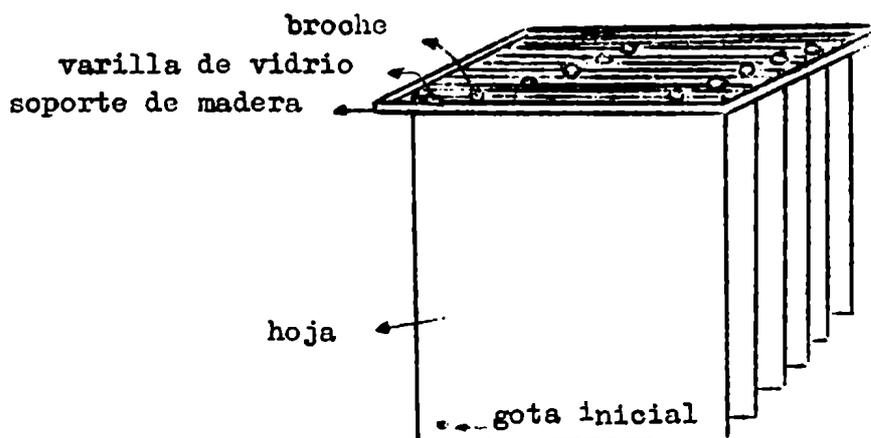


Fig. 6

El armazón cargado con seis hojas de papel se colocó dentro de la cámara cromatográfica de tal manera, que el borde inferior de las hojas quedó sumergido 2 ó 3 mm en el líquido de desarrollo.-

La cámara era una estufa metálica de laboratorio de 30 cm de ancho, 32 cm de profundidad y 43 cm de altura, en cuyo piso se había colocado una cubeta plana de vidrio que contenía 400 ml de la mezcla fenol-isopropanol-agua (70:5:25 en peso).-

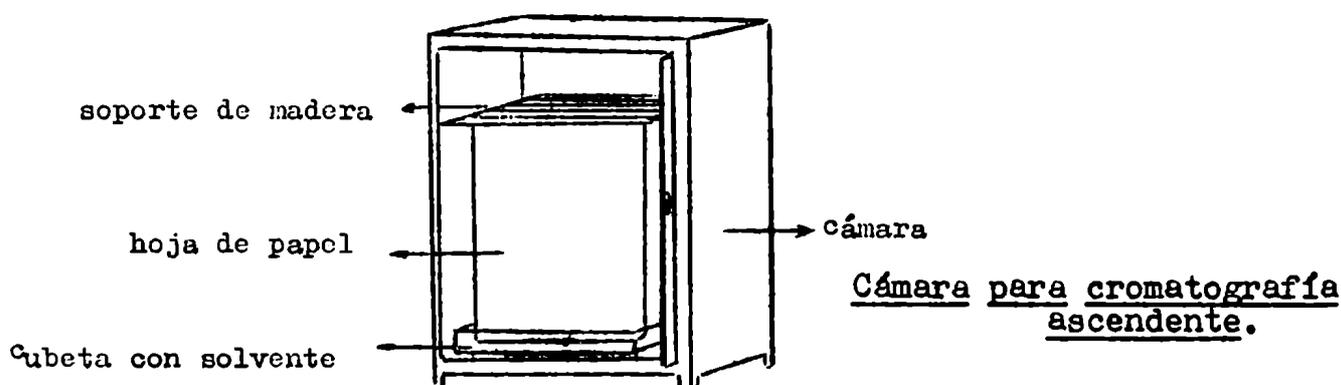


Fig. 7

Se dejó desarrollar durante la noche, y a la mañana siguiente los cromatogramas fueron retirados dejándolos secar al aire; luego se giraron 90° en sentido contrario al movimiento de las agujas de un reloj y se volvieron a introducir en otra cámara cargada con butanol-ácido acético-agua (4:1:5 v/v).-

Antes de usar las cámaras cromatográficas se saturaron durante 48 horas con los vapores del solvente.-

Terminado el segundo desarrollo se dejó secar, y finalmente se sumergieron las hojas en solución de ninhidrina, isatina o aloxano (69).

Después de una cromatografía bidimensional, los componentes de la gota analizada aparecen como manchas circulares o elípticas, distribuidas sobre toda la superficie de la hoja de papel.-

Se determinó la posición característica de cada aminoácido cromatografiando mezclas estándar que contenían un exceso de uno de ellos por vez ( ver págs. 16 y 17). Luego se cromatografiaron los hidrolizados de zeína y de "alfa proteína" de soja.-

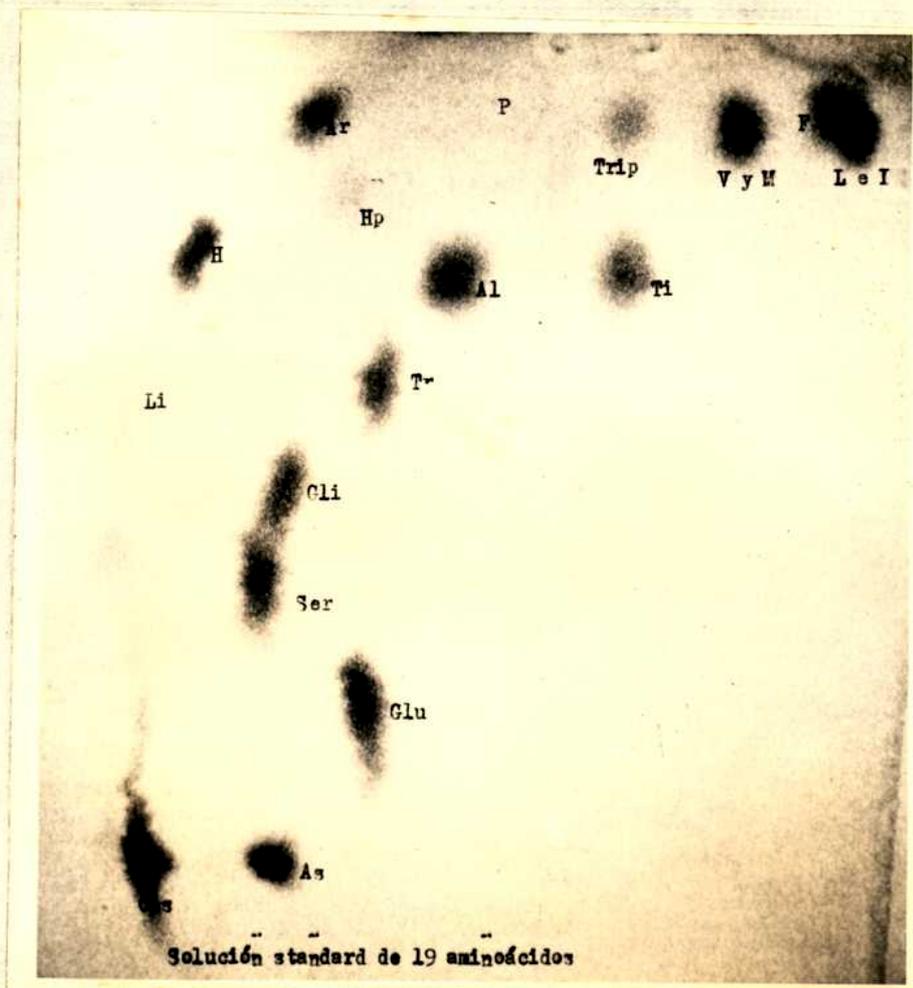


Figura 8

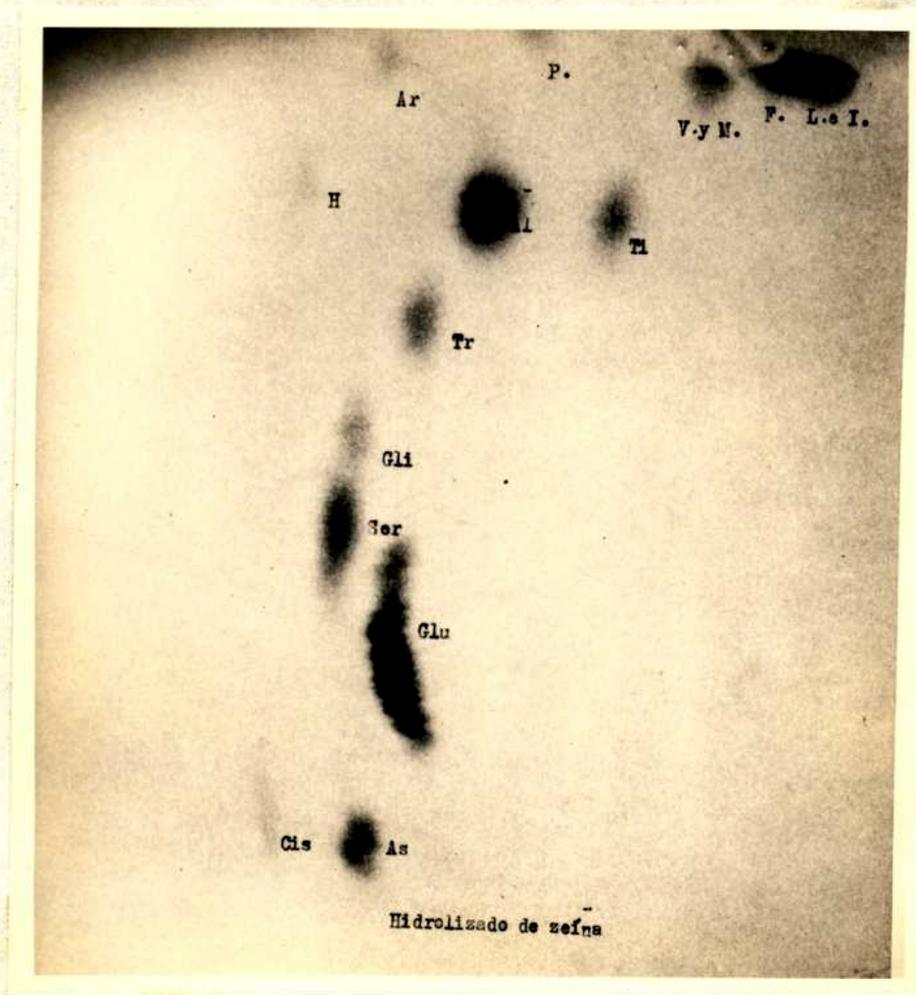


Figura 9

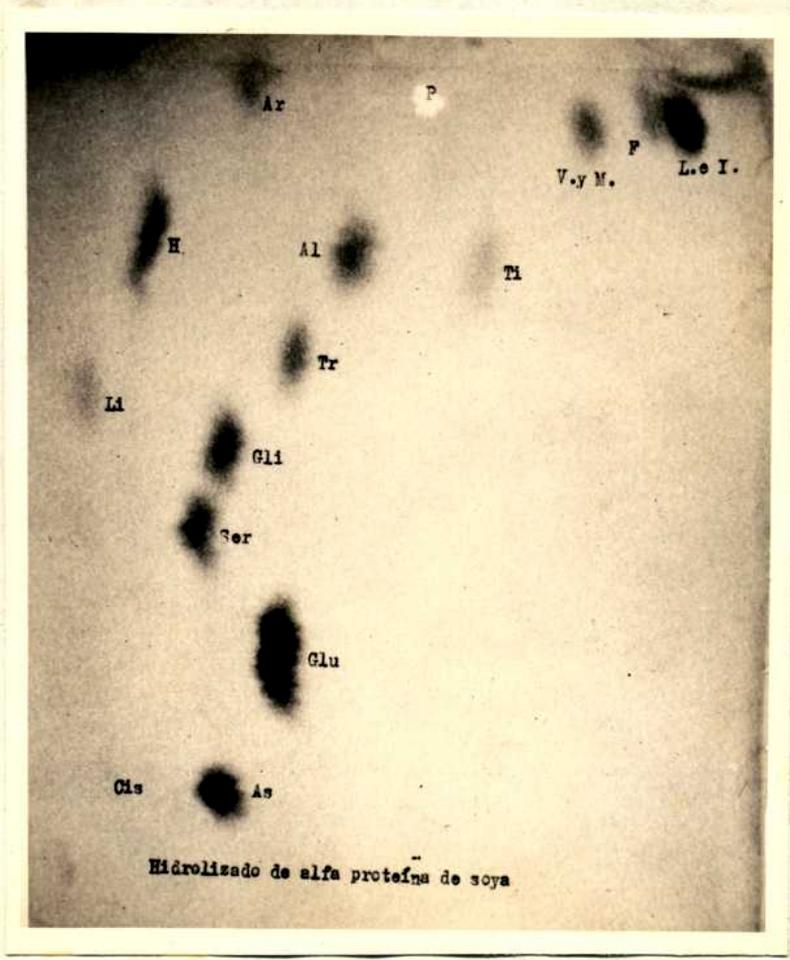


Figura 10

Resultados.

Abreviatura de los aminoácidos.

Al.: alanina	L.: leucina
Ar.: arginina	Li.: lisina
As.: ácido aspártico	M.: metionina
Cis.: cistina	P.: prolina
F.: fenilalanina	Ser.: serina
Gli.: glicocola	Ti.: tirosina
Glu.: ácido glutámico	Tr.: treonina
H.: histidina	Trip.: triptofano
Hp. : hidroxiprolina	V.: valina
I.: isoleucina	

La composición cualitativa de los hidrolizados coincide con las mencionadas en las páginas 21 y 22.-

Se encontró glicocola en el hidrolizado de zeína; este resultado no concuerda con los obtenidos por la mayoría de los autores, por lo que sería interesante realizar investigaciones que permitan confirmarlo o rectificarlo.-

Los pares valina-metionina y leucina-isoleucina no pudieron separarse con los solventes usados.-

Las manchas de prolina e hidroxiprolina no aparecen en las fotografías por que son amarillas.-

Para obtener cromatogramas bien nítidos conviene realizar dos desarrollos con cada solvente.-

Fotografías.- Los papeles coloreados con ninhidrina se colocaron sobre un vidrio esmerilado y se fotografiaron iluminando por detrás.-

Se usaron placas "Lasaf" para reproducción, y el tiempo de exposición fué de 2 segundos.-

Fluorescencia de los aminoácidos sobre el papel.- Los aminoácidos pueden detectarse coloreando los cromatogramas con ninhidrina, isatina, aloxeno u otros reactivos específicos, como así también por su fluorescencia a la luz ultravioleta(74).

La fluorescencia sólo se desarrolla después de calentar el papel a 100°C durante 30 a 60 minutos. Este calentamiento produce la reacción entre los amino grupos libres de los aminoácidos y los grupos aldehíd-

cos libres del papel (75-76).-

Las manchas de triptofano presentan una débil fluorescencia antes del calentamiento.

Comparación entre los valores R<sub>f</sub>. obtenidos con las técnicas monodimensional y circular.-

Estas determinaciones se realizaron sobre papel Whatman No. 1 usando como solvente la mezcla butanol-ácido acético-agua (4:1:5). El tiempo de desarrollo fué de 16 horas tanto en la cromatografía ascendente como en la circular.-

CUADRO X

Aminoácido	Valores R <sub>f</sub> . obtenidos por cromatografía monodimensional ascendente (Promedio de 20 determinaciones).	Valores R <sub>f</sub> . obtenidos por cromatografía circular (R <sub>f</sub> ) (Promedio de 12 determinaciones).
Lisina	0,12	0,35
Histidina	0,13	0,38
Arginina	0,16	0,42
Serina	0,21	0,47
Hidroxiprolina	0,25	0,51
Prolina	0,41	0,64

Se ha encontrado la siguiente relación aproximada:

$$R_f^2(\text{circular}) = R_f(\text{ascendente})$$

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Le Strange y Müller (77) para cobre y bismuto.-

DOSAJE DE ALGUNOS AMINOACIDOS POR CROMATOGRAFIA CUANTITATIVA SOBRE PAPEL.

Se cortaron hojas rectangulares de papel Whatman No. 1 de 26 por 24 cm.

En cada hoja se trazó una paralela a 2 cm de distancia de uno de los bordes de menor longitud; con una jeringa micrométrica "Agla" se depositaron sobre esa línea 6 gotas de distintas diluciones de una misma solución estándar y 3 gotas de la mezcla desconocida.-

Se dejaron 25 mm de distancia entre una y otra gota, y 20 mm entre las gotas extremas y los bordes del papel.-

Las hojas así preparadas se secaron al aire, y luego se colocaron en la cámara cromatográfica (figura 7), con el borde de 24 cm más próximo a las gotas sumergido en la mezcla de butanol-ácido acético-agua (4:1:5 v/v).-

Finalizado el desarrollo ascendente, se sacaron las hojas, se dejaron secar y se sumergieron en el reactivo de coloración.-

No se usó la pulverización de los cromatogramas porque producía coloraciones irregulares.-

Algunos autores (78-79) obtuvieron buenos resultados agregando la ninhidrina al solvente de desarrollo.-

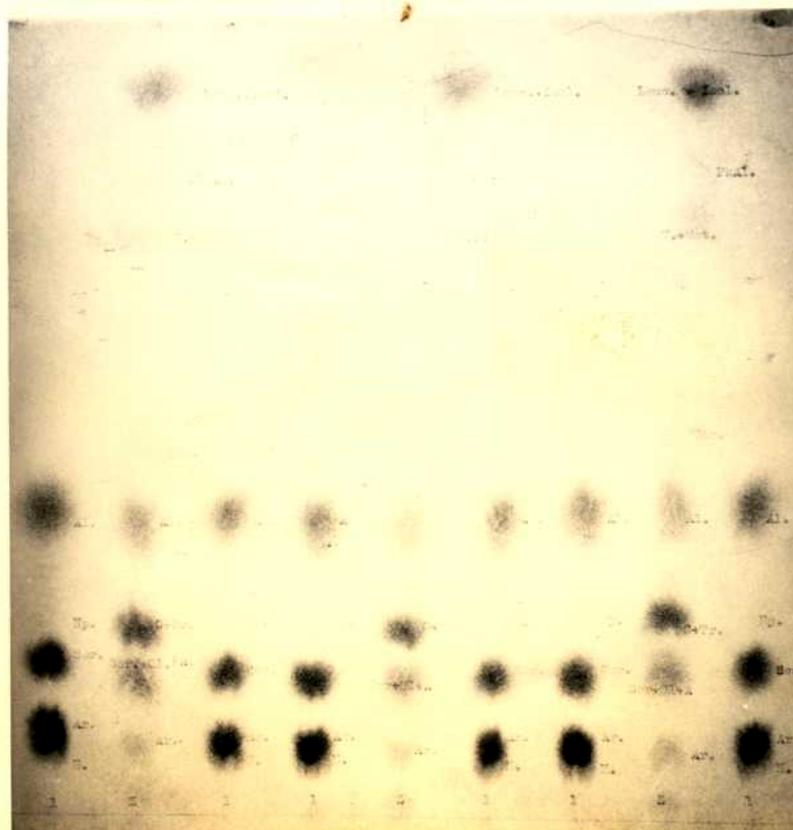


Fig. 11

Cromatograma  
monodimensional  
ascendente.

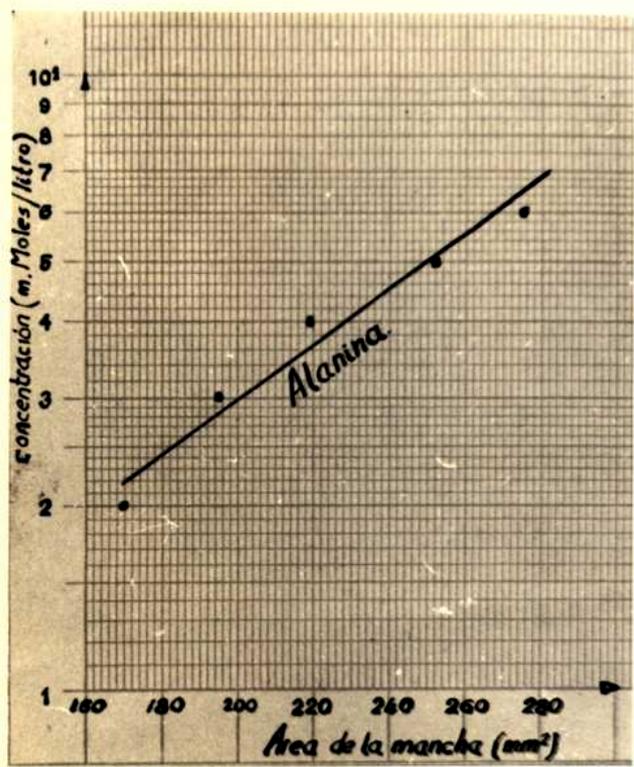


Fig.12

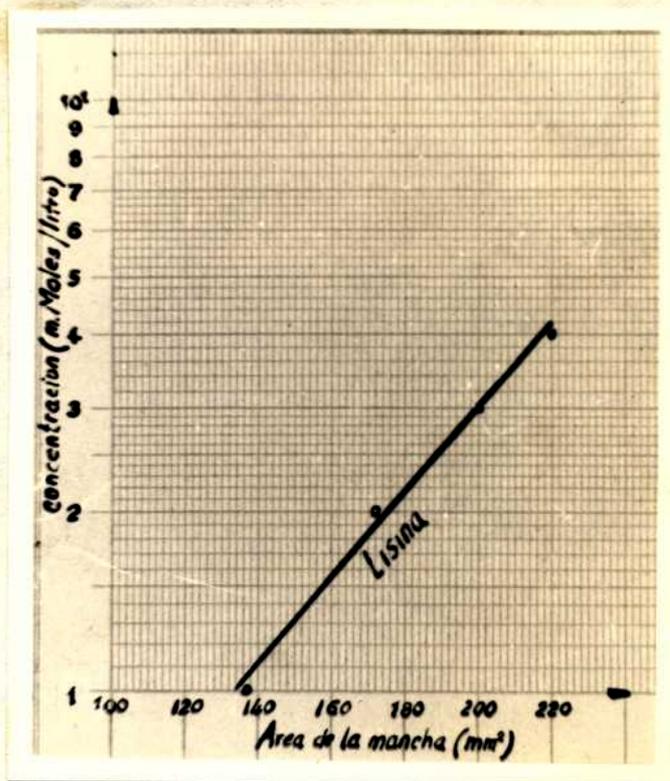


Fig.13

Se probaron varios métodos para valorar las manchas de aminoácidos que aparecían en los cromatogramas coloreados:

1) Determinación del área de las manchas.-

Se cromatografiaron soluciones de varias concentraciones de alanina, y lisina. Se marcó el contorno de las manchas y luego se midió el área de las mismas con un planímetro.-

El área de las manchas resultó sólo aproximadamente proporcional al logaritmo de la cantidad de aminoácido (80) (ver figuras 12 y 13)

2) Método de elución (81-83).-

Después de cromatografiar soluciones de distintas concentraciones de glicocola, treonina y valina, se recortaron las manchas coloreadas y se colocaron cada una en un tubo de ensayo; luego se eluyeron agregando a cada tubo 4 ml de etanol 75 % que contenía 0,2 mgr de  $SO_4Cu \cdot 5H_2O$  (84). Finalmente se determinó la densidad de color de los extractos obtenidos usando un fotocolorímetro "Klett-Summerson" con filtro verde (540 m $\mu$ ).

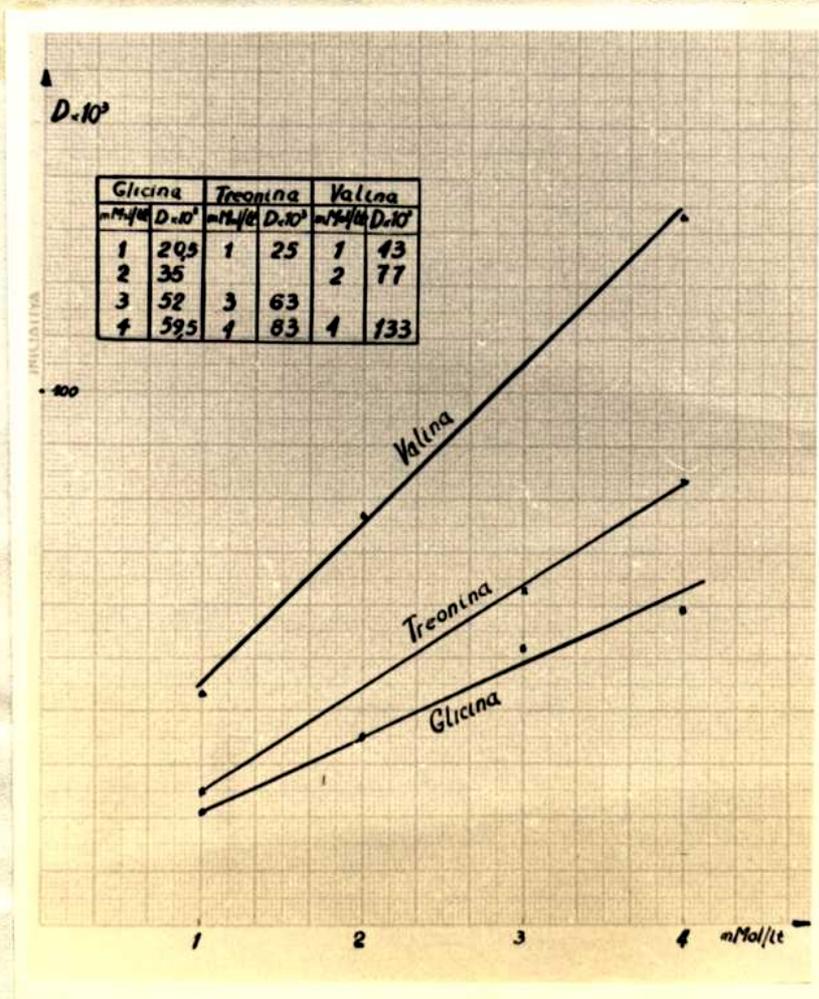


Fig. 14

3) Medida de la densidad total de color (85-86).-

Los cromatogramas coloreados después del desarrollo monodimensional se cortaron en tiras paralelas a la dirección de movimiento del solvente. Cada tira de papel se sumergió en vaselina líquida para aumentar su transparencia y se examinó en intervalos de 5 mm a lo largo de todo el cromatograma, usando un densitómetro de transmisión (87) marca "E.E.L." (Evans Electroselenium Limited) al que se había acoplado en serie un galvanómetro "Norma" con la escala graduada en porcentajes de transmisión.-

Con este método se analizó la solución estándar B de aminoácidos(') los porcentajes de transmisión obtenidos se representaron en un papel semilogarítmico en función de la distancia existente entre uno de los extremos de la tira y la zona que en cada momento enfrentaba la ranura del densitómetro. (figura 15).

En todos los casos se llevó el galvanómetro a la lectura de 100 % de transmisión con una porción no coloreada de la tira.-

Las áreas comprendidas entre la curva y el eje correspondiente al 100 % de transmisión son proporcionales a las concentraciones de los aminoácidos (88-89).-

4) Determinación de la densidad máxima de color.-

Se prepararon soluciones de varias concentraciones de glicocola, arginina, serina y lisina que se sometieron a una cromatografía ascendente.-

Las hojas coloreadas se cortaron en tiras que se sumergieron en vaselina líquida y luego se examinaron con el densitómetro anotando los porcentajes mínimos de transmisión de cada mancha.-

En papel semilogarítmico se representaron las concentraciones de aminoácidos en función de las lecturas del galvanómetro (Las concentraciones expresadas en milimoles por litro se representaron sobre el eje de ordenadas en escala logarítmica, y los porcentajes mínimos de transmisión, sobre el eje de abscisas en escala común; ver figura 16)

Se comprobó como ya lo indicara Block (90), que el mínimo de transmisión de cada mancha (o la densidad máxima de color) es proporcional a la concentración del aminoácido respectivo.-

Este método que fué utilizado por numerosos autores (91-94),

---

(') (ver pág. 15)

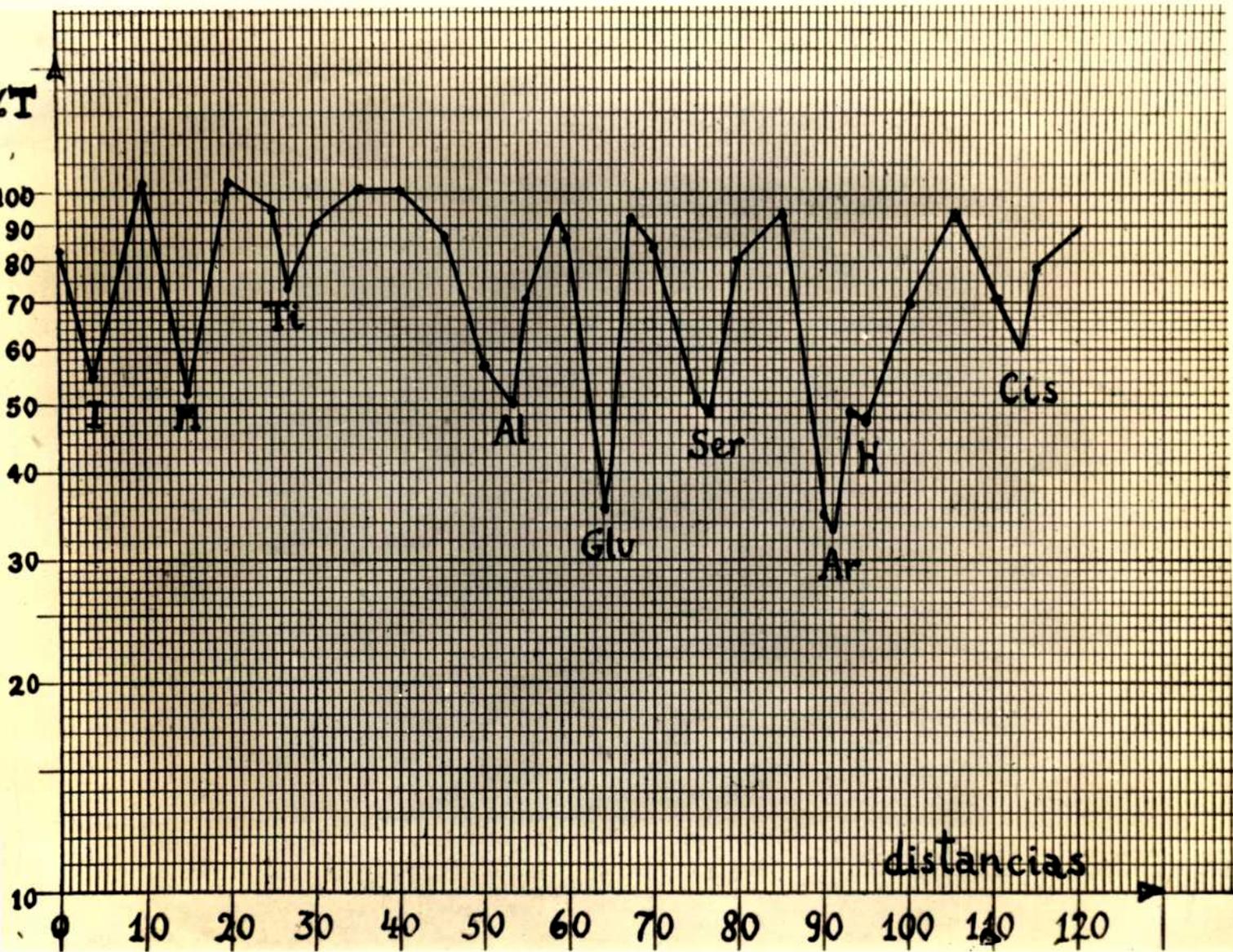


Figura 15

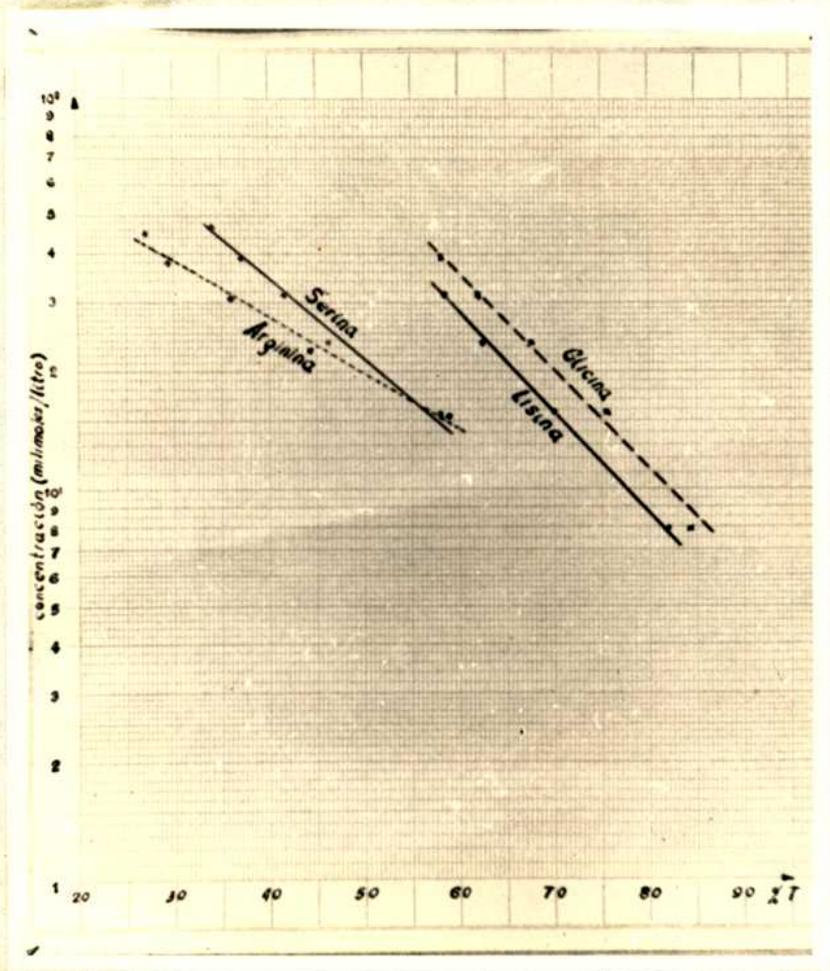


Figura 16

es rápido, sumamente sencillo y da buenos resultados; por estas razones se lo eligió, entre todos los mencionados, para dosar alanina y prolina en los hidrolizados de zeína y de "alfa proteína" de soja.(\*) Se tomaron 10 ml de cada uno de estos hidrolizados (ver pág.14 ), se neutralizaron con NaOH N. y se diluyeron a 25 ml con isopropanol al 10 % en volumen.-

Los aminoácidos puros se secaron en estufa al vacío, y luego se preparó con ellos dos soluciones en alcohol isopropílico al 10 %: una contenía 16 milimoles por litro de alanina "Merck", y la otra 12 milimoles por litro de l-prolina "B.D.H.". Porciones alícuotas de cada una de estas soluciones fueron diluídas al medio, al cuarto, al quinto y al octavo con isopropanol al 10 %.-

#### Resultados.-

Se realizaron cromatografías ascendentes de las soluciones de alanina y de prolina, como así también de los hidrolizados diluídos.-

En todos los casos las gotas analizadas eran de 2  $\mu$  l., y fueron depositadas sobre las hojas de papel con una jeringa micrométrica marca "Agla".-

Los cromatogramas se colorearon con ninhidrina para los dosajes de alanina, o con isatina para las determinaciones de prolina; luego se cortaron en tiras que se sumergieron en vaselina líquida para aumentar la transparencia del papel.-

Todas las tiras se examinaron con el densitómetro determinando los porcentajes mínimos de transmisión de cada mancha.-

---

(\*) El procedimiento basado en la determinación de la cantidad de luz transmitida a través del negativo de las fotografías de los cromatogramas (95), apareció en la literatura cuando ya se había terminado este trabajo.-

CUADRO XI

Concentración de la solución de alanina (milimoles/litro).	Porcentajes mínimos de transmisión (promedios de 6 determinaciones)
16	64,5 %
8	75 "
4	86 "
3,2	90,5 "
2	97 "
Mancha de alanina del hidrolizado de zeína.	87 "
Mancha de alanina del hidrolizado de "alfa proteína" de soja.	95,5 "

CUADRO XII

Concentración de la solución de prolina (milimoles/litro )	Porcentajes mínimos de transmisión (promedios de 4 determinaciones)
12	73,5 %
6	81,5 "
3	89 "
2,4	92,5 "
1,5	98 "
Mancha de prolina del hidrolizado de zeína.	88,5 %
Mancha de prolina del hidrolizado de "alfa proteína" de soja.	94 "

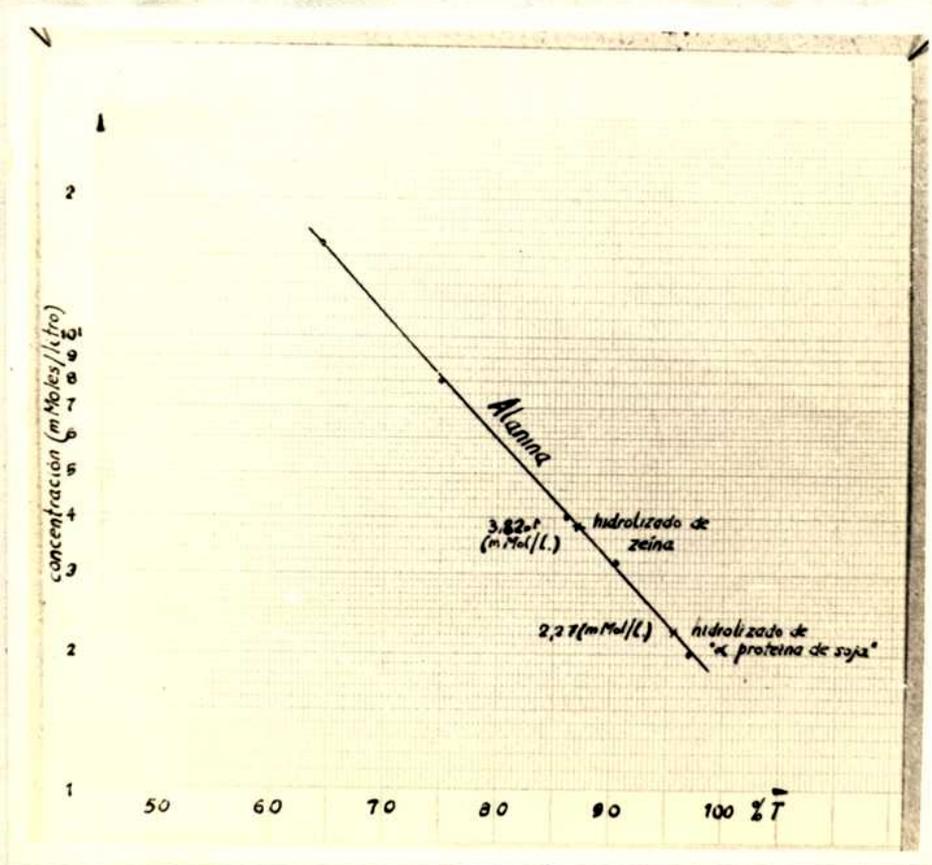


Figura 17

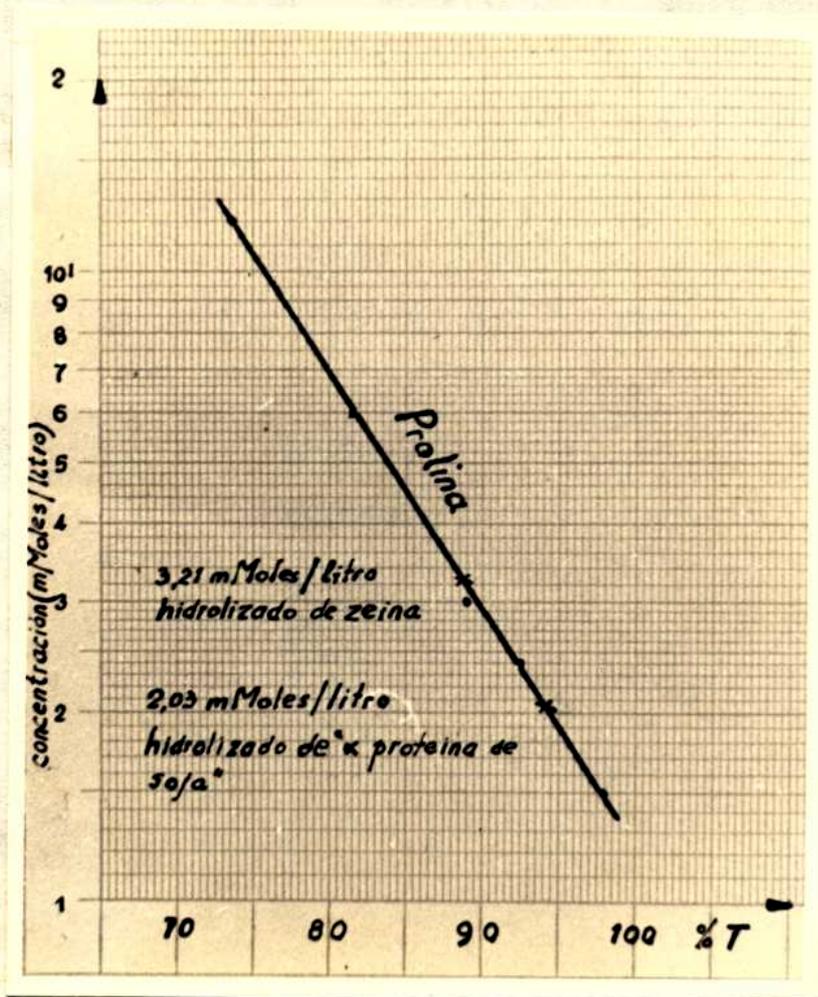


Figura 18

Los porcentajes mínimos de transmisión correspondientes a los cromatogramas de los hidrolizados permitieron calcular las concentraciones de alanina y prolina. Los valores obtenidos fueron los siguientes:

Hidrolizado de zeína

	Gramos de aminoácido por 100 gramos de proteína.	Gramos de aminoácido por 100 gramos de proteína (calculados para un contenido de 16 % de N).
Alanina	9,58	9,5
Prolina	10,44	10,3

Estos resultados son similares a los publicados por Tristram (96).

Hidrolizado de "alfa proteína"  
de soja.

	Gramos de aminoácido por 100 gramos de proteína.	Gramos de aminoácido por 100 gramos de proteína (calculados para un contenido de 16% de N).
Alanina	5,69	5,7
Prolina	6,57	6,6

FRACCIONAMIENTO DE MEZCLAS DE AMINOACIDOS

a) Método de extracción de Dakin (15-17).

Se utilizó el aparato de extracción continua propuesto por Woolley (18) con algunas modificaciones.-

La solución de aminoácidos que debía ser extraída se colocó en un tubo de 28 mm de diámetro y 41 cm de largo que se rellenoó con anillos de vidrio para aumentar la superficie de contacto entre las dos fases.-

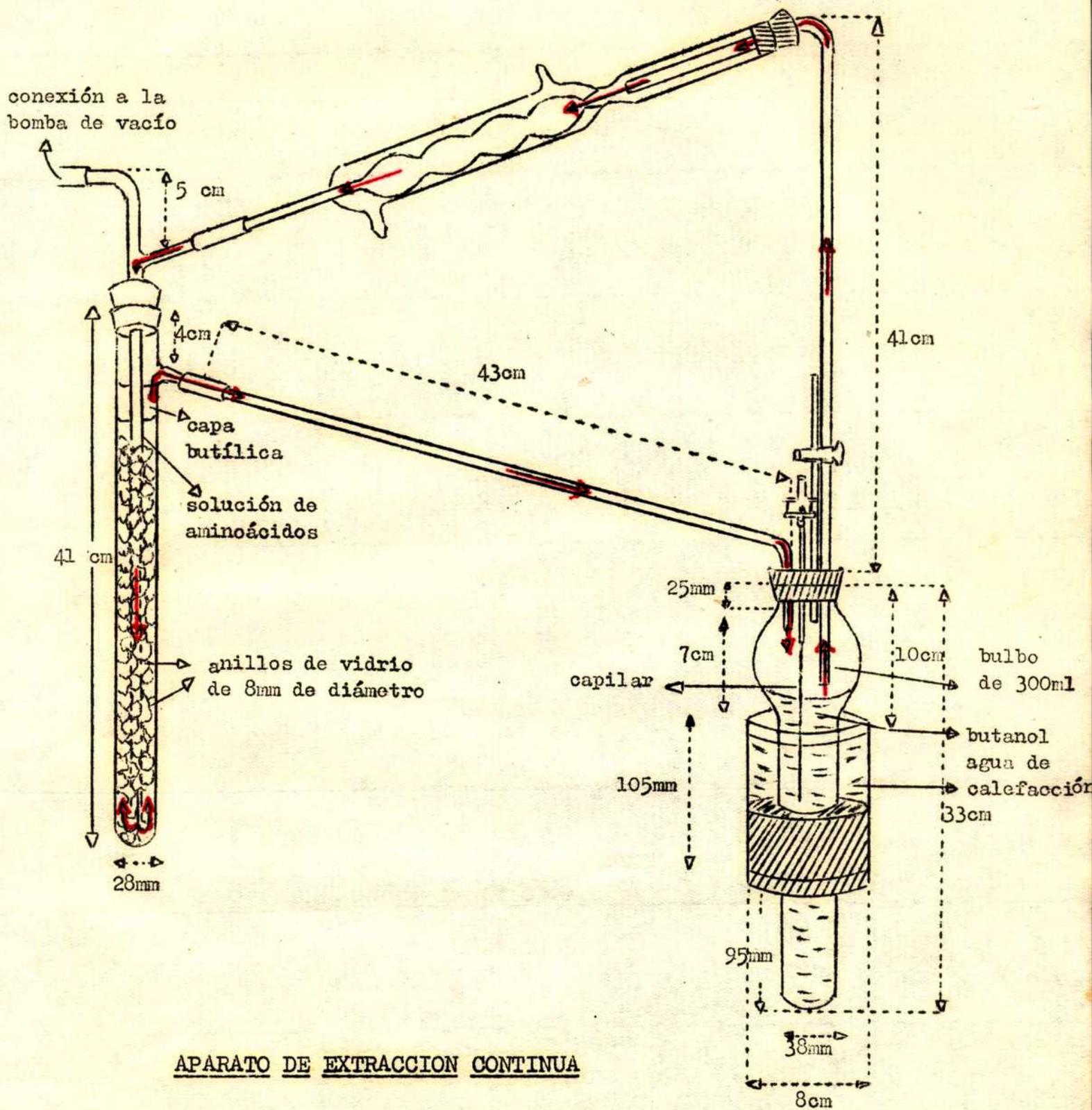
El recipiente que contenía el butanol estaba formado por un bulbo de 300 ml de capacidad y una prolongación tubular de 38 mm de diámetro y 22,5 cm de altura.-

Los monoaminoácidos extraídos cristalizaban en el frasco modificado quedando en el fondo de la parte tubular donde permanecían a temperatura ambiente, con lo que se evitaba la formación de dicetopiperazinas.-

El butanol se mantenía en ebullición calentando la mitad superior de la prolongación tubular. Un capilar que llegaba hasta el fondo de la zona caliente producía la agitación continua del alcohol butílico para evitar cualquier sobrecalentamiento.-

Las flechas rojas de la figura indican el recorrido del butanol dentro del aparato.-

Un hidrolizado neutro de zeína fué extraído durante 48 horas; luego se separaron la capa acuosa y la butílica, y ambas se analizaron separadamente por cromatografía circular sobre papel. En las dos soluciones se



APARATO DE EXTRACCION CONTINUA

Fig. 19

encontraron todos los aminoácidos del hidrolizado.-

Para estudiar este método con más detalle se preparó una solución que contenía prolina, alanina y ácido glutámico. Una porción alícuota de 200 ml fué tratada durante 48 horas en el aparato de extracción continua; otra porción de igual volumen fué extraída durante el mismo tiempo dejándola gotear sobre 2 litros de butanol que se removían continuamente con un agitador eléctrico (97).-

Se realizaron cromatografías cuantitativas sobre papel de todos los extractos obtenidos. De esta manera se pudo calcular que el butanol extrajo el 54,7 % de la alanina cuando se usó el aparato de Woolley modificado, y el 28,6 % cuando se empleó el método de agitación.

Estos resultados confirmaron que el procedimiento de Dakin original o perfeccionado no produce un fraccionamiento cuantitativo, como ya lo habían indicado varios autores (19-21).-

#### b) Electrodiálisis.-

200 gramos de gluten de trigo se hidrolizaron por ebullición a reflujo durante 24 horas con 500 ml de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  8N. Luego se neutralizó hasta pH 5,5 con  $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$  sólido y se filtró para separar el  $\text{SO}_4\text{Ba}$  precipitado. Se lavó varias veces con agua caliente y los líquidos de lavado se agregaron al primer filtrado; finalmente se llevó a un volumen de un litro y se tomaron 250 ml para someterlos a la electrodiálisis.

Descripción del aparato. Se conectaron en serie: una resistencia variable, una cámara de madera de tres compartimientos, una lámpara de 100 watts y un miliamperímetro.-

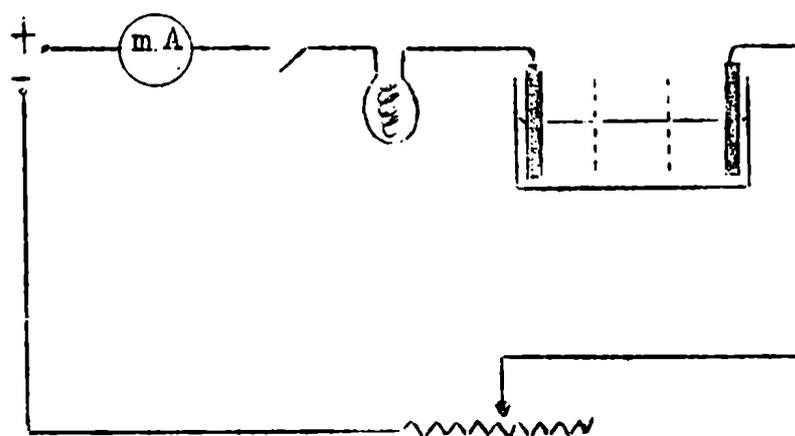


Fig. 20 - Aparato de electrodiálisis

Se usó corriente continua de 220 volts. Los electrodos eran dos placas de grafito de 15 cm de largo, 5 cm de ancho y 6 mm de espesor. La cámara en que se realizó la electrodiálisis se construyó con una caja de madera de 25 cm de largo, 13,5 cm de ancho y 12 cm de altura que se impermeabilizó por dentro con pintura asfáltica; dicha caja se cortó en tres partes que se unieron por medio de dos bisagras como muestra la figura 21.-

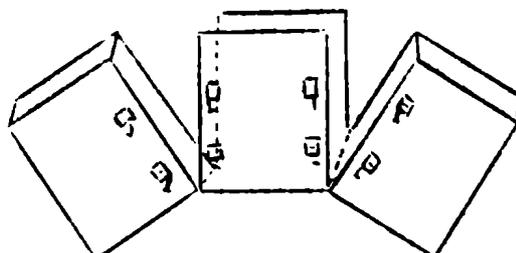


Fig. 21

En los dos espacios que separaban los tres compartimentos se colocaron sendas membranas de celulosa especiales para diálisis.-

Las tres partes se atornillaron lateralmente y la cámara quedó lista para ser utilizada (figura 22).-

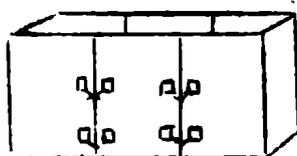


Fig. 22

Resultados.- El hidrolizado se colocó en el compartimento central y los espacios anódico y catódico se llenaron con agua destilada.-

La electrodiálisis se realizó durante 12 horas. Los líquidos obtenidos se analizaron separadamente por cromatografía circular.-

En el líquido anódico se encontró ácido glutámico, ácido aspártico y prolina; en los líquidos central y catódico se hallaron todos los aminoácidos del hidrolizado.-

De esta manera se comprobó que una simple electrodiálisis no es suficiente para separar los tres grupos de aminoácidos; este hecho ya fue observado por otros autores (28, 98 y 99).-

### CONCLUSIONES

1) Los métodos de cromatografía circular y bidimensional permitieron realizar el análisis cualitativo de los hidrolizados de zeína y de "alfa proteína" de soja.-

2) Algunas sustancias que aparecían juntas después de un desarrollo de 16 horas se separaron realizando cromatografías circulares con desarrollo de 80 horas. En estos casos los aminoácidos se caracterizaron por sus respectivos  $R_{\text{alanina}}$ .-

3) Se describió una técnica de desarrollo múltiple en pequeñas cajas de Petri. Este método no requiere ningún aparato especial y da tan buenos resultados como otras cromatografías circulares efectuadas con equipos más costosos.-

4) Se estudió el efecto del envejecimiento del solvente butanol-ácido acético-agua (4:1:5 v/v) sobre los valores  $R_f$  obtenidos, y se demostró que la disminución de los  $R_f$  se debía a la formación de acetato de butilo.-

5) En las cromatografías circulares se utilizó con buen resultado el papel Schleicher y Schüll No. 589, banda azul, que en nuestro país es mucho más común que el Whatman No. 1.-

6) Se comprobó la existencia de una relación entre los valores  $R_f$  obtenidos por cromatografías circular y monodimensional ascendente.-

7) Se probaron varios métodos de cromatografía cuantitativa sobre papel; de todos ellos se eligió el que se basa en la medida de la densidad máxima de color para dosar alanina y prolina en los hidrolizados.-

8) En el procedimiento de electrodiálisis, ésta debe repetirse varias veces para obtener buenas separaciones.-

9) Se confirmó lo expresado por otros autores con respecto al método de extracción de Dakin, que no es adecuado para fraccionamientos cuantitativos aún empleando aparatos perfeccionados.-



## BIBLIOGRAFIA

- 1) Y. Henderson y A.L. Dean "Am.J.Physiol", 9, 386-90 (1903)
- 2) E.G.Willcock y F.G.Hopkins "J.Physiol", 35, 88-102 (1906-1907)
- 3) T.B. Osborne y S.H.Clapp "Am.J.Physiol", 17, 231-65 (1906-1907)
- 4) T.B.Osborne y L.B.Mendel "J.Biol.Chem.", 20, 351-78 (1915)
- 5) W.C.Rose "Science", 86, 298-300 (1937)
- 6) T.B.Osborne "The Vegetable Proteins", (2da. edición,1924)
- 7) T.B.Osborne "Science", 28, 417-27 (1903)
- 8) E.R. Holiday "Biochem.J.", 30, 1795-1803 (1936)
- 9) A.E. Mirsky y M.L.Anson "J.Gen.Physiol", 18, 307-23 (1934-35)
- 10) N.H. Horowitz "J.Biol.Chem", 154, 141-9 (1944)
- 11) R.J. Block "Proc.Soc.Exper.Biol.and Med.", 51, 252-3 (1942)
- 12) K. Bailey, A.C. Chibnall, M.W.Rees y E.F. Williams "Biochem.J.", 37, 360-72 (1943).
- 13) M.Sahyun "Outline of the Aminoacids and Proteins", Cap. IV, pág. 86 (New York, 1944)
- 14) F.W.Foreman "Biochem.J.", 13, 378-97 (1919)
- 15) H.D.Dakin "Biochem.J." , 12, 290 (1918)
- 16) C.L.A. Schmidt "The Chemistry of the Aminoacids and Proteins", pág. 142-6 (1938)
- 17) H.D. Dakin "J.Biol.Chem.", 44, 499 (1920)
- 18) D.W. Woolley "Ind.and Eng.Chem.", Anal. Ed., 9, 433 (1937)
- 19) C.O. Johns y D.B.Jones "J.Biol.Chem.", 44, 283-90 (1920)
- 20) H.O. Calvery "J.Biol.Chem.", 94, 613 (1932)
- 21) J.G. Sharp "Biochem.J.", 33, 679 (1939)
- 22) M.A.B. Brazier "Biochem.J.". 24, 1188-98 (1930)
- 23) A.J.P. Martin y R.L.M. (Synge) "Advances in Protein Chemistry",II, 31 (1945)
- 24) G.L.Foster y C.L.A.Schmidt "J.Biol.Chem.", 56, 545-53 (1923)
- 25) G.J.Cox, H.King, y C.P.Berg "J.Biol.Chem".81, 755 (1929)
- 26) A.A.Albanese "J.Biol.Chem"., 134, 467 (1940)
- 27) R.J.Block y D. Bolling "The Aminoacid Composition of Proteins and Foods", pág. 396, (1951)
- 28) H.T. Macpherson "Biochem.J." , 40, 470-81 (1946)
- 29) R. Consden,A.H. Gordon y A.J.P. Martin "Biochem.J.", 40, 33-41 (1946)

- 30) J. Loiseleur "Techniques de Laboratoire", (Chimie Physique, Chimie Biologique), Cap. XI, 649-53 (París, 1954)
- 31) C. Fromageot, M. Jutisz y E. Lederer, "Biochim. Biophys. Acta", 2, 487 (1948)
- 32) E. Lederer y M. Lederer "Chromatography", Cap. 26, pág. 184 (1955)
- 33) R.K. Cannan "J. Biol. Chem.", 152, 401-10 (1944)
- 34) R.L.M. Synge "Biochem. J.", 33, 1913-18-24-31 (1939)
- 35) A.J.P. Martin y R.L.M. Synge "Biochem. J.", 35, 91 y 1358 (1941)
- 36) A.H. Gordon, A.J.P. Martin y R.L.M. Synge "Biochem. J.", 37, 79 y 313 (1943); 38, 65 (1944)
- 37) R. Consden, A.H. Gordon y A.J.P. Martin "Biochem. J.", 38, 224-32 (1944)
- 38) R.L.M. Synge "Biochem. J.", 38, 285-94 (1945)
- 39) W.H. Stein y S. Moore "J. Biol. Chem.", 176, 337 y 367 (1948); 178, 79 (1949)
- 40) L.C. Craig, W. Hausmann, E.H. Ahrens y E.J. Harfeneist "Anal. Chem.", 23, 1236 y 1326 (1951)
- 41) P. Von Tavel y R. Signer "Advances in Protein Chemistry". Vol. XI, pág. 267 (1956)
- 42) L.C. Craig "J. Biol. Chem.", 155, 519 (1944)
- 43) L.C. Craig y O. Post "Anal. Chem.", 21, 500 (1949)
- 44) M. Bergmann y W.H. Stein "J. Biol. Chem.", 128, 217 y 129, 609 (1939)
- 45) H.R. Ing y M. Bergmann "J. Biol. Chem.", 129, 603 (1939)
- 46) D.G. Doherty, W.H. Stein y M. Bergmann "J. Biol. Chem.", 135, 487 (1940)
- 47) W.H. Stein, S. Moore, G. Stamm, C.Y. Chou y M. Bergmann "J. Biol. Chem.", 143, 121 (1942)
- 48) S. Moore y W.H. Stein "J. Biol. Chem.", 150, 113 (1943)
- 49) D. Rittenberg y G.L. Foster "J. Biol. Chem.", 133, 737-44 (1940)
- 50) H.H. Ussing "Nature", 144, 977 (1939)
- 51) R.K. Cannan, S. Udenfriend y A.S. Keston "J. Am. Chem. Soc.", 68, 1390 (1946)
- 52) A.S. Keston, S. Udenfriend y R.K. Cannan "J. Am. Chem. Soc.", 71, 249-57 (1949)
- 53) E.E. Snell "Advances in Protein Chemistry" Vol. II, pág. 85 (1945)
- 54) K.A. Kuiken, W.H. Norman, C.M. Lyman, F. Hale y L. Blotter "J. Biol. Chem.", 151, 615-26 (1943)

- 55) J.R.Mc.Mahan y E.E. Snell "J.Biol.Chem". 152, 83-95 (1944)
- 56) M.S.Dunn, M.N. Camien, L.B. Rockland, S.Shankman y S.C.Goldberg "J.Biol.Chem"., 155, 591-603 (1944); 156, 715-24 (1944); 159, 653-62 (1945); 161, 643-55 y 669-78 (1945)
- 57) F.J. Ryan y E.Brand "J.Biol.Chem"., 154, 161-75 (1944)
- 58) L.B.Rockland y M.S.Dunn "Arch.Biochem." 11, 541-3 (1946)
- 59) A.Hunter y J.A.Dauphinee "J.Biol.Chem.", 85, 627 (1930)
- 60) E.F.Gale "Biochem.J.", 39, 46-52 (1945) y 41, VII-IX (1947)
- 61) L.Nolem y H.Vickery "Proc.Soc.Exper.Biol.And Med"., 35, 449-51 (1936-1937)
- 62) A.J.Larco "Preparación de zeína del residuo de la elaboración de maíz y obtención de plásticos a partir de la misma", Tesis No. 439 F.C.E.y N, pág. 20 (1946)
- 63) "Methods of Analysis of the A.O.A.C.", pág. 763-5 (1945)
- 64) "Scientific Laboratory Apparatus", Catálogo No. 50, pág. 724,S-50365 (E.H.Sargent and Co, Chicago U.S.A., 1937)
- 65) S.M. Partridge "Biochem.J.", 42, 238 (1948)
- 66) K.V. Giri y N.A.N. Rao "Journal of the Indian Institute of Science", 34, No. 2, 95 (1952)
- 67) A. Saifer e I.Oreskes "Anal.Chem", 25, 1539 (1953)
- 68) I.Oreskes y A. Saifer "Anal.Chem", 27, 854 (1955)
- 69) A. Saifer e I. Oreskes "Anal.Chem", 28, 501 (1956)
- 70) A. Geanes, C.S. Wise y R.J.Dimler", "Anal.Chem.", 23, 415 (1951)
- 71) K.V.Giri y N.A.N.Rao "Nature", 169, 923 (1952)
- 72) K.V.Giri, K.Krishnamurthy y T.A.Venkitasubramanyan "Journal of the Indian Institute of Science", 34, No. 3, 209 (1952)
- 73) R. Conden "British Medical Bulletin", 10, 182 (1954)
- 74) D.M.P. Phillips "Nature", 161, 53 (1948)
- 75) A.R. Patton, E.M. Foreman y P.C.Wilson "Science", 110, 593 (1949)
- 76) E.M. Gal "Science". 111, 677 (1950)
- 77) R.J. Le Strange y R.H. Müller "Anal. Chem", 26, 953-9 (1954)
- 78) D.E. Nicholson "Nature", 163, 954 (1949)
- 79) Sr. H.Ven Horst, V.Jurkovich, e Y. Carstens "Anal.Chem", 29, 788-91, (1957)
- 80) R.B.Fisher, D.S.Parsons y G.A.Morrison "Nature", 161, 764 (1948)
- 81) L. Fowden "Nature", 167, 1030 (1951)
- 82) L.Fowden "Biochem.J.", 48, 327 (1951)

- 83) L.Naftalin "Nature", 161, 763 (1948)
- 84) K.V.Giri, A.N.Radhakrishnan y C.S.Vaidyanathan "Anal.Chem.", 24, 1677 (1952)
- 85) R.J.Block "Science", 108, 608 (1948)
- 86) A.R.Patton y P.Chism "Anal.Chem.", 23, 1683 (1951)
- 87) R.J.Block, E.L. Durrum y G.Zweig "A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis", págs. 43-4 (1955)
- 88) H.B.Bull, J.W.Hahn y V.H.Baptist "J.Am.Chem.Soc.", 71, 550 (1949)
- 89) R.R.Redfield y E.S.G. Barron "Arch.Biochem.Biophys", 35, 443 (1952)
- 90) R.J. Block "Anal. Chem"., 22, 1327 (1950)
- 91) E.F. Mc Farren "Anal. Chem"., 23, 168-74 (1951)
- 92) F.X. Gassner y M.L. Hopwood "Proc.Soc. Exper. Biol. and Med.", 81, 37-43 (1952)
- 93) R.C. Salander, M.Piano, y A.R. Patton "Anal. Chem.", 25, 1252-3 (1953)
- 94) J.F.Roland y A.M. Gross "Anal.Chem.", 26, 502-5 (1954)
- 95) R.Mykolajevycz "Anal.Chem"., 29, 1300 (setiembre de 1957)
- 96) G.R. Tristram "Biochem.J.", 40, 721-33 (1946)
- 97) T.B.Osborne, Ch.S.Leavenworth y L.S.Nolan "J.Biol.Chem.", 61, 309 (1924).
- 98) A.H. Gordon, A.J.P.Martin y R.L.M.Sygne "Biochem.J.", 35, 1369-87 (1941)
- 99) A.H.Gordon "Biochem.J.". 37, 79-102 y 313-18 (1943)

I N D I C E

	<u>pág.</u>
INTRODUCCION . . . . .	1
LAS PROTEINAS VEGETALES . . . . .	1
HIDROLISIS DE PROTEINAS . . . . .	2
METODOS DE FRACCIONAMIENTO DE AMINOACIDOS. . . . .	4
DETERMINACION CUANTITATIVA DE LOS AMINOACIDOS. . . . .	8
 <u>PARTE EXPERIMENTAL</u>	
OBTENCION DE ZEINA . . . . .	12
ANALISIS DE LA ZEINA. . . . .	12
ANALISIS DE "ALFA PROTEINA" DE SOJA . . . . .	13
HIDROLISIS . . . . .	13
CROMATOGRAFIA CUALITATIVA SOBRE PAPEL DE HIDROLIZADOS PROTEICOS. . . . .	15
CROMATOGRAFIA CIRCULAR . . . . .	15
CROMATOGRAFIA CIRCULAR CON DESARROLLO DE 80 HORAS. . . . .	22
TECNICA DE DESARROLLO MULTIPLE . . . . .	23
CROMATOGRAFIA CIRCULAR EN PEQUEÑAS CAJAS DE PEPRI. . . . .	25
CROMATOGRAFIA CON SOLVENTE VIEJO Y CON MEZCLAS DE BUTANOL- ACIDO ACETICO-AGUA- ACETATO DE BUTILO EN DISTINTAS PROPOR- CIONES. . . . .	27
CROMATOGRAFIA BIDIMENSIONAL. . . . .	29
COMPARACION ENTRE LOS VALORES R <sub>F</sub> . OBTENIDOS CON LAS TECNICAS MONODIMENSIONAL Y CIRCULAR . . . . .	32
DOSAJE DE ALGUNOS AMINOACIDOS POR CROMATOGRAFIA CUANTITATIVA SOBRE PAPEL. . . . .	33
FRACCIONAMIENTO DE MEZCLAS DE AMINOACIDOS. . . . .	39
METODO DE EXTRACCION DE DAKIN. . . . .	39
ELECTRODIALISIS . . . . .	40
CONCLUSIONES . . . . .	42
BIBLIOGRAFIA . . . . .	43