

Tesis de Posgrado

Determinación de la composición en aminoácidos de las proteínas de la "Lesonia Fascia" y "Lesonia Flavicans" y sus variaciones estacionales

Palladino, Ana Susana

1963

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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Palladino, Ana Susana. (1963). Determinación de la composición en aminoácidos de las proteínas de la "Lesonia Fascia" y "Lesonia Flavicans" y sus variaciones estacionales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1295_Palladino.pdf

Cita tipo Chicago:

Palladino, Ana Susana. "Determinación de la composición en aminoácidos de las proteínas de la "Lesonia Fascia" y "Lesonia Flavicans" y sus variaciones estacionales". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1963.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1295_Palladino.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Determinación de la composición en aminoácidos
de las proteínas de la "Lesonia Fascia" y "Lesonia Flavicans"
y sus variaciones estacionales

Ana Susana Palladino

1295

R

C. 2.

Resumen presentado para optar al
Título de Doctor en Química

Año 1963

El presente trabajo consiste en utilizar muestras de "Lesonia Fascia" y "Lesonia Flavicans" recogidas en distintos meses del año para poder determinar las variaciones de sus aminoácidos componentes.

Las algas se recogieron en Puerto Doseado y previamente fueron secadas al aire en el lugar de cosecha. Una vez en Buenos Aires se secaron en estufa a baja temperatura (35-40°C), se trituraron en un molino a martillos, se volvieron a secar a 35-40°C en estufa y finalmente se molieron en un pequeño molino a bolas de porcolana.

La parte experimental puede dividirse en tres etapas:

1) Determinación de nitrógeno total:

Se utiliza la técnica de Thompson y Morrison de kjeldhalización y nesslerización.

Se parte de alga seca, sin tratamiento previo y se realiza un micro-kjeldhal teniendo en cuenta la temperatura y las condiciones de la muestra durante la digestión y la alcalinidad antes y después de la nesslerización.

Una vez obtenida una solución ligeramente alcalina se toma de la misma una parte alícuota y sobre olla se realiza la nesslerización. Es importante la preparación y el mantenimiento de la solución del reactivo de Nessler basado en la modificación de Koch y Mc Meekin sobre el reactivo de Folin Nessler.

El color de las muestras se determinó midiendo extinciones en un fotómetro espectral Carl Zeiss, modelo PMQ II. Los valores numéricos están dados por el CUADRO I.

2) Determinación de nitrógeno amínico:

Se trabaja con alga seca y molida, sin tratamiento previo y se hace con hidrólisis ácida y alcalina.

Sobre estos hidrolizados se realiza la titulación iodométrica de las sales de cobre de los aminoácidos según el método de Pope y Stevens puesto a punto por Schroeder, Kay y Mills. Este procedimiento es aplicable a los aminoácidos que forman sales solubles de cobre.

Para solubilizar aquellos aminoácidos que forman una sal de cobre insoluble o parcialmente soluble como la leucina, metionina, fenilalanina y triptofano, se modifica el procedimiento agregando a la solución problema una cantidad conocida de glicina.

La presencia de glicina produce una sal soluble, aparentemente a través de la formación de una sal doble. Aclaremos que la cistina permanece insoluble aún en presencia de glicina.

Los valores numéricos están dados por el CUADRO **II**.

3) Determinación de aminoácidos por cromatografía sobre papel:

Las muestras de algas para realizar la cromatografía se sometieron a hidrólisis ácida y alcalina. A continuación se efectuó el "desalting", consistente en eliminar las sales presentes que interfieren luego en el desarrollo de los cromatogramas.

Se intentó desarrollar cromatogramas ascendentes usando como solvente butanol-ácido acético-agua (40:10:50) y revelando con ninhydrina, pero no se conseguía separar satisfactoriamente las mezclas de aminoácidos.

Se ensayó también la cromatografía bidimensional utilizando como solvente I butanol-ácido acético-agua (40:10:50) y como solvente II fenol-amoniaco-agua preparado de acuerdo a Underwood y Rockland.

Los papeles se desarrollaron hasta 2 cm del borde y se secaron a temperatura ambiente durante más de 24 horas, hecho que reviste suma importancia ya que en caso contrario el fondo se colorea al tratar los papeles con ninhydrina. De todos modos los resultados no fueron satisfactorios.

Se encontró luego que la cromatografía descendente utilizando papel recortado según Matthias era lo más conveniente, ya que la mayoría de los aminoácidos se separaban bien.

El solvente empleado fué butanol-ácido acético-agua (40:10:50). Las manchas se revelaron con una solución de ninhydrina al 0,1 %. En los casos en que debido a la similitud de los Rf se presentaban dudas, se empleó un solvente distinto, etanol al 77 % (v/v) que separó perfectamente los aminoácidos en cuestión. Se empleó también el método descendente, así como la ninhydrina para revelar las manchas.

% NITROGENO TOTAL

	Les. fascia	Les. flavicans
octubre 1953	2,345	2,19
diciembre 1953	1,376	1,55
enero 1954	1,09	-
febrero 1954	-	1,65
marzo 1954	1,218	1,65
abril 1954	-	1,31
mayo 1954	1,45	-
junio 1954	-	1,81
julio 1954	1,50	1,69

CUADRO I

% NITROGENO AMINICO

	LESONIA FASCIA		LESONIA FLAVICANS	
	hidr. ácida	hidr. alc.	hidr. ácida	hidr. alc.
octubre 1953	1,15	1,22	1,08	1,12
diciembre 1953	0,66	0,70	0,75	0,82
enero 1954	0,51	0,54	-	-
febrero 1954	-	-	0,81	0,90
marzo 1954	0,58	0,65	0,78	0,91
abril 1954	-	-	0,60	0,68
mayo 1954	0,71	0,77	-	-
junio 1954	-	-	0,86	0,99
julio 1954	0,74	0,79	0,80	0,92

CUADRO II

VARIACION ESTACIONAL DE AMINOACIDOS EN "LISONIA F. SCLL"

	octubre 1953	diciembre 1953	enero 1954	marzo 1954	mayo 1954	julio 1954
Acido glutámico	+	-	-	+	-	-
² -Alanina	+	+	+	+	+	+
l-Arginina	-	-	-	-	-	-
l-Cistina	-	-	-	-	-	-
Glicina	+	+	+	+	-	+
dl-Histidina	-	+	+	+	-	-
dl-Isolucina	+	-	+	+	-	-
l-Loucina	+	+	+	+	+	-
l-Lisina	-	-	+	-	-	-
Metionina	+	-	+	-	-	+
dl-Serina	-	+	+	+	+	+
l-Tirosina	+	+	+	-	-	-
l-Treonina	+	+	+	+	-	+
dl-Triptofano	+	+	-	+	-	+
dl-Valina	+	+	-	+	+	+

VARIACION ESTACIONAL DE AMINOACIDOS EN "LESONIA FLAVICANS"

	octubre 1953	diciembre 1953	febrero 1954	marzo 1954	abril 1954	junio 1954	Julio 1954
Acido glutámico	-	-	-	-	-	+	-
l-Alanina	+	+	+	+	+	+	+
l-Arginina	-	-	-	+	-	-	-
l-Cistina	-	-	-	-	+	-	-
Glicina	+	+	+	+	-	+	+
dl-Histidina	-	-	-	+	-	-	-
dl-Isolucina	+	+	+	+	+	+	+
l-Leucina	+	+	+	+	+	+	+
l-Lisina	-	-	+	+	-	-	+
Metionina	-	+	+	+	-	+	+
dl-Serina	+	+	+	+	+	+	+
l-Tirosina	+	-	+	+	+	+	+
l-Treonina	+	+	+	+	+	+	+
dl-Triptofano	+	-	-	+	+	-	-
dl-Valina	+	+	-	+	+	-	-



CUADRO IV

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Determinación de la composición en aminoácidos
de las proteínas de la "Lesonia Fascia" y "Lesonia Flavicans"
y sus variaciones estacionales

Ana Susana Palladino

1295

Tesis presentada para optar al
Título de Doctor en Química

Año 1963

Agradezco al padrino de la tesis Dr. Adolfo L. Montos y al Dr. Andrés D. Fortunato, orientador y consejero de la misma en la que volcó, además, sus vastos conocimientos del tema. Hago extensivo, asimismo, al personal de la cátedra de Bromatología y Análisis Industrial por la colaboración prestada durante la realización del presente trabajo.

a mis PADRES

El presente trabajo tiene por objeto la determinación de los amino-ácidos componentes de las "lesonia fascia" y "lesonia flavicans" y su variación estacional.

La variación estacional constituye un elemento de juicio muy importante ya que contrariamente a lo que ocurre con los vegetales terrestres o la parte de los mismos que se consume como alimento, no va acompañada de una correlativa variación de las características físicas de la planta que permite determinar el momento oportuno para su consumo.

Las algas pertenecen al grupo de las TALOFITAS dentro de las cuales forman la sección ALGAE que a su vez comprende varias clases, órdenes y familias (1).

Las algas carecen de raíces, tallos y hojas, es decir no tienen una estructura diferenciada. Su organismo se halla constituido por células con clorofila y otros pigmentos, denominándose TALO al vegetal completo.

Por su pigmentación se las clasifica en algas azules o cianofyceae, rojas o rhodofyceae, verdes o chlorofyceae y pardas o phaeofyceae (2), siendo éstas últimas las más importantes por su desarrollo, abundancia y distribución.

Las algas se distribuyen a lo largo de la costa de los continentes. En nuestro país se encuentran algas en el extenso litoral patagónico, recolectándose principalmente en Puerto Deseado.

Las corrientes marinas, la temperatura mínima media de las aguas superficiales y las condiciones geográficas y climáticas de la zona condicionan el desarrollo de las distintas especies.

LAS ALGAS EN LA ALIMENTACION

Dado el progresivo incremento de la población mundial, sería una solución para la provisión de alimentos en el futuro, la posibilidad de compensar el regimen alimentario humano con sustancias obtenidas a partir de las algas.

La utilización de las mismas como fuente de alimento para el hombre data de épocas antiguas. Sin embargo, nunca este consumo alcanzó elevadas proporciones.

Las algas, como todos los organismos con clorofila, son capaces de producir por su función fotosintética sustancias tales como glúcidos, proteínas, lípidos, vitaminas, etc., mediante la utilización de sales inorgánicas (fosfatos, nitratos, etc.) disueltas en el agua y la energía solar.

Constituyen así una fuente de provisión de sustancias orgánicas, las que al ser consumidas por el zooplancton sirven de alimento a pequeños peces, los cuales son devorados por otros mayores, llegando así indirectamente al hombre.

El Japón es el país donde la explotación de algas marinas ha sido mayor.

También se han realizado investigaciones en lo concerniente al contenido en proteínas y aminoácidos, pudiendo citarse los trabajos de Mitsuho Takagi (3) sobre las proteínas de la "ulva portusa" y el contenido de tirosina, triptofano, treonina, y serina (4) en algas verdes, marrones y rojas (datos a partir de proteína cruda).

La arginina y su extracción como sal de sodio fué objeto de un trabajo de Kikuko Tabei (5).

En la costa de China, Filipinas, Indochina, Hawai e islas del Archipiélago Malayo se utilizan 75 especies de algas que forman parte de la dieta de estas poblaciones.

En la costa noroeste de Europa (Escocia, Islandia, Francia) se con-

sumen diversas especies como ensaladas, sopas o condimentos.

C. Coulson (6) en Escocia realizó también estudios sobre proteínas y aminoácidos en algas marinas, determinando por cromatografía bidimensional (7) los aminoácidos de la *Rhodymenia palmata*, *Laminarias*, etc.

Scott (8) observó la presencia de iodoaminoácidos en algas usando I^{131} .

En América, el consumo directo de algas en la alimentación humana también es reducido. En la costa de California se utilizan fragmentos del talo de un alga parda para la preparación de un producto alimenticio.

En Chile, solamente en la isla de Chiloe se consumen en gran escala, entre otras, la "ulva pertusa", "durvillea antártica", etc.

Smith y Young (9) determinaron la distribución de aminoácidos combinados en plantas enteras de diversas especies de algas marinas por cromatografía cuantitativa, encontrando que *Chondrus crispus* posee el más alto contenido en arginina y ornitina.

También es importante la utilización de algas como alimento de animales terrestres. En las islas Orkney e Iceland las ovejas se alimentan casi exclusivamente de algas marinas y en E.E.U.U. se elaboran productos concentrados con algas pardas para la alimentación de aves de corral y mamíferos domésticos.

Lyman, Kuiken y Hale determinaron los aminoácidos en alimentos de granjas formados por diversos productos, entre ellos algas (10).

En nuestro país se efectuó un trabajo experimental en borregos Corriedale, a los que se les incorporaba como suplemento en la alimentación el "cachiyuyo", nombre vulgar de la "*macrocystis pyrifera*", alga parda que crece en el litoral patagónico (11).

Houdley, Ing y Krauss (12) determinaron un mayor crecimiento en ratas debido a la lisina y treonina en las algas incorporadas a su dieta. Encontraron, por ejemplo, que la "*chlorolla pyronoidosa*" posee mayor cantidad de esos aminoácidos que la proteína de la soya purificada.

También pueden utilizarse algas como fertilizantes; su contenido en nitrógeno, potasio y fósforo las capacita para ello.

En E.E.U.U., en la costa de California, se desarrolló una industria de abonos usando algas gigantes del Pacífico; así se ayudó a solucionar

el problema de la escasez de fertilizantes potásicos durante las dos guerras mundiales.

Otro uso interesante de las algas es la obtención de ácido algínico, un ficocoloide que parece existir exclusivamente en las algas pardas.

En sucesivas publicaciones varios autores demostraron que se trata de un polímero del ácido manurónico (13) (14). Gracias a su estado coloidal los alginatos solubles (de metales alcalinos y de magnesio) actúan como emulsificantes, estabilizantes, coloides protectores y humectantes.

En la industria de la alimentación se han encontrado numerosos usos a los alginatos, como por ejemplo, formación de películas protectoras para la conservación de frutas, verduras, carnes y fiambres (sustitutos de tripas para embutidos); aglomerantes de carne picada o carne sintética a partir de proteínas vegetales; estabilizante de productos lácteos; coloide protector en la formación de helados; preparación de hilos para liar y comprimir fiambres y embutidos. A este respecto existen numerosas patentes de diversos países.

PARTE EXPERIMENTAL

Se utilizaron muestras de las algas "lesonia fascia" y "lesonia flavicans", recogidas en distintos meses del año para determinar sus variaciones estacionales.

Las algas se secaron al aire en el lugar de cosecha y enviaron a Buenos Aires. Aquí se secaron en estufa a baja temperatura (35-40°C), luego se trituraron en un molino a martillos y volvieron a secarse en estufa a 35-40°C. Finalmente el material así tratado se molió en un pequeño molino a bolas de porcelana.

Los inconvenientes que se presentan en el estudio de los aminoácidos en las algas marinas obedecen a la gran cantidad de hidratos de carbono y sales minerales que contienen en relación a su bajo contenido de nitrógeno.

En primer lugar se determinó el nitrógeno total por medio de la kjeldahlización, tal como lo recomiendan Thompson y Morrison (15).

A continuación se determinó el nitrógeno amínico utilizando el método de Schroeder, Kay y Mills (16) que consiste en la determinación cuantitativa de los aminoácidos por titulación iodométrica de sus sales de cobre.

Su técnica está basada en los trabajos de Pope y Stevens (17), quienes indican que en la mayoría de los casos dos moléculas de un aminoácido reaccionan estequiométricamente con un ion cúprico para formar una sal azul de cobre.

En el método original de Pope y Stevens se usaba cloruro cúprico (0,16 M), fosfato trisódico, solución buffer de bórax, suspensión de fosfato cúprico, gmelftalcína, tiosulfato de sodio, solución standard de iodato de potasio y almidón.

Cada una de las muestras fué sometida a una hidrólisis ácida y otra alcalina, para luego realizar la determinación del nitrógeno amínico.

Las muestras para llevar a cabo la cromatografía sobre papel también se sometieron a hidrólisis ácida y alcalina, pero posteriormente se les hizo un tratamiento adecuado para eliminar las sales que interferirían luego en el desarrollo de los cromatogramas. Este "desalting" se hizo siguiendo la técnica de Block (18).

Se comenzó a hacer cromatografía ascendente usando como solvente butanol-ácido acético-agua, pero los distintos aminoácidos no se separaban bien (19).

También se trató de hacer cromatografía bidimensional usando como solvente I butanol-ácido acético-agua y como solvente II fenol-amoníaco-agua (20) pero no dió resultados satisfactorios.

Se encontró en cambio que la cromatografía descendente utilizando papel recortado convenía más, ya que se separaron la casi totalidad de los aminoácidos. El solvente empleado fué butanol-ácido acético-agua.

Aquellos aminoácidos cuyos Rf eran similares y ocasionaban dudas pudieron resolverse por medio de la cromatografía descendente, pero utilizando como solvente etanol al 77 % (21).

DETERMINACION DE NITROGENO TOTAL

Se sigue la técnica recomendada por Thompson y Morrison (15) para determinar nitrógeno en vegetales.

Se pesaron 100 ó 200 mg de alga seca tal cual, sin tratamiento alguno y se colocaron en un pequeño Kjeldhal; se agregó entonces 5 ó 10 ml (según la cantidad pesada) de ácido sulfúrico 3 N. El balón se colocó a llama viva en ángulo de 45° y se calentó hasta que el volumen se redujo aproximadamente a 1 ml.

Cuando el volumen es menor de 1 ml y aparecen tenues humos blancos comienza la digestión de la muestra. Durante la misma, la llama se redujo de tal modo que el ácido sulfúrico se condensó en el bulbo del Kjeldhal.

Se calentó la muestra 10 minutos bajo esas condiciones y se enfrió

luego a temperatura ambiente. Se agregaron dos gotas de agua oxigenada al 30 % y se calentó 2 minutos como antes. Como la muestra no se aclaró se siguieron agregando porciones de 2 gotas de agua oxigenada a la muestra enfriada y se calentó sucesivamente hasta que la muestra se aclaró (las gotas agregadas oscilan para las distintas muestras de algas de 10 a 24 gotas).

Cuando la muestra estuvo clara y fría se diluyó con agua (6 a 7 ml) y se agregó hidróxido de sodio al 5 % hasta neutralizar la solución.

Una precaución importante es la de no excederse en el agregado de hidróxido de sodio, ya que más de 1 ml en exceso causa turbidez cuando la solución se trata con el reactivo de Nessler. La solución alcalina se llovó entonces a volumen (25 ml).

El método original indica que se deben tomar de esa solución 20 ml para la nesslerización, pero se encontró que resultaban así muy concentradas y que esto ocasiona una turbidez al agregar el reactivo de Nessler. Para poder hacer lecturas adecuadas en el espectrofotómetro utilizado debieron hacerse diluciones a partir de la solución de 25 ml, que variaron según los casos, y luego, de allí se tomaron los 20 ml necesarios para la nesslerización.

Nesslerización

Los 20 ml de la solución colocados en un tubo testigo de 50 ml se llevan a baño de agua a 20°C. Se burbujea aire a través pero no muy rápidamente. Luego se hace correr 1 ml de solución Nessler preparada según (15) por el costado del tubo, seguido de 5 ml de hidróxido de sodio al 5 %.

La corriente de aire se elimina. No es necesario que la solución nesslerizada permanezca a 20°C luego de la adición de la base.

El color se determinó exactamente 20 minutos después del agregado del hidróxido de sodio, utilizando un espectrofotómetro Carl Zeiss modelo PMQ II. En todas las determinaciones se usaron cubas de 1 cm y filtro 440.

Los blancos y los standards se hacen con el mismo procedimiento. Como el color de las muestras no cumple la Ley de Beer, se hizo una cur-

va con standards de sulfato de amonio, y de allí se extrapolaron los valores que se obtenían para cada lectura de las muestras problemas.

Las variables más importantes que deben tenerse en cuenta en este método son: la preparación y mantenimiento de la solución del reactivo de Nessler (22) (23) (24); Las condiciones durante la digestión de la muestra (22) (25) (26); la temperatura de la muestra durante la nesslerización (25) (26); la alcalinidad de las muestras antes y después de la nesslerización (22) (23) (24) (27).

Esta técnica no ofrece las dificultades halladas por Channing y Young (28) (29) para determinar nitrógeno en algas.

Los valores obtenidos en la determinación de nitrógeno total fueron confirmados por el método del micro Kjoldhal, según A.O.A.C. en su sexta edición del año 1945, página 763. Se dan a continuación algunos valores:

enero	1954	: 1,11 %
mayo	1954	: 1,46 %
junio	1954	: 1,80 %

Compárense estos resultados con los que figuran en el cuadro I.

DETERMINACION DE NITROGENO AMINICO

Se realizó mediante la titulación iodométrica de las sales de cobre de los aminoácidos, según el método de Pope y Stevens (17) puesto a punto por Schroeder, Kay y Mills (16). Es un procedimiento aplicable a los aminoácidos que forman sales solubles de cobre.

Se comienza por hacer una hidrólisis ácida y otra alcalina sobre las muestras de algas secas y molidas, sin tratamiento previo.

Se pesa 1 gramo de alga en todos los casos y se trata con 10 ml de ácido clorhídrico 6 N ó 10 ml de hidróxido de bario al 14 %, según el caso (30). La ampolla, evacuada de aire, se cerró a la llama y se hizo la hidrólisis en estufa a 110°C durante 24 horas.

Se dejan enfriar a temperatura ambiente y se sumergen luego en un baño de hielo y sal para evitar que estallen al romperlas.

El contenido se filtró obteniendo un líquido amarillo pajizo en las

alcalinas y otro color caramelo en las ácidas. Ambos hidrolizados se neutralizaron usando timolftaloína como indicador é hidróxido de sodio al 30 % ó ácido clorhídrico 6 N según el caso.

Ya neutralizados es necesario centrifugar los hidrolizados tanto ácidos como alcalinos; los residuos se lavaron dos veces con agua destilada caliente. El líquido sobrenadante y aquellos provenientes de los lavados se llevaron a volumen en matraz aforado de 25 ml.

Se toma una parte alícuota de la misma (2,5 ml) y se agregan 2,5 ml de glicina 0,04 M y 5 ml de una suspensión de fosfato cúprico lavado, preparado según Schroeder, Kay y Mills (16). Todo esto se coloca en un tubo de centrífuga de 15 ml.

La presencia de glicina es necesaria porque produce una sal soluble aparentemente a través de la formación de una sal doble.

Aminoácidos como leucina, metionina, fenilalanina y triptofano forman una sal de cobre insoluble o parcialmente insoluble; por lo tanto, para obtener una sal soluble es necesario modificar el procedimiento agregando a la solución problema una cantidad conocida de glicina.

Aclararemos que la cistina permanece insoluble aún en presencia de glicina.

Si solamente encontráramos en solución aminoácidos capaces de dar una sal soluble de cobre, tomaríamos 5 ml de la suspensión de fosfato cúprico lavado y 5 ml de la solución problema que se colocarían en un tubo de centrífuga de 15 ml, siguiendo luego la técnica habitual.

Según los autores el tiempo recomendado que debo mediar entre la mezcla de reactivos y la centrifugación del exceso de fosfato cúprico es de 5 minutos. En este lapso la mezcla se agita ocasionalmente. Se centrifuga entonces 5 minutos y del líquido sobrenadante se pipotean 7 ml en una solución de 5 gramos de ioduro de potasio en 32 ml de solución de ácido acético preparada según (16), la cual ha sido titulada libre de trazas de iodo, y el iodo resultante se tituló con tiosulfato de sodio 0,005 N preparado y standardizado según (16), usando almidón como indicador.

La cantidad de cobre en solución hallada agregando glicina se sus-

trae al cobre total en solución y así se determina la cantidad de cobre que se ha combinado estequiométricamente tanto con los aminoácidos solubles como con los insolubles.

DETERMINACION DE AMINOACIDOS POR CROMATOGRAFIA SOBRE PAPEL

Las muestras de algas secas y molidas se sometieron a una hidrólisis ácida y otra alcalina, tal como lo recomiendan Cramer (30) y Zahn (31).

Las hidrólisis se llevaron a cabo en una ampolla evacuada de aire y cerrada a la llama.

Se utilizaron 1 gramo de alga y 10 ml de ácido clorhídrico 6 N para la hidrólisis ácida y 1 gramo de alga y 10 ml de hidróxido de bario al 14 % para la alcalina.

Las ampollas se cerraron y se realizó la hidrólisis en estufa a 110°C durante 24 horas. Luego de transcurrido ese tiempo se dejaron enfriar lentamente y se sumergieron en baño con hielo y sal para evitar que estallen al abrirlas. Se filtraron y se llevaron a volumen en matraces aforados de 25 ml.

Una vez obtenidos estos hidrolizados se buscó un método de "desalting" que resultara eficaz y que eliminara las sales que interferirían luego.

Se adoptó la técnica que recomienda Block (32) ampliada por el trabajo de Lissitzky (33). Consiste en embeber un trozo de papel de filtro con 1 ml de muestra, secar en corriente de aire caliente y volver a colocar 1 ml de muestra, secando nuevamente. Se repite según los mililitros de sustancia problema que se quieran incorporar.

Una vez seco el papel se recorta en trozos pequeños y se hace la extracción de los lípidos con dicloroetano caliente. Esta extracción conviene hacerla unas tres veces. Se dejó secar a temperatura ambiente.

Una vez libre de grasas los trozos de papel se ponen en contacto con acetona que contenga 1 % de ácido clorhídrico (20 ml de acetona por cada mililitro de solución problema).

Se dejan los papeles una hora y el extracto acetónico se destila al

vacío hasta sequedad. El residuo se toma entonces con 1 ml de isopropanol al 10 %.

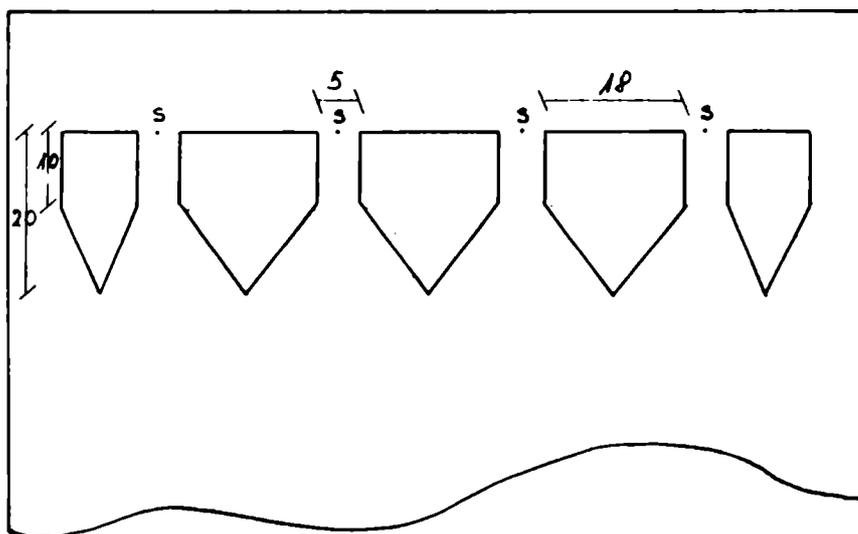
De esta manera se tienen las muestras listas para realizar su cromatografía.

Si bien la cromatografía ascendente utilizando butanol-ácido acético-agua (40:10:50) (12) dió algunos resultados, las mezclas de aminoácidos no se separaban bien.

Tampoco la cromatografía bidimensional resultó beneficiosa. Se usaba como solvente I butanol-ácido acético-agua (40:10:50) y como solvente II amoníaco-fenol-agua, preparado según Underwood y Rockland (20). Los papeles se desarrollaron hasta 2 cm del borde y se secaron a temperatura ambiente durante más de 24 horas, hecho sumamente importante (34) ya que en caso contrario el fondo se colorea al tratar el papel con ninhydrina. De esta manera se elimina también el amoníaco, ya que su presencia puede conducir a graves errores pues tanto los hidratos de carbono como el ácido ascórbico producen con la ninhydrina en presencia de amoníaco manchas similares a las de los aminoácidos (35).

Por lo tanto se hizo cromatografía descendente utilizando papel recortado según Matthias (36).

Se cortaron tiras de papel Whatman N° 1 de 11x46 cm y el recorte se hizo de la siguiente forma:



Las manchas se aplican en los puntos S con micropipetas teniendo en cuenta las precauciones siguientes:

Para que la mancha tenga el menor diámetro posible la solución debe secarse en el momento de fluir en el papel, ya sea con una corriente de aire caliente o con una lámpara de rayos infrarrojos (37).

El papel de filtro debe colocarse sobre un vidrio bien limpio para que la pérdida de material sea mínima, ya que cualquier solución que alcance el vidrio se reabsorbe inmediatamente en el papel.

El solvente utilizado fué butanol-ácido acético-agua (40:10:50), mezcla que debe prepararse con frecuencia ya que el butanol y el ácido acético se esterifican en unas pocas semanas (38).

Antes de utilizar la cámara conviene saturarla. El método más común para saturar con respecto al solvente o mezcla de ellos es colocar una pequeña vasija conteniendo el solvente a ser usado en la parte inferior de la cámara (39). En este caso se colocaron 250 ml del solvente en la parte inferior de la cámara y 70-80 ml en la vasija superior. El volumen de la cámara era de 14 dm³.

La temperatura a la cual se hizo la corrida influye también sobre los Rf (39).

Otro factor que concierne a los Rf es la medida de la cámara, ya que los afecta. Se ha encontrado que de la medida de la cámara depende el volumen crítico del solvente. Por encima del volumen crítico del solvente los valores de los Rf están al mínimo, aunque el volumen del solvente esté aumentado. Por debajo del volumen crítico del solvente los valores de los Rf están al máximo.

Se recomienda permanecer por encima del volumen crítico del solvente para tener valores constantes del Rf, pues por debajo del máximo volumen crítico ocurre una vaporización: el solvente se enriquece en agua y de aquí que los valores del Rf de los aminoácidos solubles en agua tiendan a aumentar (39).

El trabajo consistió en tomar una serie de aminoácidos puros y preparar soluciones patrones para obtener Rf reproducibles. Las soluciones, todas de concentración 10 μ M, se prepararon según la técnica que aconse-

ja Block (40), es decir, disolviendo un peso determinado de aminoácido en agua caliente y agregando ácido clorhídrico gota a gota (6 N) hasta total disolución. Se agrega luego alcohol isopropílico y se lleva a volumen.

Los aminoácidos utilizados fueron: ácido glutámico; β -alanina; l-arginina; l-cistina; glicina; dl-histidina; dl-isoleucina; l-leucina; l-lisina; metionina; dl-oxiprolina; l-prolina; α -sorina; l-tirosina; l-treonina; dl-triptofano; dl-valina.

Una vez preparadas estas soluciones se hicieron cromatogramas descendentes, colocando dos manchas por cada uno (se coloca una mancha, se seca y se coloca otra). Se dejaron correr durante 24 horas, pero se observó que los mejores resultados se obtenían dejando secar luego de transcurrido ese tiempo y volviendo a hacerse correr otras 24 horas.

Se sacan entonces los papelos, se secan al calor y se pulverizan con ninhydrina (41) preparada según Block, ya que se comprobó que con ella se revelan perfectamente todos los aminoácidos a excepción de prolina y oxiprolina; para los que adoptó otra forma de revelarlos según aconseja Block (42) y es la siguiente:

Para prolina se pulveriza el cromatograma con isatina al 0,2 % en acetona. Se seca al aire y se pone 10 minutos en estufa a 70-76°C saturada con vapor de agua. Luego de identificar la mancha correspondiente a prolina se sigue el método que nos revelará la presencia de hidroxiprolina, es decir, se pulveriza la hoja ya revelada con isatina con una solución recientemente preparada de 1 gramo de p-dimetilaminobenzaldehído, 90 ml de acetona y 10 ml de ácido clorhídrico concentrado; secar al aire 30 minutos e identificar hidroxiprolina.

Una vez que se identificaron todos los aminoácidos se determinó no ya el Rf de los mismos teniendo en cuenta la distancia recorrida por el frente del solvente y la distancia recorrida por la sustancia problema, sino refiriéndolos a un aminoácido que en el futuro sirviera como término de comparación para todos los demás.

Se eligió la alanina por poseer un Rf conveniente y por lo tanto se determinaron los Ra, es decir, se tomó la distancia recorrida por la sustancia y la que recorre la alanina.

Esta manera es más beneficiosa, ya que la velocidad con que corre el

solvente y el tiempo en más o en menos que pudieron dejarse los cromatogramas no afecta sobre los resultados.

Se procedió luego a colocar mezclas de aminoácidos puros, se llevó a cabo su identificación, etc., hasta que finalmente se hicieron corridas con las sustancias problemas de las muestras de las algas.

Por cada hoja de papel se colocaron en todos los casos las dos manchas de alanina.

La cantidad de manchas de sustancia problema colocadas variaron según la concentración de las mismas, pero en la mayoría se colocaron 10 manchas por cada una, teniendo siempre la precaución de secar bien la mancha entre una y otra aplicación.

Un detalle que debe tenerse en cuenta es que los cromatogramas deben ponerse a correr inmediatamente después de haberse aplicado las manchas, ya que una demora de, por ejemplo, 12 horas produce probablemente una evaporación del isopropanol y, por lo tanto, las manchas que aparecen luego del revelado son muy débiles y aún no aparecen en todos los casos.

Con la ninhidrina debe tenerse la precaución de usarla recién preparada; ya pasados algunos días de la preparación las manchas pierden intensidad de color al ser reveladas.

Los resultados obtenidos de esta manera fueron satisfactorios (ver fotografías 1 y 2) y los aminoácidos componentes de las muestras problemas pudieron identificarse casi totalmente.

Pero en los casos en que los R_f eran similares (ver CUADRO III) y ofrecían dudas las manchas aparecidas (ácido glutámico-treonina; valina-metionina; histidina-arginina; glicina-serina), se debió emplear otro solvente que lograra separarlos.

Se usó entonces etanol al 77 % según aconseja Block (21) y los cromatogramas se hicieron con igual método de los anteriores, es decir, se utilizan los aminoácidos puros como patrones, la alanina como referencia y la cantidad de manchas colocadas fué la misma. Las fotografías 3 y 4 ilustran los resultados de este procedimiento.

Aquí se encontró que el tiempo óptimo de corrida era de 18 horas, ya que tiempos mayores producían corridas excesivas y los resultados no

eran reproducibles. Como revelador se usó también la solución de ninhidrina preparada según Block (41).

En el CUADRO IV están resumidos los aminoácidos provenientes de la hidrólisis ácida y de la alcalina de la "lesonia fascia" y en el CUADRO V los de la "lesonia flavicans".

Es sumamente importante aclarar este punto pues algunos aminoácidos son destruidos en el proceso de hidrólisis ácida y otros en el de hidrólisis alcalina.

% NITROGENO TOTAL

	Les. fascia	Les. flavicans
octubre 1953	2,345	2,19
diciembre 1953	1,376	1,55
enero 1954	1,09	-
febrero 1954	-	1,65
marzo 1954	1,218	1,65
abril 1954	-	1,31
mayo 1954	1,45	-
junio 1954	-	1,81
julio 1954	1,50	1,69

CUADRO I

% NITROGENO AMINICO

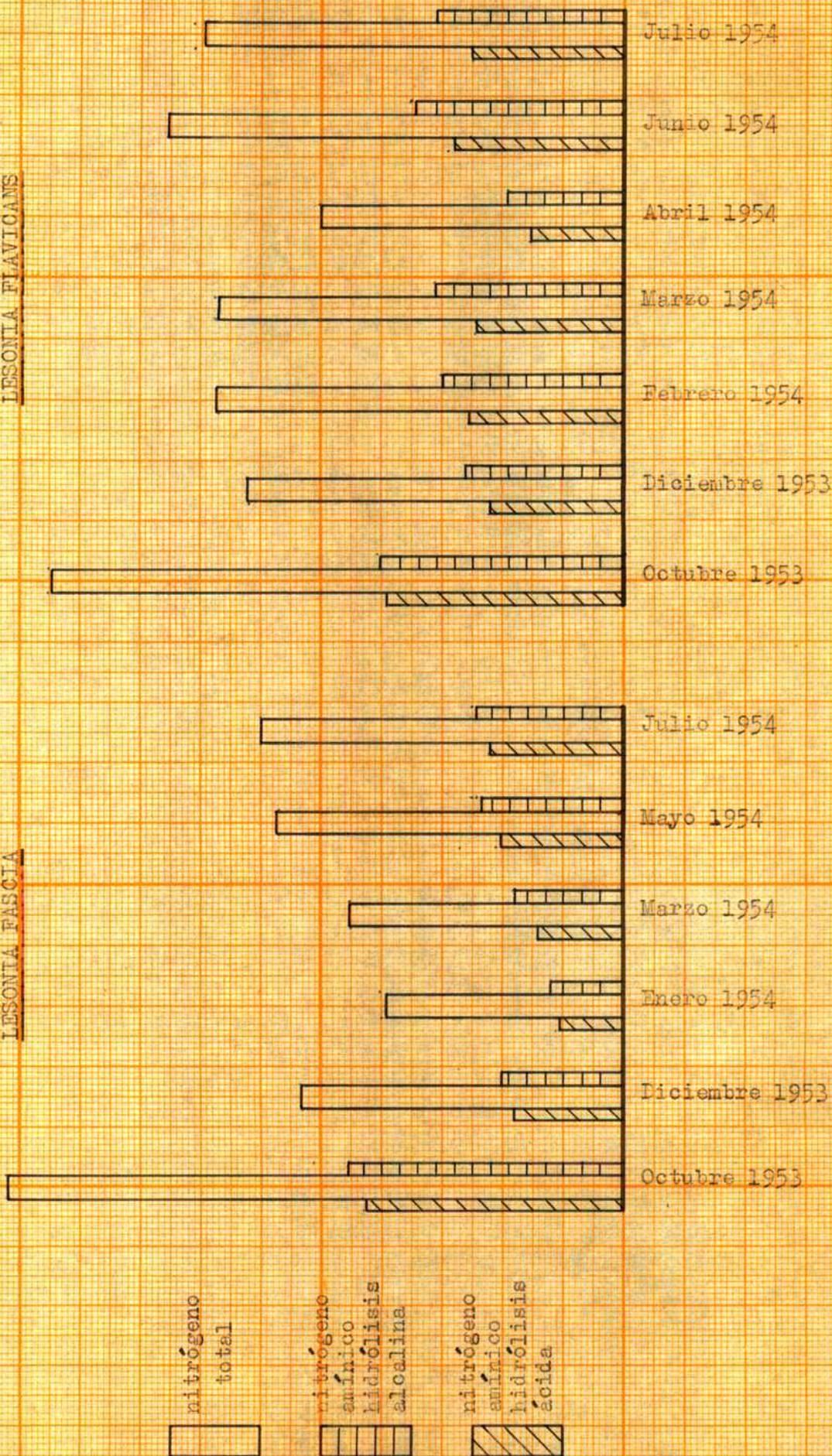
	LESONIA FASCIA		LESONIA FLAVICANS	
	hydr. ácida	hydr. alc.	hydr. ácida	hydr. alc.
octubre 1953	1,15	1,22	1,08	1,12
diciembre 1953	0,66	0,70	0,75	0,82
enero 1954	0,51	0,54	-	-
febrero 1954	-	-	0,81	0,90
marzo 1954	0,58	0,65	0,78	0,91
abril 1954	-	-	0,60	0,68
mayo 1954	0,71	0,77	-	-
junio 1954	-	-	0,86	0,99
julio 1954	0,74	0,79	0,80	0,92

CUADRO II

COMPARACION DEL NITROGENO TOTAL Y AMINICO

LESONTIA FLAVICANS

LESONTIA FASCIA



□ Nitrogeno total
 ▨ Nitrogeno amino alcohalina
 ▩ Nitrogeno amino ácida

R_a DE AMINOACIDOS PUROS (°)

	R _a (')	R _a (")
Acido glutámico	0,735	0,861
β -Alanina	1,000	1,000
l-Arginina	0,348	0,477
l-Cistina	0,184	-
Glicina	0,620	0,843
dl-Histidina	0,353	0,719
dl-Isolucina	1,900	-
l-Leucina	1,920	-
l-Lisina	0,238	-
Metionina	1,550	1,263
dl-Serina	0,575	0,902
l-Tirosina	1,380	-
l-Treonina	0,720	1,043
dl-Triptofano	1,780	-
dl-Valina	1,520	1,343

(°) R_f calculados en base a la alanina tomada como referencia.

(') Solvente: butanol-ácido acético-agua (40:10:50).

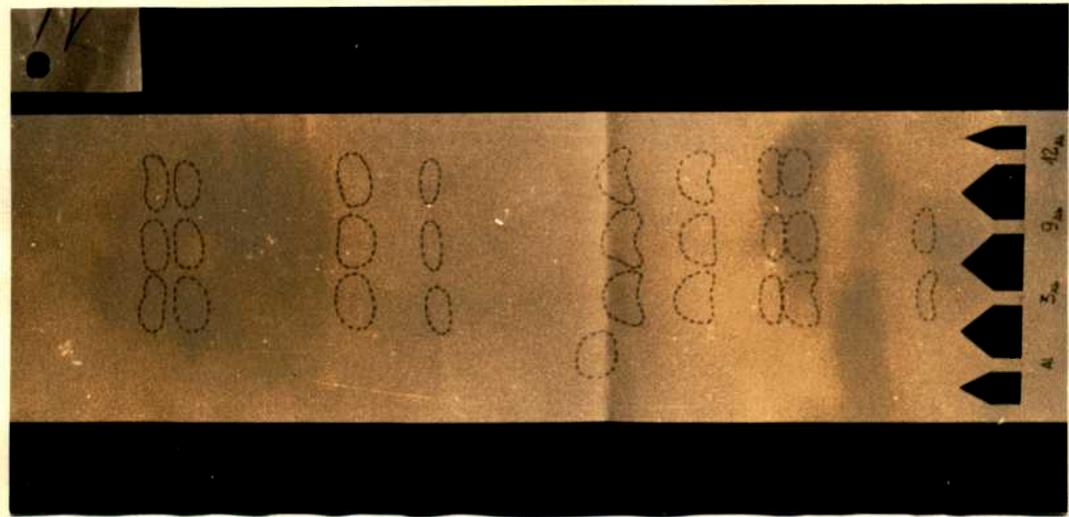
(") Solvente: etanol 77 %

VARIACION ESTACIONAL DE AMINOACIDOS EN "LESONIA FUSCIA"

	octubre 1953	diciembre 1953	enero 1954	marzo 1954	mayo 1954	Julio 1954
Acido glutámico	+	-	-	+	-	-
β -Alanina	+	+	+	+	+	+
l-Arginina	-	-	-	-	-	-
l-Cistina	-	-	-	-	-	-
Glicina	+	+	+	+	-	+
dl-Histidina	-	+	+	+	-	-
dl-Isoloucina	+	-	+	+	-	-
l-Leucina	+	+	+	+	+	-
l-Lisina	-	-	+	-	-	-
Metionina	+	-	+	-	-	+
dl-Serina	-	+	+	+	+	+
l-Tirosina	+	+	+	-	-	-
l-Treonina	+	+	+	+	-	+
dl-Triptofano	+	+	-	+	-	+
dl-Valina	+	+	-	+	+	+

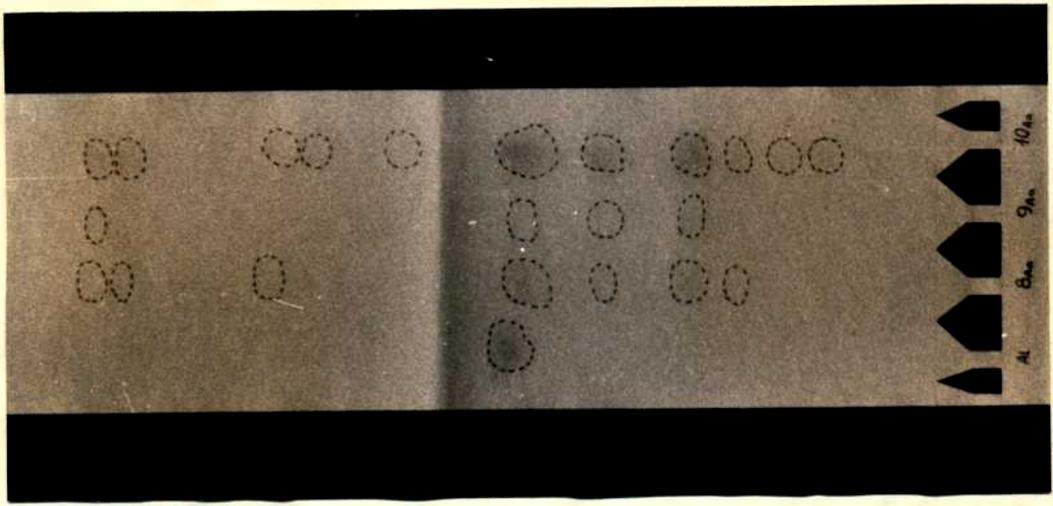
VARIACION ESTACIONAL DE AMINOACIDOS EN "LESONIA FLAVICANS"

	octubre 1953	diciembre 1953	febrero 1954	marzo 1954	abril 1954	junio 1954	julio 1954
Acido glutámico	-	-	-	-	-	+	-
l-Alanina	+	+	+	+	+	+	+
l-Arginina	-	-	-	+	-	-	-
l-Cistina	-	-	-	-	+	-	-
Glicina	+	+	+	+	-	+	+
dl-Histidina	-	-	-	+	-	-	-
dl-Isolucina	+	+	+	+	+	+	+
l-Leucina	+	+	+	+	+	+	+
l-Lisina	-	-	+	+	-	-	+
Metionina	-	+	+	+	-		+
dl-Serina	+	+	+	+	+	+	+
l-Tirosina	+	-	+	+	+	+	+
l-Treonina	+	+	+	+	+	+	+
dl-Triptofano	+	-	-	+	+	-	-
dl-Valina	+	+	-	+	+	-	-



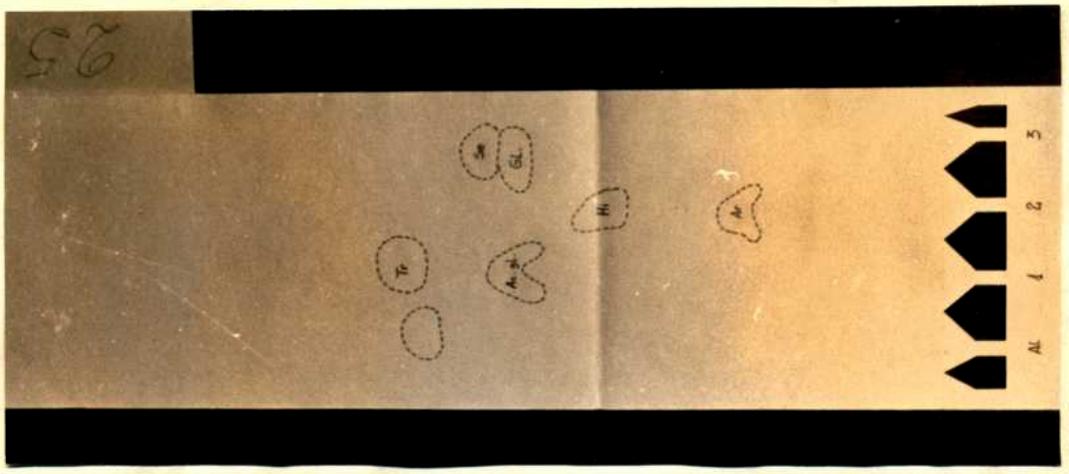
Fotografía 1

- 3Ab: L.F. enero '54 (h. ácida)
- 9Ab: L.F. feb. '54 (h. ácida)
- 12Ab: L.F. jun. '54 (h. ácida)
- Butanol: Acido acético: Agua (40:10:50)



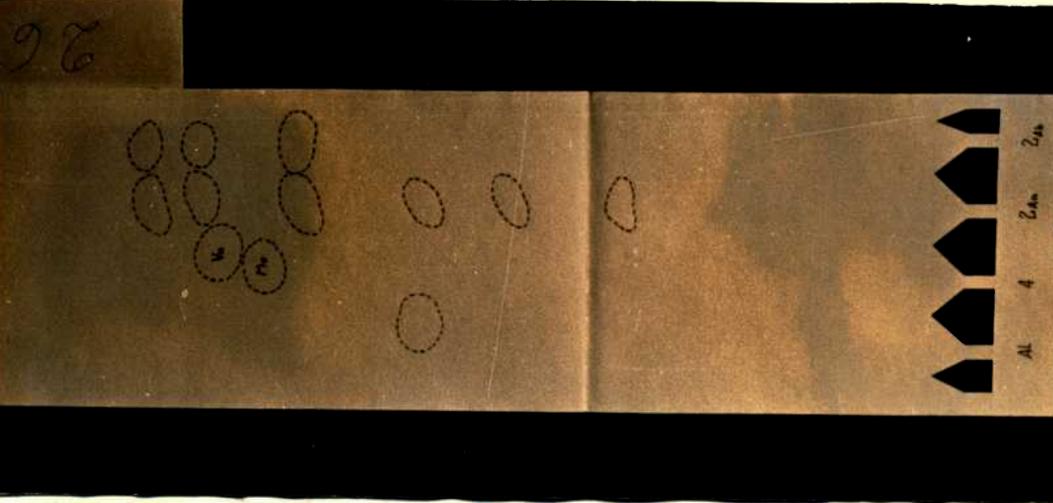
Fotografía 2

- 8Aa: L.Fl. dic. '53 (h. alc.)
- 9Aa: L.Fl. feb. '54 (h. alc.)
- 10Aa: L.Fl. marzo '54 (h. alc.)
- Butanol: Acido acético: Agua (40:10:50)



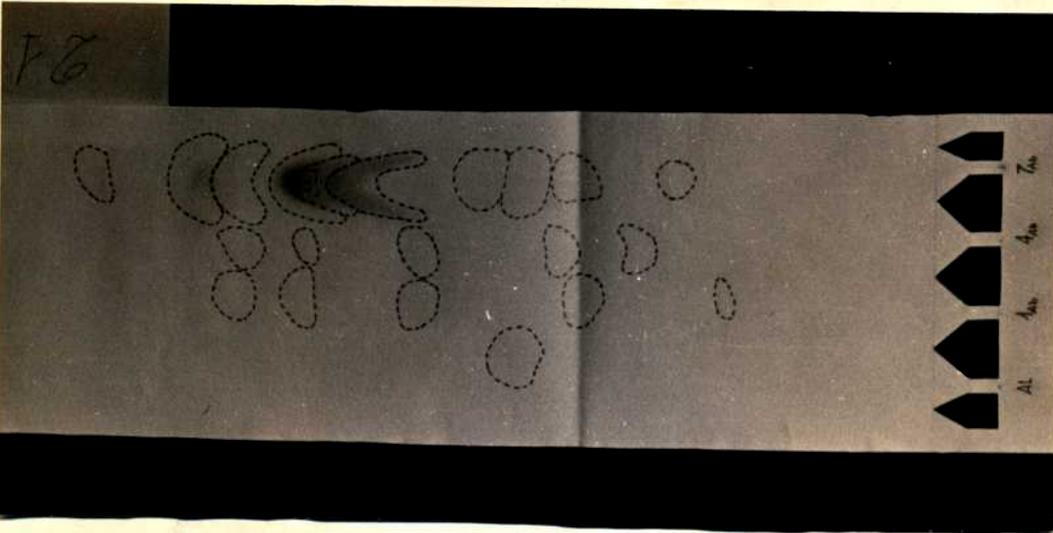
Fotografía 3

- 1: treonina-ác. glut.
- 2: histidina - arginina
- 3: serina - glicina
- Etanol 77% (v/v)



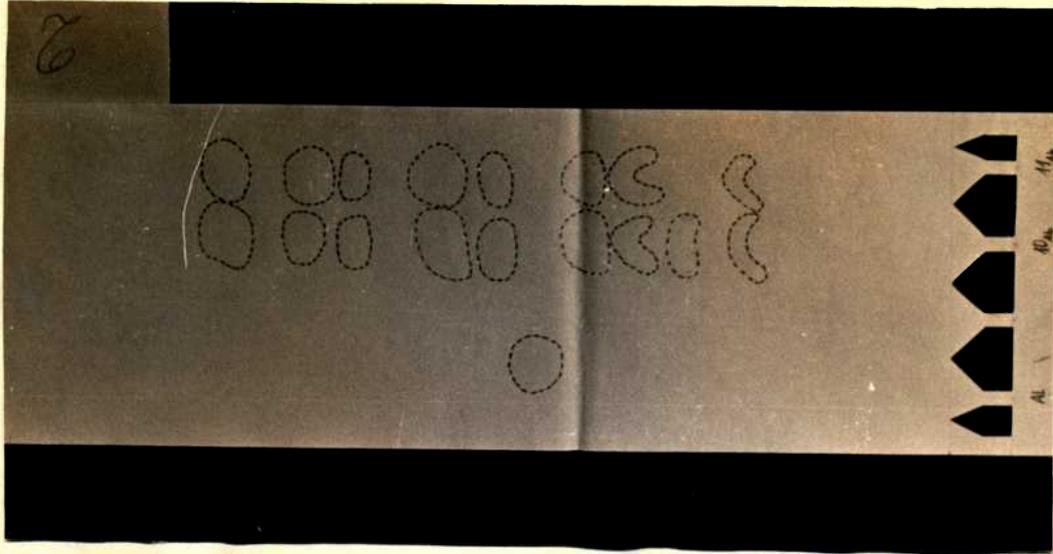
Fotografia 4

4 : valina - metionina
Etanol 77 % (v/v)



Fotografia 5

1Ab:L.F. oct.'53 (h. éc.)
4Ab:L.F. mar.'54 (h. éc.)
7Ab:L.Fl. oct.'53 (h. éc.)
Etanol 77 % (v/v)



Fotografia 6

10Ab:L.Fl. Marzo'54 (h. éc.)
11Ab:L.Fl. abril'54 (h. éc.)
Etanol 77 % (v/v)

CONCLUSIONES

Uno de los inconvenientes que presentaba el método de determinación cualitativa de la composición de aminoácidos en algas marinas era la eliminación de las sales que interfieren en la cromatografía sobre papel y que en el caso de las algas pardas representa un alto porcentaje de su composición (30 a 40 %).

De los métodos ensayados se encontró como el más satisfactorio el de Block, que elimina las sales del producto de la hidrólisis de proteínas por extracción de los aminoácidos con acetona clorhídrica.

Los resultados fueron excelentes ya que se consiguió hacer una extracción total, desapareciendo así las interferencias debidas a la presencia de sales.

En cuanto al estudio de la variación estacional de la composición de las algas se encontró que hay un notable aumento de nitrógeno total y de nitrógeno amínico en los meses de primavera.

Desde el punto de vista de los aminoácidos glucogenéticos, o sea aquellos que representan etapas intermedias en la formación de los hidratos de carbono, tales como treonina, serina, alanina y tirosina, se pudo llegar a la conclusión de que la "Lesonia Flavicans" los posee totalmente; mientras que la "Lesonia Fascia" presenta ausencia de tirosina en la época invernal.

En cuanto a los aminoácidos considerados esenciales debemos hacer notar que en la "Lesonia Flavicans" no se encuentra arginina e histidina y en la "Lesonia Fascia" faltan arginina y lisina. En general, hay que admitir ausencias parciales en algunos meses del año del resto de los aminoácidos esenciales. La "Lesonia Flavicans" los posee en todos los meses en el caso de isoleucina, leucina y treonina, mientras que la "Lesonia Fascia" presenta una variación casi completa en los casos de leucina, treonina y valina.

B I B L I O G R A F I A

- (1) Chapman V.J.: Seaweeds and their uses, London (1950).
- (2) Dangeard C.: Traitó D'Algologie (1937).
- (3) Takagi M.: Bull. Fac. Fisheries, Hokkaido Univ. 1, N° 1, 35-43 (1950)
- (4) idem (3): 4, N° 1, 86-91 (1953).
- (5) Tabci K.: J. Home Econ. (Japan) 3, N° 1, 20-22 (1952).
- (6) Coulson C. B.: J. Sci. Food Agr., 6, 674-82 (1955).
- (7) idem (6): Chemistry and Industry, 997-98 (1953).
- (8) Scott R.: Nature, 173, 1098-99 (1954).
- (9) Smith D. y Young G.: J. Biol. Chem., 217, 845-53 (1955).
- (10) Diario "La Prensa": Buenos Aires, 5 de enero de 1963.
- (11) Lyman C., Kuiken K. y Hale F.: J. Agr. Food Chem., 4, 1008-13 (1956).
- (12) Houdloy J., Ing R. y Krauss R.: Science, 124, 536-37 (1956).
- (13) Hirst Jones y Jones: Nature, 143, 357 (1939).
- (14) Schooffel y Link: J. Biol. Chem., 100, 397 (1933).
- (15) Thompson y Morrison: Anal. Chem., 23, 1153 (1951).
- (16) Schroeder W., Kay L. y Mills R.: Anal. Chem., 22, 760 (1950).
- (17) Pope C. y Stevens H.: Bioch. J., 33, 1070 (1939).
- (18) Block R.: Aminoacid Handbook, pág. 17, Thomas Publisher.
- (19) Block R., Durrum E. y Zwoig G.: A manual of paper chromatography and...., pág. 123, Academic Press, New York (1958).
- (20) Underwood J. y Rockland L.: Anal. Chem., 26, 1553 (1954).
- (21) idem (18): pág. 91.
- (22) Koch F. y Mc Meekin T.: J. Am.Chem. Soc., 46, 2006 (1924).
- (23) Vanselow A.: Ind. Eng. Chem., Anal. Ed., 12, 516 (1940).
- (24) Wicks L.: J. Lab. Clin. Med., 27, 118 (1941).
- (25) Treadwell-Hall: Analytical Chemistry, Vol. 1, pág. 91, New York.
- (26) Peters A.: J. Biol. Chem., 39, 285 (1919).
- (27) Leitch J.: J. Franklin Inst., 245, 355 (1948).
- (28) Channing D. y Young: Chem. and Ind., pág. 519 (1952).
- (29) Channing D. y Young: J. Chem. Soc. (London), 2431 (1953).
- (30) Cramer F.: Papierchromatographie, pág. 64, Verlag Chemie, GMBH, Weinheim, Bergstr. (1954).

- (31) Zahn H.: Textilpraxis, pág. 127 (1951).
- (32) idem (16): pág. 17.
- (33) Lissitsky S.: Bull. Soc. Chin. Biol., 36, 655-57 (1954).
- (34) idem (18): pág. 1557.
- (35) Klinger W.: Naturwiss, 42, 645 (1955).
- (36) Matthias W.: Naturwiss, 41, 17 (1954).
- (37) idem (19): pág. 55.
- (38) idem (30): pág. 28.
- (39) idem (19): pág. 61.
- (40) idem (18): pág. 72.
- (41) idem (1): pág. 123.
- (42) idem (18): pág. 80.

PARTE GENERAL:

Block R.: Aminoacid Handbook, Thomas Publisher.

Block R., Durrum E. y Zweig G.: A manual of paper chromatography and...
Academic Press, New York (1958).

Cramer F.: Papierchromatographie, Verlag Chemie, GMBH, Weinheim,
Bergstr. (1954).

Fortunato A. D.: Ciencia e Investigación, 12, 501 (1958).

Rongino M. A.: Tesis doctoral, F.C.E.N. Bs. As. (1955).

Gianolla A.: Tesis doctoral, F.C.E.N. Bs. As. (1956).

Determinación de la composición en aminoácidos
de las proteínas de la "Lissonia fasciata" y "Lissonia flaviviridis"
y sus variedades estacionales.

Ana Carolina Paladino

Determinación de Nitrógeno total
(método micro Kjeldhal)

	PESO mg	H ₂ O C, 1N ml	% NITROGENO	PESO mg	H ₂ O C, 1N ml	% NITROGENO
enero 1954 (L.F.)	200	1,27	1,08	200	1,34	1,14
mayo 1954 (L.F.)	200	1,73	1,47	200	1,71	1,45
junio 1954 (L.F1.)	200	2,12	1,80	200	2,11	1,79

Determinación de Nitrógeno total
(método Tompson-Morrison)

	PESO mg	NESSLER. filtro 440	DILUCION	% NITROGENO	PESO mg	NESSLER. filtro 440	DILUCION	% NITROGENO
octubre 1953 (L.F.)	200	0,260	1:100	2,34	200	0,260	1:100	2,34
diciembre 1953 (L.F.)	200	0,150	1:100	1,375	200	0,148	1:100	1,365
enero 1954 (L.F.)	100	0,247	1:25	1,309	100	0,247	1:25	1,309
marzo 1954 (L.F.)	100	0,268	1:25	1,21	100	0,268	1:25	1,205
mayo 1954 (L.F.)	100	0,158	1:50	1,44	100	0,160	1:50	1,46
julio 1954 (L.F.)	100	0,164	1:50	1,50	100	0,166	1:50	1,51
octubre 1953(L.Fl.)	200	0,200	1:125	2,20	200	0,198	1:125	2,18
diciembre 1953 (L.Fl.)	100	0,172	1:50	1,55	190	0,172	1:50	1,55
febrero 1954 (L.Fl.)	100	0,185	1:50	1,655	100	0,183	1:50	1,645
marzo 1954 (L.Fl.)	100	0,364	1:25	1,65	100	0,364	1:25	1,65
abril 1954 (L.Fl.)	100	0,281	1:25	1,30	100	0,282	1:25	1,32
junio 1954 (L.Fl.)	100	0,398	1:25	1,805	100	0,400	1:25	1,81
julio 1954 (L.Fl.)	200	0,191	1:100	1,69	200	0,191	1:100	1,69

Determinación de Nitrogeno amínico
(método de Pope y Stevens)

<u>hidrólisis</u> <u>ácida</u>	PESO mg	50% H ₂ O ₂ 0,0001N 10% incog. + 10% glicina			Nitrogeno amínico %	50% H ₂ O ₂ 0,0001N 10% incog. + 10% glicina			Nitrogeno amínico %
		50% H ₂ O ₂ 0,0001N 10% incog. + 10% glicina	50% H ₂ O ₂ 0,0001N 10% incog. + 10% glicina	100% glicina		50% H ₂ O ₂ 0,0001N 10% incog. + 10% glicina	50% H ₂ O ₂ 0,0001N 10% incog. + 10% glicina	100% glicina	
octubre 1953 (L.F.)	1	14,34	13,76	1,15	1	14,39	13,76	1,16	
diciembre 1953 (L.F.)	1	11,13	13,76	0,655	1	11,17	13,76	0,66	
enero 1954 (L.F.)	1	10,22	13,76	0,515	1	10,14	13,76	0,505	
marzo 1954 (L.F.)	1	10,63	13,76	0,58	1	10,60	13,76	0,575	
mayo 1954 (L.F.)	1	11,55	13,76	0,72	1	11,42	13,76	0,70	
julio 1954 (L.F.)	1	11,74	13,76	0,75	1	11,65	13,76	0,735	
octubre 1953 (L.Fl.)	1	13,91	13,76	1,08	1	13,91	13,76	1,08	
diciembre 1953 (L.Fl.)	1	11,82	13,76	0,76	1	11,74	13,76	0,75	
febrero 1954 (L.Fl.)	1	12,15	13,76	0,81	1	12,07	13,76	0,80	
marzo 1954 (L.Fl.)	1	11,89	13,76	0,775	1	12,00	13,76	0,79	
abril 1954 (L.Fl.)	1	10,76	13,76	0,60	1	10,76	13,76	0,60	
junio 1954 (L.Fl.)	1	12,39	13,76	0,85	1	12,53	13,76	0,875	
julio 1954 (L.Fl.)	1	12,15	13,76	0,81	1	12,07	13,76	0,80	

hidrólisis

alcalina

octubre 1953 (L.F.)	1	14,71	13,76	1,21	1	14,88	13,76	1,23
diciembre 1953 (L.F.)	1	11,42	13,76	0,70	1	11,42	13,76	0,70
enero 1954 (L.F.)	1	10,38	13,76	0,54	1	10,30	13,76	0,53
marzo 1954 (L.F.)	1	11,11	13,76	0,65	1	11,11	13,76	0,65
mayo 1954 (L.F.)	1	11,82	13,76	0,76	1	11,89	13,76	0,775
julio 1954 (L.F.)	1	12,00	13,76	0,77	1	12,07	13,76	0,80
octubre 1953 (L.Fl.)	1	14,15	13,76	1,12	1	14,17	13,76	1,125
diciembre 1953 (L.Fl.)	1	12,15	13,76	0,81	1	12,28	13,76	0,83
febrero 1954 (L.Fl.)	1	12,73	13,76	0,90	1	12,75	13,76	0,905
marzo 1954 (L.Fl.)	1	12,78	13,76	0,91	1	12,78	13,76	0,91
abril 1954 (L.Fl.)	1	11,17	13,76	0,66	1	11,42	13,76	0,70
junio 1954 (L.Fl.)	1	13,31	13,76	0,99	1	13,31	13,76	0,99
julio 1954 (L.Fl.)	1	12,88	13,76	0,925	1	12,78	13,76	0,91