

5  
24

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Estudios Superiores  
"CUAUTITLAN"



CUANTIFICACION DEL ACIDO BETA-HIDROXI  
MIRISTICO COMO INDICE DE CONTAMINACION  
EN PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA DE  
Salmonella typhi

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO  
P R E S E N T A :  
ROSA DE GUADALUPE CABRERA CABELLO

Director de Tesis: Dr. Armando Isibasi A.



TESIS CON  
FALTA DE ORIGEN

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx.

1988



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## CONTENIDO

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCION	2
OBJETIVOS	1 4
PARTE EXPERIMENTAL	1 5
MATERIAL Y SOLUCIONES	1 5
METODOS	1 8
1.0 OBTENCION DE PME	1 8
1.1 Cultivo y cosecha de las cepas bacterianas	1 8
1.2 Aislamiento de PME	1 8
1.3 Purificación de PME	1 9
2.0 OBTENCION DE ACIDOS GRASOS EN SUSPENSIONES DE PME	2 0
2.1 Precipitación de PME	2 0
2.2 Hidrólisis de PME y obtención de ácidos grasos	2 0
2.3 CCF para ácidos grasos	2 1
3.0 METODOS ANALITICOS	2 1
3.1 Cuantificación de proteínas	2 1
3.2 Determinación de LPS por KDO	2 1
3.3 Determinación de LPS por el ABHM	2 2
3.3.1 Obtención de EFAG	2 2
3.3.2 CCF de EFAG	2 2
3.3.3 Espectro de absorción del EFABM	2 2
3.3.4 CLAR	2 3
4.0 ESPECTROFOTOMETRIA DE INFRARROJO	2 3

<b>RESULTADOS</b>	<b>29</b>
<b>DISCUSION</b>	<b>44</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>47</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>48</b>

## ABREVIATURAS

- ABC: Area Bajo la Curva
- ABHM: Acido  $\beta$ -hidroxil mirístico
- Abs: Absorbancia
- CCF: Cromatografía en Capa fina
- CLAR: Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.
- DL50: Dosis Letal al 50%.
- DNasa: Desoxirribonucleasa
- EDTA: Acido etilén diamino tetracético
- EFABM: Ester fenacilo del ácido  $\beta$ -hidroxil mirístico
- EFAG: Esteres fenacilos de ácidos grasos
- EFAL: Ester fenacilo del ácido láurico
- EFAM: Ester fenacilo del ácido mirístico
- EFAP: Ester fenacilo del ácido palmítico
- HEPES: Acido 4-(2-hidroetil)-1-piperazin-etanosulfónico
- KDO: Acido 3-desoxi-D-manoctulónico
- LPS: Lipopolisacárido
- ODS: Octadecilsilano
- PME: Proteínas de Membrana Externa
- RNAse: Ribonucleasa
- SDS: Dodecil sulfato de sodio
- TRIS: Tris-(hidroximetil)-aminometano

## INTRODUCCION

La fiebre tifoidea es una enfermedad febril infecto-contagiosa causada por la ingestión e invasión intestinal de *Salmonella typhi*. Esta es una bacteria gram-negativa, móvil, de la tribu *Salmonellae* y familia *Enterobacteriaceae*. De acuerdo a la clasificación de Kauffman-White *Salmonella typhi* pertenece al grupo D y comparte con diferentes especies de ese grupo los antígenos somáticos 9,12. Los flagelos corresponden al antígeno "d" y en la superficie se encuentra el antígeno "VI" (8).

La *Salmonella typhi* tiene una envoltura celular constituida por la membrana citoplasmática, la peptidoglicana y la membrana externa (23) (Figura 1); la primera se compone de fosfolípidos (predominantemente fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol y cardiolipina) y una gran variedad de proteínas. Los flagelos están anclados en el citoplasma y atraviesan la membrana citoplasmática. La peptidoglicana confiere rigidez y está formada por cadenas paralelas de polisacáridos constituidos por ácido murámico y N-acetilglucosamina (8). La membrana externa está formada por proteínas, fosfolípidos y lipopolisacárido (LPS); este último ocupa aproximadamente el 45% de la superficie (9). La membrana actúa como barrera, impidiendo la entrada de sustancias tóxicas como antibióticos y detergentes; contiene los receptores para bacteriófagos y colicinas, se relaciona con los procesos de conjugación, división celular y transporte de sustancias al interior de la célula (36,37 y 40). Asociados a la membrana externa se encuentran los pili y el antígeno "VI".

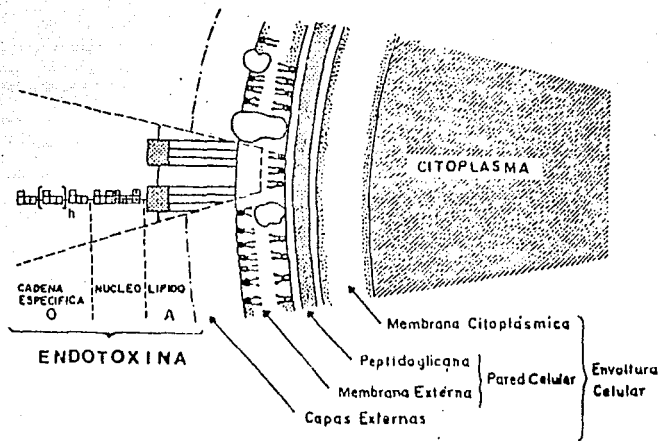


FIGURA 1  
 ESQUEMA DE LA ENVOLTURA CELULAR DE LAS BACTERIAS  
 GRAM NEGATIVAS (33).

Las proteínas de membrana externa (PME) se clasifican en proteínas principales y menores (40,9). Las primeras pueden expresarse con más de 100,000 copias por célula y se han descrito alrededor de diez diferentes, aunque por lo general, solamente se encuentran cinco de ellas en la bacteria.

Dentro de las proteínas principales están:

1) Proteínas matrices o porinas: relacionadas con el transporte pasivo de sustancias de bajo peso molecular.

2) Proteína modificable por el calor: relacionada con los procesos de conjugación y actúa como receptor de fagos y colicinas.

3) Lipoproteína de Braun: está unida covalentemente a la peptidoglicana y su función es mantener la integridad estructural y funcional de la membrana.

El arreglo de estas proteínas se ilustra en el esquema propuesto por Osborn y Wu (Figura 2).

Las proteínas menores intervienen como acarreadores en el transporte de las sustancias de alto peso molecular a través de la membrana.

Otro componente importante de la membrana externa es el LPS ya que se encuentra en gran cantidad y establece interacciones con las otras moléculas que forman parte de la membrana. El LPS es un complejo macromolecular que representa el antígeno O y la endotoxina de las bacterias gram-negativas; estructuralmente se trata de un heteropolímero constituido por tres regiones diferentes (32) (Figura 3):



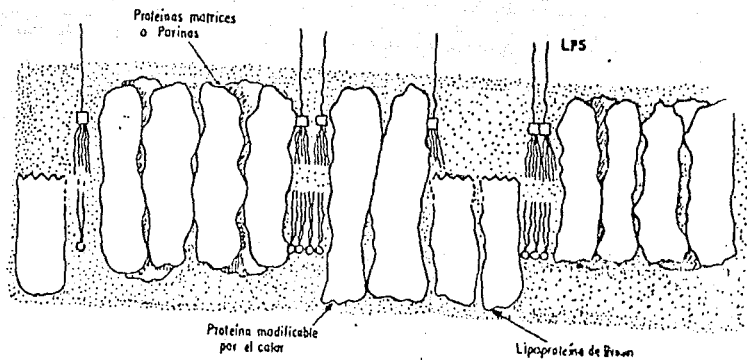


FIGURA 2  
ORGANIZACION DE LAS PROTEINAS EN LA MEMBRANA EXTERNA 139

- 1.- Antígeno O.
- 2.- Núcleo o Core.
- 3.- Lípido A.

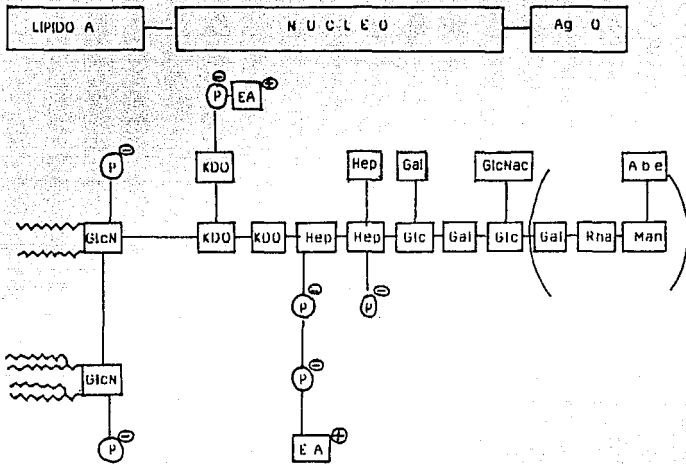
1.- El antígeno O es un polisacárido constituido por unidades oligosacáridicas de repetición; entre los monosacáridos que la forman se encuentran los azúcares neutros, azúcares aminados y ácidos urónicos. La estructura de las unidades de repetición de las bacterias gram-negativas muestran gran diversidad incluso dentro de una misma especie bacteriana. Esta propiedad ha permitido diferenciar cepas de una misma especie.

2.- El core o núcleo basal es una estructura común para las enterobacterias y es similar para todas las bacterias gram-negativas; se trata de un complejo polisacárido que puede ser dividido en dos secciones (51):

- 1) Región interna: se encuentra unida al Lípido A, está formada por el ácido 3-desoxi-D-monocetónico (KDO) y L-glicero-D-manoheptosa.
- 2) Región externa: constituida por glucosa, galactosa y N-acetil-D-glucosamina.

En la Figura 4 se muestra la región del núcleo basal de *S. typhimurium*.

3.- El Lípido A, se inserta en la bicapa externa de fosfolípidos y le confiere su actividad de endotoxina. Está formada por un disacárido de glucosamina en unión (1'-6), tiene fosfatos o pirofosfatos en posiciones 1 y 4'; el grupo hidroxilo del disacárido de glucosamina en posición 6' está sustituido por el



EA= ETANOLAMINA

Figura 3. REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA ESTRUCTURA QUIMICA DEL LPS DE *S. typhimurium*.

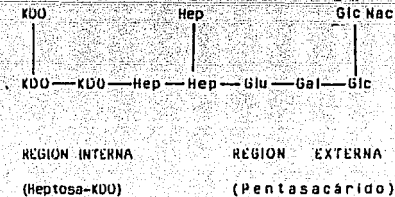


Figura 4. REGION DEL NUCLEO BASAL DE *S. typhimurium* (51).

KDO. Los grupos hidróxilo y amino están sustituidos por ácidos grasos como el  $\beta$ -hidróxilo mirístico (ABHM), láurico, mirístico, palmítico y otros ácidos grasos que se encuentran unidos al grupo hidróxilo de ácidos  $\beta$ -hidróxilo saturados formando el éster correspondiente, como el ácido miristoximirístico. Además se encuentran compuestos básicos como la etanolamina y cationes divalentes que se unen a la membrana en forma iónica (47). La presencia de los ácidos grasos en el LPS, le confiere su actividad endotóxica, la extracción química o enzimática de estos, hace que tal actividad desaparezca (46). En la figura B se muestra la estructura química del lípido A de *S. typhimurium*.

#### CONTROL DE LA FIEBRE TIFOIDEA

La fiebre tifoidea es frecuente en los países subdesarrollados, incluyendo México y tiene características endémico-epidémicas. Este fenómeno se encuentra relacionado directamente con deficiencias en el saneamiento ambiental y el aprovisionamiento de agua potable.

Para el control de la fiebre tifoidea, se incluye entre otras posibilidades la vacunación. La primera inmunización en humanos se realizó hace 90 años cuando Wright en Inglaterra y Pfeiffer y Kille en Alemania, emplearon vacunas producidas con bacterias inactivadas por calor. Estas vacunas se utilizaron en la India, Egipto, Italia y Sudáfrica, lugares donde se obtuvieron disminuciones significativas de la morbilidad así como atenuación de los síntomas en los individuos vacunados que sufrieron la enfermedad (42).

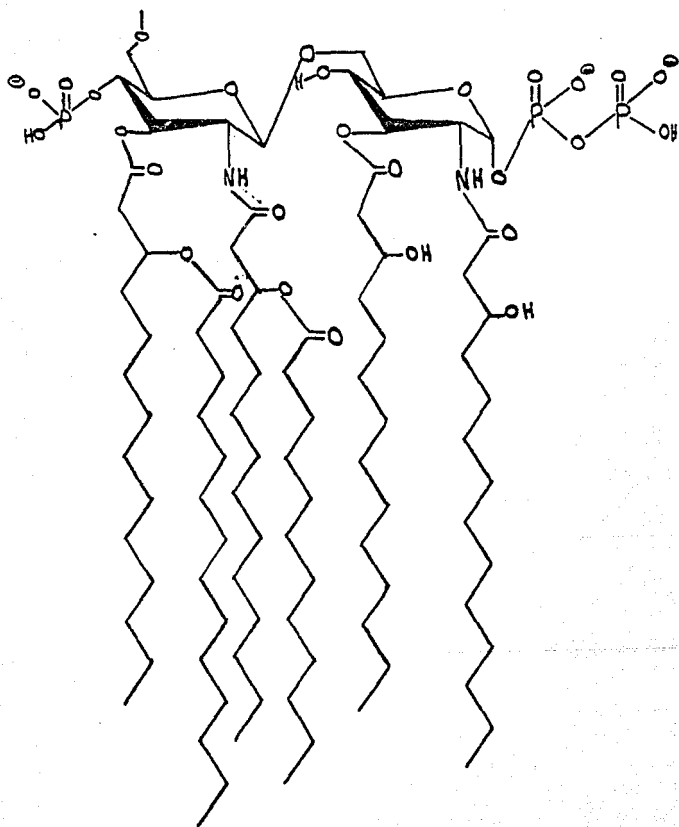


Figura 5. ESTRUCTURA DEL LIPIDO A DE *S. typhimurium* (38).

En 1925, Besredka propuso el empleo de vacunas elaboradas con bacterias vivas atenuadas y administradas por vía oral. El efecto de las mismas se estudió en el ejército francés en donde, desafortunadamente hubo muertes entre los individuos, por lo que fueron sustituidas por vacunas elaboradas con bacterias muertas (26).

Hasta 1955 no se tuvo un ensayo controlado que proporcionara información confiable acerca del valor profiláctico de las vacunas. A partir de esa fecha bajo el auspicio de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se realizaron estudios de campo en Yugoslavia, Guyana, Polonia y la URSS, en donde se investigó la eficacia de vacunas preparadas con células enteras de *Salmonella typhi* inactivadas con acetona, calor, fenol y alcohol. De los resultados obtenidos en estas investigaciones, se concluyó que la vacuna inactivada con acetona designada con la letra K resultó ser la mejor, ya que la protección conferida no solo fue de mayor grado, sino también de mayor duración. La vacuna inactivada con calor y fenol designada con la letra L, manifestó menor eficacia que la K y la inactivada con calor evidenció ser la menos efectiva. Se observó que la protección inducida por una sola dosis de las vacunas K y L era aceptable; sin embargo el empleo de dos dosis proporcionaba una inmunidad más confiable y de mayor duración (24). Estas vacunas tienen varios inconvenientes como el de inducir inmunidad de corta duración por lo que es necesario reinmunizar cada dos o tres años; la vacunación requiere la aplicación de dos inyecciones subcutáneas o intramusculares y produce efectos adversos (fiebre, malestar general y postración)

debido a la presencia de endotoxina.

Hasta la fecha se han estudiado dos vacunas que se administran por vía oral y se elaboran con bacterias vivas. Una de ellas se prepara con una cepa de *Salmonella typhi* dependiente de estreptomycinina y la otra con una mutante deficiente de UDP-4-galactosa epimerasa (designada por Germanier como 1y 21a) (16,45). La efectividad de ambas vacunas fue valorada en voluntarios humanos, encontrándose resultados contradictorios en cuanto a la protección conferida por las cepas dependientes de estreptomycinina (28). En contraste, la vacuna de Germanier protegió al 87% de los individuos inmunizados cuando la dosis de desafío fue de  $10^7$  bacterias (DL50) (15). Los estudios realizados en Alejandría y Egipto indicaron que esta última fue capaz de inducir protección en el 95% de la población estudiada (50). Sin embargo esta misma, aplicada en Chile (1983) a una población infantil, a razón de tres dosis administradas en cápsulas de capa entérica, con intervalos de 2 o 21 días entre cada dosis, sólo indujo una protección del 51 y 67% respectivamente (14).

Recientemente, las PME de las bacterias gram-negativas han adquirido importancia desde el punto de vista inmunológico, ya que por su localización son elementos clave en la patogenicidad y en la probable inducción de protección contra enfermedades producidas por estas bacterias (6,27).

Isibasi y cols. (22) aislaron, según el método de Schnaitman PME de *S. typhi* 9,12 dVI, contaminadas con 3% de LPS. El complejo proteico-LPS administrado a una concentración de 30  $\mu$ g por vía intraperitoneal, indujo protección del 100% en el modelo

murino, cuando se realizó el reto de hasta 500 DL50 de la cepa homóloga *S. typhi ty2* y de *S. typhimurium*. Por otro lado, el suero de conejo anti-PME-LPS de *S. typhi*, protegió en un 100% a los ratones de un reto de 100 DL50 de la cepa homóloga de *S. typhi ty2* y de *S. typhimurium*.

Estos estudios se han efectuado gracias a los métodos específicos de extracción de las PME (48). Sin embargo existe el inconveniente de la contaminación de las mismas por el LPS (endotoxina), por lo que es importante eliminarla, para anular los efectos adversos que produce cuando es administrada como antígeno protector, por lo anterior es indispensable estar seguros que las PME están puras. De ahí la necesidad de crear métodos analíticos para su detección (2,4).

#### MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETECCIÓN DE LPS

Los métodos químicos indirectos que se emplean actualmente para la determinación de LPS se basan en la cuantificación de:

1) KDO

2) Ácidos grasos

De los métodos anteriores se usa como índice de contaminación por LPS en PME el método de Karkhanis (25), cuantificando el KDO a través de una reacción colorida con el ácido tiobarbitúrico; sin embargo su sensibilidad es baja, ya que en ensayos previos realizados con proteínas de *S. typhi* obtenidas por el método de Mikaido (36), aparentemente se encuentran libres de KDO, pero al ser usadas como inmunógenos en conejos además de producir anticuerpos específicos anti-PME, inducen la formación de anticuerpos específicos anti-LPS. Ante estos resultados es



necesario encontrar otra técnica más sensible que pueda determinar en forma indirecta la contaminación en PME por LPS. Por esta razón se decidió determinar la presencia de LPS a través de la cuantificación del ABHM por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR).

Hamilton y Comai (19), separaron ácidos grasos en una columna de gel de sílice, detectándolos a una longitud de onda de 206 nm; Avelano y cols (1), lograron separarlos por cromatografía de fase reversa; sin embargo la absorción de éstos a longitudes de onda de 195-206 nm es relativamente escasa, por lo que fue necesario formar derivados de ácidos grasos, entre los cuales se han reportado ésteres de: 2-Naftacil (7), p-Metoxianilidas (20), 1-Naftacilamina (21), 2-Nitrofenilhidracinas (34), Antrimetilester (3) y fenilester (5,11,13,18,44,53). Para aumentar la sensibilidad últimamente se realizaron derivados fluorescentes con la 4-bromoetil-7-acetoxicumarina (49) y la 3-bromometil-6,7-dimetoxi-1-metil-2-(1h)-quinoxalinona (54).

El estudio de derivados de ésteres fenacilo de ácidos grasos (EFA6) resultó adecuado para su detección y cuantificación. Borch (5) en 1975 propuso la preparación de éstos a partir de la *m*-bromoacetofenona y en ese mismo año Durst (11) obtuvo el derivado con la *m*-4-dibromoacetofenona, finalmente Wood y Lee (53) modificaron el método de Borch y obtuvieron un límite de detección de 5 ng.

En el presente trabajo se investigó la presencia de LPS en PME por medio de la cuantificación por CLAR del éster fenacilo del ácido  $\beta$ -hidroxi mirístico (EFABM), obtenido por el método de Wood y Lee.

## OBJETIVOS

## OBJETIVO GENERAL:

Determinar el contenido de lipopolisacárido como contaminante en PME de *Salmonella typhi*.

## OBJETIVOS PARTICULARES:

- 1) Separar los ésteres fenacilo de ácidos grasos por CLAR.
- 2) Extraer los ácidos grasos de las PME y formar los ésteres fenacilo correspondientes.
- 3) Cuantificar el ABHM por CLAR en extractos de PME de *Salmonella typhi*.

## PARTE EXPERIMENTAL

## MATERIALES Y SOLUCIONES.

## 1.0. OBTENCION DE PME.

## 1.1. Cultivo bacteriano.

- Cepas bacterianas: *Salmonella typhi* O 901 y *Salmonella typhimurium* donadas por el Instituto Nacional de Higiene.
- Medio de cultivo: medio mínimo A.
- Solución de lavado: Hepes 10 mM pH 7.4.

## 1.2. Aislamiento de PME.

- Hepes 10 mM pH 7.4, Tritón X-100 al 2%.
- Tris 50 mM, EDTA 5mM pH 7.8, Tritón X-100 al 2%.

## 1.3. Purificación de PME.

- Tris 10 mM pH 7.7 adicionado de 2% de SDS.
- Tris 50 mM pH 7.7, SDS 2%, EDTA 5 mM, NaCl 0.4M y 0.05% de 2-mercaptoetanol.
- Columna Sephacryl S-200.
- Hepes 10 mM pH 7.4.

## 2.0. OBTENCION DE ACIDOS GRASOS DE SUSPENSIONES DE PME.

## 2.1. Precipitación de PME.

- Acetona a -20°C.

## 2.2. Hidrólisis de PME.

- NaOH 4N.
- HCl 4N.
- Cloroformo.
- $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro.

## 2.3. Cromatografía en Capa Fina (CCF) para ácidos grasos.

- Sistema de disolventes orgánicos: Cloroformo/Eter etílico/Acido acético 15:35:1.
- Placas de Aluminio de Silicagel 80 F<sub>254</sub>(Merck Co).

## 3.0. METODOS ANALITICOS.

### 3.1. Cuantificación de proteínas.

- Solución patrón de proteína: Albúmina sérica bovina al 0.1%.
- Carbonato de sodio al 2% (Solución alcalina).
- Tartrato de sodio y potasio al 2%.
- Sulfato de cobre pentahidratado al 1%.
- Reactivo de Folin-Ciocalteus.

### 3.2. Determinación de KDO.

- Solución patrón: KDO 1 mg/ml.
- Acido sulfúrico 0.2N.
- Acido peryódico 0.04M.
- Arsenito de sodio al 2.6%.
- Acido tiobarbitúrico 0.6%.
- Dimetil sulfoxido.

### 3.3. Cuantificación del ABHM.

#### 3.3.1. Obtención de los EFAG.

- Ácidos grasos 1 mg.
- *m*-bromoacetofenona 10mg/ml en acetona.
- Trietilamina 10 mg/ml en acetona.
- Ácido acético 2 mg/ml en acetona.

#### 3.3.2. CCF de EFAG.

- Sistema de disolventes orgánicos: Hexano/Eter etílico 90:10.
- Placas de Aluminio de sílicagel F<sub>254</sub>(Merck Co).

#### 3.3.3. CLAR.

- Columna: ODS C<sub>18</sub>, diámetro de partícula 5μ, diámetro interno 4.6 mm y longitud 25 cm.
- Fase móvil: Acetonitrilo/Agua 90:10.

### 4.0. Espectrofotometría de infrarrojo.

- Ácidos grasos: Láurico, mirístico, β-hidroxi mirístico y palmítico.
- *m*-bromoacetofenona.
- KBr.

## METODOS

## 1.0. OBTENCION DE PME

## 1.1. Cultivo y Cosecha de las cepas bacterianas

Las bacterias empleadas (*Salmoellea typhi* O 901 y *Salmonella typhimurium*) se cultivaron a 37°C durante 8 horas en medio mínimo A suplementado con 0.1% de extracto de levadura y 0.5% de glucosa, en un incubador rotatorio (New Brunswick Scientific Co.) a 200 rpm deteniendo el crecimiento hasta obtener 190 unidades Klett. Posteriormente las bacterias se cosecharon por centrifugación a 1 650 xg durante 15 minutos a 4°C en una centrífuga Sorvall RC5C (Sorvall Instruments Dupont); la pastilla bacteriana se resuspendio en amortiguador de Hepes 0.01 M pH 7.4 conservandose a -20°C hasta su uso.

## 1.2. Aislamiento de PME

La obtención de PME de las cepas trabajadas se realizó de acuerdo al método de Schnaitman (48), para ello las bacterias cosechadas en la fase de crecimiento logaritmico se ajustaron a una absorbancia de 1.0 a 690 nm; posteriormente se rompieron por sonicación (Lab line Ultratrip Labsonic system sonicator) por periodos de dos minutos a 180 watts en un baño de hielo, se le añadieron 200 µl de DNasa y RNasa, así como 0.5 ml de cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub> 1 M) por cada 10 ml de suspensión. El rompimiento celular se continuo hasta obtener una absorbancia de 0.3-0.4. Se centrifugo la suspensión sonicada a 7000 xg por 15 minutos a 5°C,

para eliminar las bacterias enteras. El sobrenadante obtenido se ultracentrifugó a 100 000 xg durante 45 minutos a 50°C (Ultracentrífuga Beckman LB-M) para sedimentar la envoltura celular, esta se solubilizó en Tritón X-100 al 2% en Hepes 0.01M pH 7.4. La fracción insoluble en Tritón X-100 (membrana externa y peptidoglicana) se separó por ultracentrifugación en las condiciones antes mencionadas y se resuspendió en Tris HCl pH 7.2, conteniendo 2% de Tritón X-100 y EDTA 5 mM. Seguido de una incubación a 37°C durante 10 minutos, se ultracentrifugó a 100 000 xg durante 45 minutos a 37°C. Las PME se recuperaron del sobrenadante y se mantuvieron a -70°C.

### 1.3. Purificación de PME

La obtención de porinas se efectuó empleando el método descrito por Nikaido (36). Las bacterias cosechadas en la fase logarítmica de crecimiento se ajustaron a una absorbancia de 1.0 a 660 nm, posteriormente se rompieron por sonicación en periodos de dos minutos en baño de hielo hasta disminuir la absorbancia a 0.3. Seguido de la eliminación de las bacterias completas por centrifugación a 7 000 xg por 15 minutos, la envoltura celular se obtuvo por ultracentrifugación a 100 000 xg por 30 minutos a 20°C, esta se solubilizó en Tris 10 mM pH 7.7 adicionado de 2% de SDS, se incubó 30 minutos a 32°C y se ultracentrifugó nuevamente. El sedimento se sometió a una segunda solubilización de acuerdo a las condiciones descritas anteriormente y por ultracentrifugación se obtuvo la peptidoglicana, las proteínas unidas a ella se extrajeron incubando 12 horas a 37°C, con Tris 50 mM pH 7.7 adicionado

de 2% de SDS, EDTA 5 mM, NaCl 0.4 M y 0.05% de 2-mercaptoetanol, se centrifugó a 100 000 xg por 30 minutos a 25°C; el sobrenadante se pasó a través de una columna de Sephacryl S-200 (80 cm x 2.6 cm, Pharmacia Chemical Co.) con una velocidad de flujo de 4.0 ml por hora, utilizando el mismo amortiguador para la solubilización de las PME. Se leyó la absorbancia a 280 nm de cada tubo, y se colectó el volumen que eluyó a 250 ml aproximadamente, donde se encontraban las porinas.

## 2.0. OBTENCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN SUSPENSIONES DE PME

### 2.1. Precipitación de PME

Las PME de *S. typhi* O 901 y *S. typhimurium* se precipitaron tomando un volumen de cada solución por seis volúmenes de acetona a -20°C; se dejó reposar durante 12 horas a -20°C. Posteriormente se centrifugó a 1 650 xg por 15 minutos, quedando en la pastilla las PME.

### 2.2. Hidrólisis de PME y obtención de ácidos grasos

A las PME precipitadas con acetona se les agregó 1 ml de NaOH 4N, colocando la solución en una ampolleta, la cual se selló y se calentó a 100°C por 5 horas. La hidrólisis se acidificó con 2 ml de HCl 4N y los ácidos grasos libres se extrajeron con cloroformo, posteriormente se adicionó Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, el extracto se filtró y el cloroformo fue evaporado en un baño maría.



### 2.3. CCF para ácidos grasos

Los ácidos grasos libres obtenidos anteriormente fueron analizados por CCF, utilizando como estándar los ácidos láurico ( $C_{12}$ ), mirístico ( $C_{14}$ ), ABHM (3-OH  $C_{14}$ ) y palmítico ( $C_{16}$ ) (Obtenidos por Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg de la República Federal Alemana), utilizando placas de silicagel y un sistema de disolventes orgánicos constituido por Cloroformo/Eter etílico/Ácido acético (15:35:1), revelando las placas en una cámara de yodo.

## 3.0. METODOS ANALITICOS

### 3.1. Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas en las suspensiones de PME se determinó por el método de Lowry (29), utilizando albúmina sérica bovina como proteína de referencia.

### 3.2. Determinación de LPS por KDO

El contenido de LPS presente en las suspensiones de PME y porinas se determinó en forma indirecta cuantificando el contenido de KDO de acuerdo al método de Karkhanis (25). Empleando una curva de calibración de KDO (Sigma Co.).

A 50  $\mu$ l de solución de proteínas se le añadió 1 ml de ácido sulfúrico 0.2N, se calentó a 100°C durante 30 minutos; se dejó enfriar la solución, se centrifugó a 4 000 xg, se tomó 0.5 ml del sobrenadante y se le adicionó 0.25 ml de ácido peryódico 0.04N en ácido sulfúrico 0.125N, dejando reposar esta solución 20 minutos a

temperatura ambiente. Se agregó 0.25 ml de arsenito de sodio al 2.6% en ácido clorhídrico 0.5M esperando hasta que desaparezca la coloración café; posteriormente se le adicionó 0.5 ml de ácido tiobarbitúrico 0.6%, calentando la solución a 100°C por 15 minutos, finalmente se le añadió en caliente 1 ml de dimetilsulfóxido, leyendo la absorbancia a 540 nm.

### 3.3. Determinación de LPS por el ABHM

#### 3.3.1. Obtención de EFAG

La preparación de los ésteres se realizó por el método de Wood y Lee (53), a 1 mg del ácido graso se le adicionó 250 µl de una solución de *m*-bromoacetofenona (10 mg/ml en acetona) y 250 µl de trietilamina (10 mg/ml en acetona), calentando la solución por 15 minutos a ebullición en baño maría, dejando enfriar la solución para posteriormente adicionarle 750 µl de ácido acético (2 mg/ml en acetona), calentando 5 minutos y finalmente se evaporó el disolvente por calentamiento.

#### 3.3.2. CCF de EFAG.

Se derivaron los ácidos grasos libres obtenidos por PME, conforme al método de Wood y Lee y fueron analizados por CCF, utilizando como estándares los EFAG de los ácidos laurico, mirístico, β-hidroxi mirístico y palmítico, en placas de silicagel fluorescentes y un sistema de disolventes orgánicos de Hexano/Eter etílico (90:10).

#### 3.3.3. Espectro de absorción del EFAGM.

Después de realizada la CCF del EFAGM en las condiciones antes mencionadas, se rasparon las manchas que correspondían al

EFABM, se le adiciono acetona, se filtro y posteriormente se evaporó el disolvente. El extracto se disolvió en acetonitrilo y se trazó su espectro de absorcion en la region ultravioleta, conjuntamente con el ABHM y *w*-bromoacetofenona.

#### 3.3.4. CLAR.

Los EFAB obtenidos de las PML y los estandares de acidos grasos, se analizaron por CLAR, en las siguientes condiciones:

Columna: ODS C<sub>18</sub>

Eluyente: Acetonitrilo/Agua (90:10) (Merck Co. grado HPLC)

Velocidad de Flujo: 1 ml/min (presión 55-60 atm)

Volumen de muestra: 20 µl

Rango: 0.1 AUFS

Longitud de Onda: 242 nm (Beckman 165 Variable Wavelength

Detector)

Atenuacion: 4, 8 y 32

Velocidad de la Carta: 0.25 cm/min (Beckman 427 Integrator)

#### 4.0. ESPECTROFOTOMETRIA DE INFRARROJO

##### 4.1. Espectrometria de Infrarrojo de estándares y reactivos.

Se trazaron los espectros de infrarrojo a los estandares de ácidos grasos, laurico, mirístico, ABHM y palmitico, para comprobar que se estaba trabajando con los acidos respectivos. Tambien se le trazo el espectro a la *w*-bromoacetofenona.

Los espectros de infrarrojo se muestran en las figuras 6,7,8,9 y 10 respectivamente.

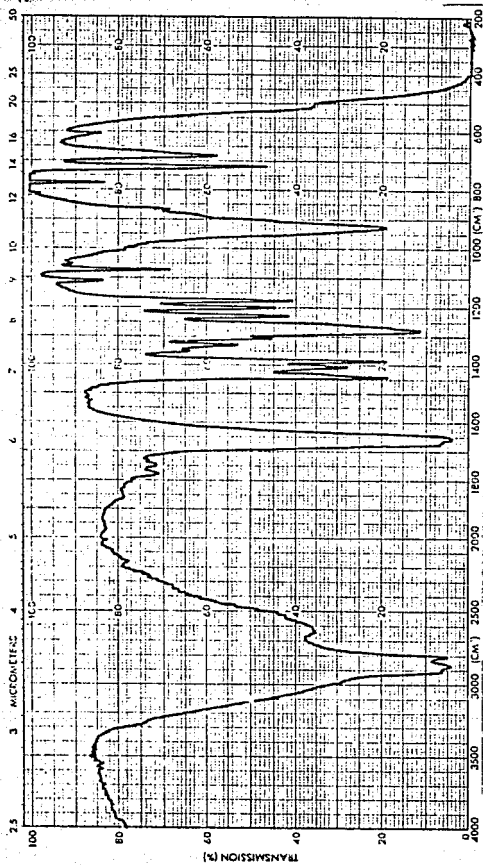


Figura 6. ESPECTRO DE INFRARROJO DEL ACIDO LAURICO.

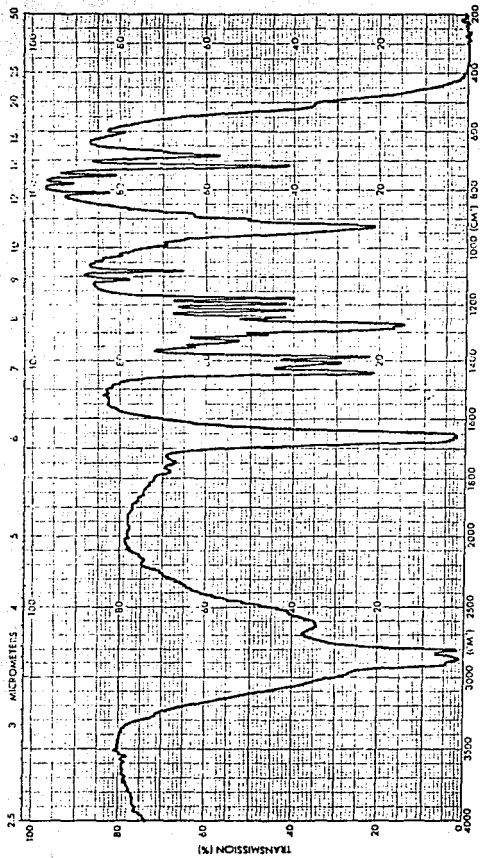


Figura 7. ESPECTRO DE INFRARROJO DEL ACIDO MIRISTICO

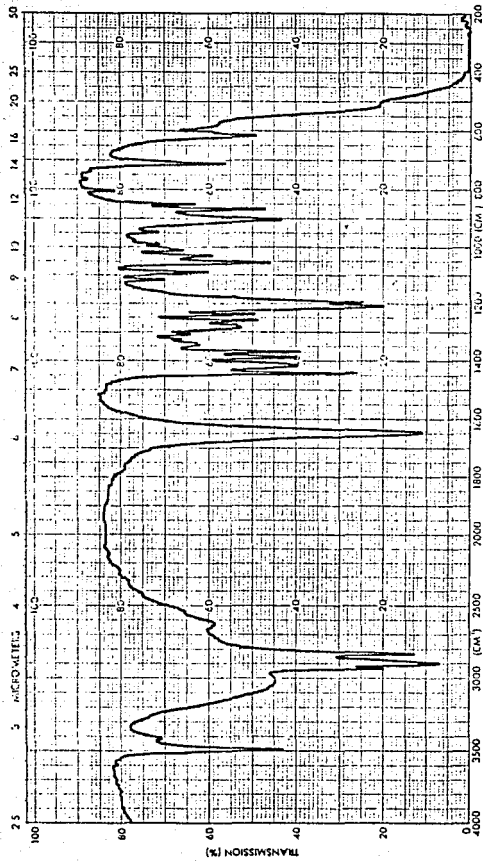


Figura 8. ESPECTRO DE INFRARROJO DEL ABHM

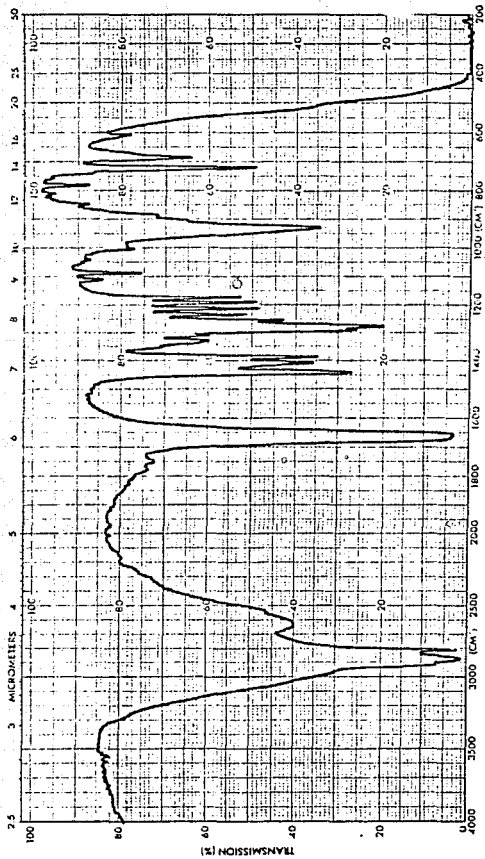


Figura 9. ESPECTRO DE INFRARROJO DEL ACIDO PALMITICO

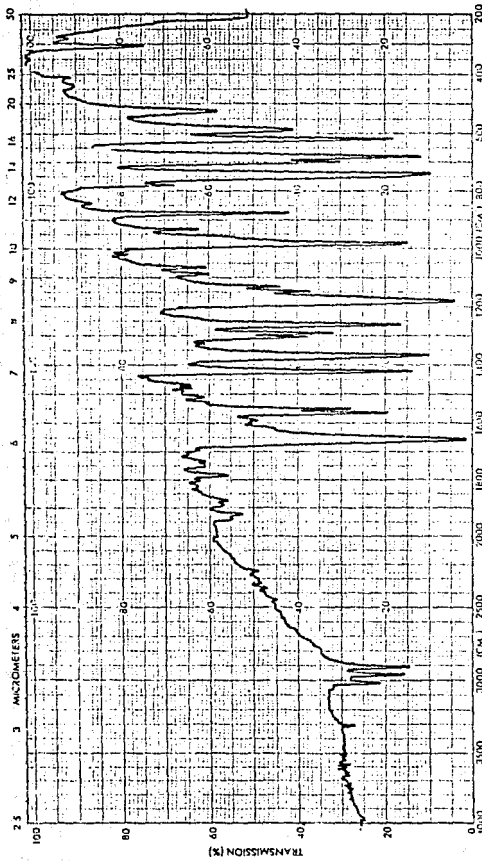


Figura 10. ESPECTRO DE INFRARROJO DE LA p-BROMO ACETOFENONA



## RESULTADOS

## 1.- OBTENCION DE PME

La suspensión de PME de *Salmonella typhi* O 901 obtenidas por el método de Schnaitman, contenía 1.43 mg/ml de proteína.

## 2.- PURIFICACION DE PME

Las porinas de *Salmonella typhimurium* obtenidas por el procedimiento descrito por Nikaído, tuvieron una concentración de proteínas de 1 mg/ml.

## 3.- DETERMINACION DE KDO EN PME

Se elaboró inicialmente una curva de calibración de KDO, utilizando el método de Karkhanis, los resultados obtenidos se enlistan en la Tabla I.

En la Figura 11 se observa la gráfica de Absorbancia (Abs) vs concentración de KDO.

Se determinó la contaminación por LPS, cuantificando el contenido de KDO en las proteínas obtenidas por los métodos de Schnaitman y Nikaído, observándose la ausencia de KDO en proteínas purificadas por el método de Nikaído (Tabla II).

## CALCULOS:

$$\% \text{ KDO} = \frac{\text{KDO } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) \text{ en PME}}{\text{PME } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) \times 50 \mu\text{l}} \times 100$$

Tabla 1. CURVA DE CALIBRACION DE KDU

Concentración de KDU en $\mu\text{g/ml}$	Absorbancia 548 nm
2	0.1373
4	0.2566
6	0.3505
8	0.4918
10	0.6243
15	0.9382
20	1.2967

## Ecuación de la recta

$y = mx + b$  donde:

$m = 0.0636$

$m$  = pendiente de la recta

$b = -0.0083$

$b$  = intercepto

$r = 0.9993$

$x$  = Concentración de KDU ( $\mu\text{g/ml}$ )

$r^2 = 0.9986$

$y$  = Absorbancia a 548 nm

$r$  = Coeficiente de correlación

$r^2$  = Coeficiente de determinación

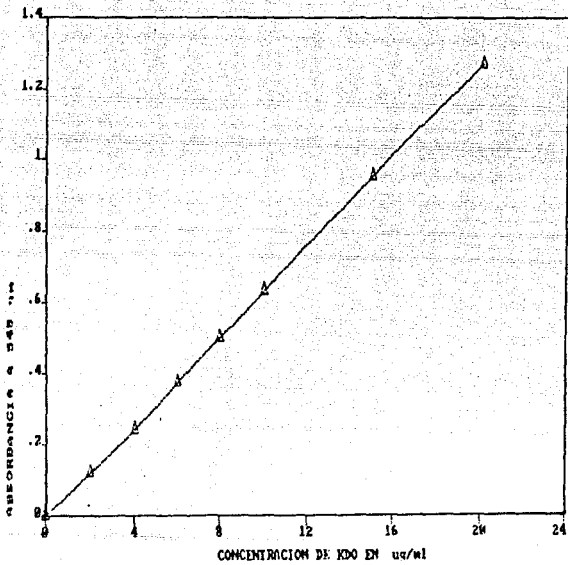


Figura 11. GRAFICA DE ABSORVANCIA VS CONCENTRACION DE KDO

Tabla II. INDICE DE CONTAMINACION DE LPS POR KDO EN PME

Método de Obtención de proteínas	Absorbancia a 548nm	Concentración de XKDO KDO en µg/ml	
Schaitman (proteínas de <i>S.</i> <i>typhi</i> 0 901)	0.2857	4.6	8.4
Nikaldo (proteínas de <i>S.</i> <i>typhimurium</i> )	0.0000	0.0	0.0

## 6.- ESPECTRO DE ABSORCIÓN EN EL ULTRAVIOLETA DEL EFABM

En la Figura 12 se muestra el espectro de absorción del ABHM, la *m*-bromo acetofenona y el EFABM, donde se puede notar que el ABHM no absorbe considerablemente en la región del ultravioleta.

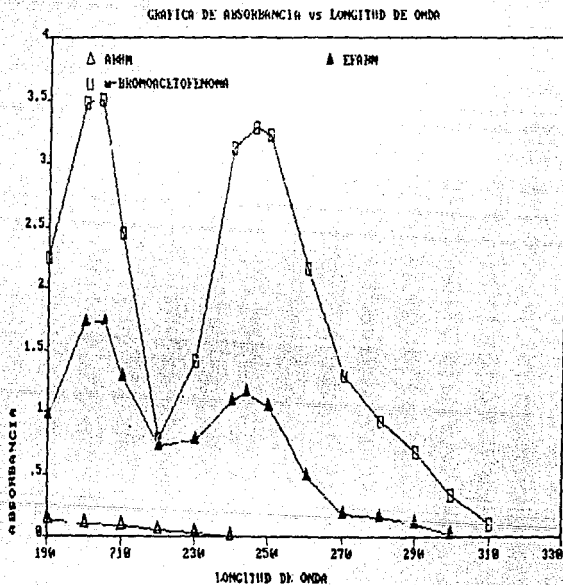


Figura 12. GRAFICA DE ABSORBANCIA vs LONGITUD DE ONDA

#### 4.- ANALISIS DE LOS EFAG POR CLAR

Los EFAG obtenidos por el método de Wood y Lee, se analizaron por CLAR en las siguientes condiciones.

Se obtuvo el cromatograma de los ésteres fenacilo de los ácidos: láurico (EFAL), mirístico (EFAM), EFABM y palmítico (EFAP) (Figura 13), con un tiempo de retención de 11.32, 15.69, 8.91, y 19.25 minutos respectivamente; donde se observa que el EFABM tiene el tiempo de retención más pequeño que los otros ácidos grasos.

#### 5.- CURVA DE CALIBRACION DEL EFABM POR CLAR

La cuantificación del EFABM se realizó por el método de Estandar Externo.

En la Figura 14 se muestra el cromatograma del EFABM.

La Tabla III presenta los resultados de la curva de calibración del EFABM y en la Figura 15 se observa la gráfica del ABC vs cantidad de EFABM en ng.

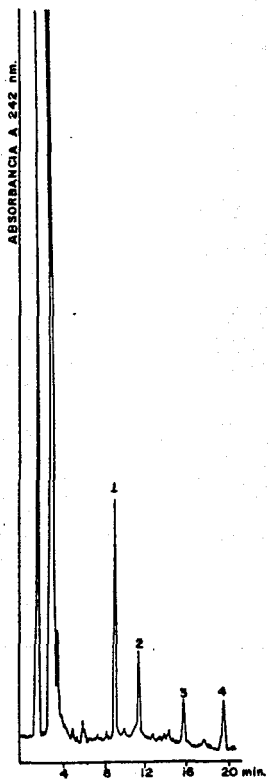


Figura 13. CROMATOGRAMA DE LOS EFAG DONDE 1=EFBM (8.91), 2=EFAL (11.32), 3=EFAM (15.89), 4=EFAP (19.25).

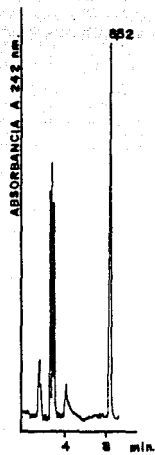


Figura 14. CROMATOGRAMA DEL EFABM



Tabla III. CURVA PATRON DEL EFABM ANALIZADO POR CLAR

Cantidad del EFABM (ng)	ABC*
5	4.784
10	9.202
20	18.775
40	38.325
80	80.605

\*Valor promedio de cinco determinaciones

Ecuación de la recta:

$$y = mx + b$$

donde

$$m = 1.007$$

$$b = -0.74$$

$$r = 0.9996$$

$$r^2 = 0.9992$$

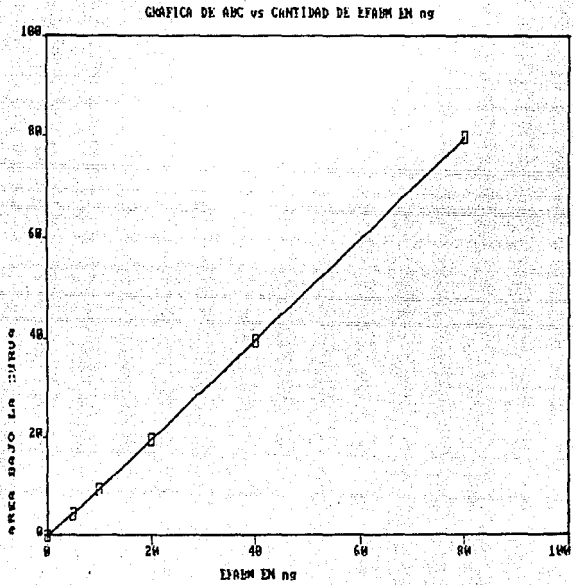


Figura 15. GRAFICA DE ABC vs CANTIDAD DE EFABM EN ng

## 7.- DETERMINACION DEL ABHM EN PME POR CLAR

Una vez obtenidos los ácidos grasos libres de las PME, se analizó el extracto por CCF, verificando la presencia del ABHM. Posteriormente se formaron los LFAG y se analizaron por CLAR.

Los cromatogramas de los extractos provenientes de las proteínas obtenidas por los métodos de Schnaitman y Nikaido, se muestran en las Figuras 16 y 17 respectivamente, donde se observa que el EFABM se encuentra en mayor concentración en las proteínas obtenidas por el método de Schnaitman, en comparación con las obtenidas por el método de Nikaido.

El porcentaje de contaminación de LPS determinado por el EFABM en PME se presenta en la Tabla IV.

CALCULOS:

$$\% \text{ABHM} = \frac{\text{mg de EFABM en PME}}{\text{PME mg/ml} \times 1 \text{ ml}} \times 100$$

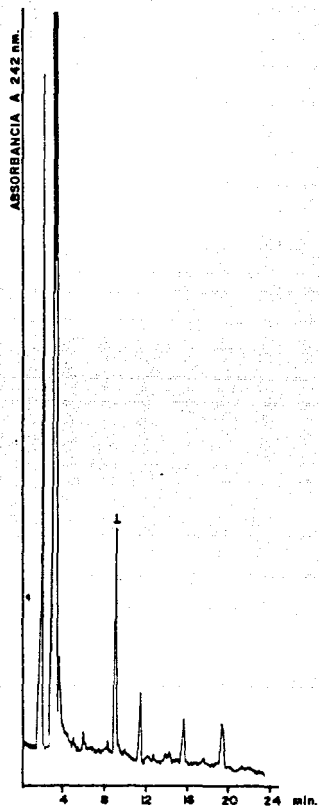


Figura 16. CROMATOGRAMA DE PME OBTENIDAS POR EL METODO DE SCHNAITMAN DONDE 1-EFABM (8.91 min).

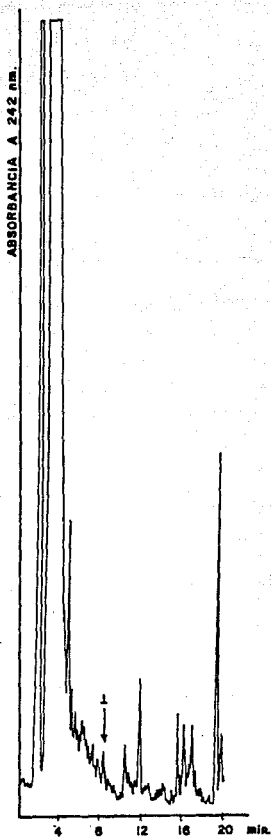


Figura 17. CRUMATOGRAMA DE PME OBTENIDAS POR EL METODO DE NIKAIDO  
DONDE 1=EFABM (8.28 min).

Tabla IV. INDICE DE CONTAMINACION DE LPS POR EL ABHM EN PME

Método de obtención de proteínas	ABC*	Concentración del EFABM en µg/ml	% ABHM en PME
Schnaibman	53.305	2.705	3.78
Nikaido	7.337	0.415	0.041

\*valor promedio de cinco determinaciones.

## 6.- COMPARACION DEL INDICE DE CONTAMINACION POR LPS EN PME

Se determinó el índice de contaminación por LPS, cuantificando dos compuestos químicamente diferentes que forman parte de éste; los cuales fueron el KDO y el ABHM.

En la Tabla V se observa que la cuantificación del E'ABM por CLAR, detecta cantidades mas pequeñas de LPS en comparación con el método de Karkanis.

Tabla V. INDICE DE CONTAMINACION POR LPS EN PME

Método de obtención en proteínas	% de Contaminación de LPS	
	KDO	ABHM
Schnaitman	6.4	3.78
NIKaldo	0.0	0.041

## DISCUSION

Experimentos previos han demostrado que las PME de *S. typhi*, obtenidas por el método de Nikaído, aparentemente se encuentran libres de KDO (22), pero al ser utilizadas como inmunógenos en conejos, además de producir anticuerpos anti-PME inducen la formación de anticuerpos específico anti-LPS, indicando la presencia de endotoxina. Por esta razón es importante determinar la cantidad de LPS en PME.

Para establecer el porcentaje de contaminación por LPS en las PME, se utilizó el método de Karkanis (25). Este método tiene una sensibilidad de 1µg/ml, por lo que no se detectó su presencia en las PME extraídas por el método de Nikaído, en el cual las concentraciones de LPS son menores. Por lo tanto el presente trabajo consistió en encontrar un método analítico más sensible para la determinación del LPS. Esto se logró cuantificando el ABHM por CLAR.

Los ácidos grasos no absorben en la región ultravioleta, por lo que fue necesario formar los derivados de los EFAG (53), ya que estos al tener en su molécula un grupo aromático presentan mayor absorción (Figura 12), facilitando su separación y detección por CLAR. El cromatograma que se obtuvo para los EFAG (Figura 13) muestra el orden de elución de los EFAL, EFAM, EFAM y EFAI. Estos resultados indican, que el tiempo en que tardan en salir de la columna, los distintos derivados de fenacilo, está relacionado tanto con el número de átomos de carbono como con la afinidad de



estos por la fase estacionaria. Así el EFAP, es el último en eluir por tener una longitud de cadena de 16 carbonos, a comparación del EFAL que está constituido por solo 12 carbonos. Por otro lado, el EFABM tiene el tiempo de retención más pequeño de los 4, debido a que la incorporación del grupo hidroxilo a la cadena hidrocarbonada, le confiere mayor polaridad y menor afinidad por la fase estacionaria.

El cromatograma de las PME de *S. typhi* O 901 obtenidas por el método de Schnitman (figura 16) muestra la presencia del EFABM. Sin embargo el cromatograma de las PME de *S. typhimurium* obtenidas por el método de Nikaido (figura 17), se observa que el pico del EFABM se encuentra en menor proporción que el anterior. Al obtener el porcentaje de contaminación de LPS por ABHM para los dos métodos de extracción de proteínas, se encontró que las PME de *S. typhimurium* tienen un índice de contaminación menor que las PME obtenidas por el método de Schnitman; lo cual indica que por el método de Nikaido, se pueden obtener las PME con menos porcentaje de contaminación por LPS.

Comparando los dos métodos que se emplearon para determinar la contaminación por LPS en PME (Tabla V), se observó que la CLAK es más sensible que el de Karkanis. Por lo tanto el hecho de que las PME de *S. typhimurium* no muestren KDO, no significa que se encuentren libres de LPS.

Por otro lado, se puede observar que el porcentaje de contaminación por LPS determinado por KDO y por ABHM no es igual, ya que el KDO se encuentra en mayor porcentaje. Esto se puede explicar tomando como base la estructura del Lipido A de *S.*

*typhimurium* (35,38,43); en el hay 3 moléculas de KDO por 2 de ABHM, dando una relación de KDO/ABHM de 1.5. Los resultado de este trabajo mostraron que la relación KDO/ABHM fue de 1.6. Con esto podemos deducir que en *S. typhi* O 901 la relación de KDO/ABHM en el lípido A es igual que en *S. typhimurium*.

Si el porcentaje de contaminación por el ABHM en proteínas de *S. typhimurium* obtenidas por el método de Nikaido fue de 0.041 y guarda la relación anterior, significa que el porcentaje de KDO sera de 0.0615%, por lo que no se puede detectar por el método de Karkhanis.

## CONCLUSIONES

1.- El método de Karkhanis es adecuado para cuantificar el KDO del LPS, como contaminante en PME obtenidas por el método de Schnaitman.

2.- El método analítico de CLAR, para la separación y cuantificación del CRABM como índice de contaminación de LPS en PME de *Salmonella* (extraídas por el método de Nikaido), resultó ser muy sensible ya que fue capaz de cuantificar cantidades tan pequeñas de LPS que no son detectadas por el método de Karkhanis.

3.- La relación de KDO/ABHM, encontrada en forma experimental en *S. typhi* O 901, fue de 3/2 respectivamente. Lo anterior va de acuerdo a la estructura química del Lipido A reportada para *S. typhimurium*.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Aveliano, M., Van Rollins, M. and Horracks, L.A. 1983. Separation and quantification of free fatty acid and fatty acid methyl esters by reverse phase high pressure liquid chromatography. *J. Lip. Res.* 24:83-93.
- 2.- Batley, M., Mc Nicholas, P.A., Packer, N.H. and Redmond, J. 1984. Analysis of Lipid A from *Salmonella minnesota* R595 Lipopolysaccharide by chemical methods and Nuclear Magnetic Resonance. *Rev. Infect. Dis.* 6(4):449-451.
- 3.- Baty, J.D. and Willis, R.G. 1986. A Comparison of methods for the High-Performance Liquid Chromatographic and Capillary Gas-Liquid Chromatographic analysis of fatty acid esters. *J. Chromatogr.* 353:319-328.
- 4.- Bhatnagar, N., Müller, W. and Schlecht, S. 1982. Proteins from *Salmonella* K-mutants mediating protection against *Salmonella typhimurium* infection in mice. I. Preparation of proteins free from Lipopolysaccharide using various Chromatographic methods. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig.A.* 252:88-101.
- 5.- Borch, Richard F. 1975. Separation of long chain fatty acids as phenacyl esters by High Pressure Liquid Chromatography. *Anal. Chem.* 47(14):2437-2439.
- 6.- Buchanan, P.M. and Arka, R.J. 1977. Immunity to gonococcal infection induced by vaccination with isolate outer membrane of *Neisseria gonorrhoeae* in ginea pigs. *J. Infect. Dis.* 135:879-887.
- 7.- Cooper, M.J. and Anders, M.W. 1977. Determination of long chain fatty acid as 2-Naphtacyl esters by High Pressure Liquid Chromatography and Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 46(12):1849-1854.
- 8.- Davis, B.D., Dalbecco, R., Eisen, H.N., Gingberg, H.S. and Wood W.B. *Tratado de Microbiología*, 2a. edición. Ed. Salvat editores, Barcelona, 1983.
- 9.- Di Rienzo, J., Nakamura, K., Inouye, Y. 1978. The outer membrane protein of gram-negative bacteria: biosynthesis assembly and functions. *Ann. Rev. Biochem.* 47:481-523.
- 10.- Droge, W., Lehmann, V., Lüderitz, O. and Westphal, O. 1970. Structural Investigations on the 2-keto-3-Desooxioctanate Region of Lipopolysaccharides. *Eur. J. Biochem.* 14:175-184.
- 11.- Durst, H.D., Milano, M., Kikta, E.J., Connelly, S.A. and Brushka, E. 1975. Phenacyl esters of fatty acid via crown ether catalysis for enhanced ultraviolet detection in liquid chromatography. *Anal. Chem.* 47(11):1797-1801.

- 12.- Einsestein, T.K. and Argerman. 1978. Immunity to experimental *Salmonella* infection: Studies on the protective capacity and immunogenicity of Lipopolysaccharide, acetone killed cells and ribosome-rich extracts of *Salmonella typhimurium* in C3H/HeJ and CD-1 mice. *J. Immunol.* 121:1010-1014.
- 13.- Engelhardt, H. and Elgass, H. 1978. Optimization of gradient elution separation of fatty acid phenacyl esters. *J. Chromatogr.* 158:249-259.
- 14.- Germanier, R. The live oral typhoid vaccine ty 21a: Recent field trial results. Sclavo International Conference on Bacterial Vaccines and local Immunity. Siena, Italy. p.p. 10-12.
- 15.- Germanier, R. 1977. Situación actual de la inmunización contra la Fiebre tifoidea. *Bol. of Sanit. Panam.* 82:300-311.
- 16.- Germanier, R. and Furer, E. 1975. Isolation and characterization of *S. typhi* gal t mutant ty 21a: A candidate strain for a live typhoid vaccine. *J. Infect.* 131:553-558.
- 17.- Gmeiner, J. and Martin, H. 1976. Phospholipid and Lipopolysaccharide in *Proteus mirabilis* and its stable protoplast L-form. *Eur. J. Biochem.* 67:487-494.
- 18.- Halgunset, J., Lund, E.W. and Sunde, A. 1982. Improved separation of biologically relevant C<sub>14</sub>-C<sub>20</sub> fatty acids by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 237:496-499.
- 19.- Hamilton, J.G. and Comai, K. 1984. Separation of neutral lipids free fatty acids by high-performance liquid chromatography using low wavelength ultraviolet detection. *J. Lip. Res.* 25:1142-1148.
- 20.- Hoffman, N. E. and Liao, J.C. 1976. High Pressure Liquid Chromatography of *p*-Methoxyanilides of fatty acids. *Anal. Chem.* 48:1104-1106.
- 21.- Ikeda, M., Shimada, K. and Sakaguchi, T. 1983. High-Performance Liquid Chromatographic determination of free acid with 1-Naphthylamine. *J. Chromatogr.* 272:251-259.
- 22.- Isibasi, A., Calva, E., Ortiz, V., Fernandez, M., Hernandez, A. y Kumate, J. 1985. Vacunas contra la fiebre tifoidea a partir de antígenos de membrana externa. Simposio Avances en el Uso de Vacunas, 1985-1985. p.p. 109-115.
- 23.- Joklik, W.K., Willet, H.P. and Amos, D.B. Zinsser Microbiology 17<sup>th</sup> Ed. Appleton Century Crofts. p. 106-134.
- 24.- Joo, I. 1970. Present status and perspectives of vaccination against typhoid fever. In: International conference on the

Application of Vaccines against Viral Rickettsial and Bacterial Diseases of Man, D.C. E.U.A. PAHO/WHO Scientific Publication 226:329-341.

- 25.- Karkhanis, Y., Zelther, J. and Carlo, D. 1978. A New Improved Microassay to Determine 2-ceto-3-deoxyoctanate in lipopolisaccharide in Gram-Negative Bacteria. Anal. Biochem. 85:595-601.
- 26.- Kumate, J. 1977. Inmunidad, inmunización y vacunas. 2a. edición. Ediciones médicas del Hospital Infantil de México, p.p. 227-241.
- 27.- Kussi, N., Normien, M., Sasen, H., Valtonen, M. and Makela, T. 1981. Immunization major outer membrane protein (porin) preparation in experimental murine Salmonellosis. Effects of Lipopolisaccharide. Infect. Immun. 34:328-332.
- 28.- Levine, M.M., Dupont, H. L. Hornick, R.B., Snyder, M.S. Woodward, W., Gilman, H.K. and Libonatti, J.P. 1978. Attenuated, streptomycin dependent *Salmonella typhi* oral vaccine: Potential deleterious effects of Lyophilization. J. Inf. Dis. 133:424-429.
- 29.- Lowry, O.H. and Rosebrough, Farr, A.L. 1951. Protein measurement with the phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275.
- 30.- Lüderitz, O., Galanos, D., Lehnam, M., Nurminel, E.T., Rietschel, E., Rosefeldel, M. and Westphal, O. 1973. Lipid A: Chemical structure and biological activity. J. Inf. Dis. 128 (9Supl) 9.
- 31.- Lüderitz, O., Yamamoto, K., Galanos, C., Makenzie, G.R., Brade, H., Zohringer, U., Rietschel, E., Kusumoto, S. and Shiba, T. 1984. Lipopolisaccharides: Structural principles and biologic activities. Rev. Infect. Dis. 6(4):428-431.
- 32.- Lugtenberg, B. and L. Van Alphen. 1983. Molecular Architecture and Functioning the Outer Membrane of *Escherichia coli* and other Gram-Negative Bacteria. Biochim. Biophys. Acta. 737:51-115.
- 33.- Miura, T. and Mizushima, S. 1968. Separation by density gradient centrifugation of two types of membranes from seroplast membrane of *Escherichia coli*. Biochim. Biophys. Acta. 150:159-161.
- 34.- Miwa, H., Hiyama, C. and Yamamoto, M. 1985. High-Performance Liquid Chromatography of short- and long-chain fatty acid as 2-Nitrophenylhydrazides. J. Chromatogr. 321:165-174.
- 35.- Munson, R. Rasmussen, N. and Osborn, M. 1978. Biosynthesis of Lipid A Enzymatic Incorporation of 3-Deoxy-U-Mannoflucosinate

into a precursor of Lipid A in *Salmonella typhimurium* J. Biol. Chem. 253:1503-1511.

- 36.- Nikaïdo, H. 1983. Proteins forming large channels form bacterial and mitochondrial outer membranes: porins and lambda receptor protein. Methods in Enzymology. 95:85-100.
- 37.- Nikaïdo, H. and Nakae, I. 1979. The Outer Membrane of Gram-Negative Bacteria. Ad. Microb. Physiol. 20:163-250.
- 38.- Nikaïdo, H. and Vaara, M. 1985. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability. Microbiol. Rev. 49:1-32.
- 39.- Osborn, M.J., Garder, J.E., Parisi, E. and Carson, J. 1972. Mechanism of assembly of outer membrane of *Salmonella typhimurium*. Isolation and characterization of cytoplasmic and outer membrane. J. Biol. Chem. 247:3962-3972.
- 40.- Osborn, M. and Wu, C. 1980. Proteins of the Outer Membrane of Gram-Negative Bacteria. Ann. Rev. Microbiol. 34:369-432.
- 41.- Palva, E.T. and Makela, P. 1980. Lipopolisaccharide heterogeneity in *Salmonella typhimurium* analyzed by sodium dodecyl sulfato polyacrylamide gels. J. Biochem. 107:137-143.
- 42.- Perez, M.A. y Cabrera, R. 1974. Medidas empleadas en la infeccion tifoïdica. Rev. Salud Publica de Mexico XV:165-194.
- 43.- Qureshi, N. and Takayama, K. 1982. Purification and Structural Determination of Nontoxic Lipid A Obtained from the Lipopolisaccharide of *Salmonella typhimurium*. J. Biol. Chem. 257:11808-11815.
- 44.- Rezanka, I. and Podojil, M. 1985. Gradient separation of fatty acid (C<sub>14</sub>-C<sub>30</sub>) by reversed-phase high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. 346:453-455.
- 45.- Reitman, M. 1967. Infectivity and antigenicity of streptomycin depend *Salmonella typhosa*. J. Infect. Dis. 117:101-107.
- 46.- Rietschel, E., Gottert, H., Lüdetirtz, O. and Westphal, O. 1972. Nature and linkages of the fatty acid present in the Lipid A component of *Salmonella* Lipopolisaccharides. Eur. J. Biochem. 28:166-173.
- 47.- Rietschel, E., Wollenweber, H., Kussa, R., Brade, H. and Zähringer, U. 1984. Concepts of the chemical structure of Lipid A. Rev. Infect. Dis. 6(4):432-438.
- 48.- Schnaitman, C.A. 1971. Effect of ethylenediamine tetracetic acid, Triton X-100 and lysozyme on the chemical composition of the wall of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 108:553-556.

- 49.- Tsuchiya, H., Hayashi, I., Sato, M., Iatsumi, M. and Takagi, N. 1984. Simultaneous on separation and sensitive determination of free fatty acids in blood plasma by High-Performance Liquid Chromatography. J. Chromatogr. 309:43-52.
- 50.- Wadhani, M.H., Dupont, H.L., Hornick, K.B., Snyder, M.S., Woodward, W., Gilman, H.R. and Libonatti, J.P. 1976. Attenuated, streptomycin dependent *Salmonella typhi* oral vaccine: Potential deleterious effects of Lyophilization. J. Inf. Dis. 133:424-429.
- 51.- Weinbaum, G., Kadis, S., S.J. Aji. Microbial Toxins. Volume IV, Bacterial Endotoxins. C. hapter 4. Academic Press Inc. 1971, New York.
- 52.- Wollenweber, H., Schlecht, S., Lüderitz, O. and Rietschel, E. 1983. Fatty Acid in Lipopolisaccharides of *Salmonella* Species Grown at Low Temperature Identification and Position. Eur. J. Biochem. 130:1667-171.
- 53.- Wood, R. and Lee, T. 1983. High-Performance Liquid Chromatography of Fatty acid: Quantitative analysis of saturated, monoenoic, polyenoic and geometrical isomers. J. Chromatogr. 25:237-246.
- 54.- Yamaguchi, M., Matsunaga, R., Hara, S., Nakamura, M. and Okura, Y. 1986. Highly sensitive determination of free fatty acid in human serum by High-Performance Liquid Chromatography with luorescence detection. J. Chromatogr. 3/5:27-35.