UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS QUIMICAS

ANALISIS DE UNA PROTEINA
POR EL
METODO DE VAN SLYKE

T E S I S

QUE PRESENTA EL ALUMNO

IGNACIO DESCHAMPS A.

EN SU EXAMEN PROFESIONAL DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

MEXICO 1946

TALLERES LINOTIPOGRAFICOS DE LA EMPRESA EDITORIAL "BEATRIZ DE SILVA" — ITURBIDE NUM. 26 — MEXICO, D. F.

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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 esta 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.

A mis queridos padres

con inmenso cariño y gratitud

A mis hermanos

A mis profesores todos

de la Escuela Nacional de Ciencias Químicas

Al Colegio Francés de Preparatoria

Al Dr. Marcel Bachstez

quien con tanto desinterés y cariño aceptó dirigirme el presente trabajo facilitándome todos los medios a su alcance, en los Laboratorios Química Coyoacán, S. A.

Para él y para la empresa que tan dignamente dirige, la expresión sincera de mi gratitud y consideración.

SUMARIO

INTRODUCCION

Pág.

Antecedentes, descripción del material, datos histórico 13

CAPITULO I

DEL ANALISIS PROTEICO 17
Descripción general de métodos:
Método de esterificación (Fischer) 17
Método del alcohol butílico de Dakin 17
Método de transporte eléctrico 18
Método de Van Slyke 18
Curso general del trabajo 19

CAPITULO II

PREPARACION DEL MATERIAL 21
A.—Operaciones preliminares 21
B.—Operaciones previas a la hidrólisis 21

CAPITULO III

HIDROLISIS 23
Descripción general, control.
Hidrólisis ácida 24
Hidrólisis básica 24
Hidrólisis enzimática 25
Determinación de melanina insoluble 28
Determinación de melanina soluble 28
Determinación de melanina (Túngstico) 29
Determinación de nitrógeno total 30
Determinación de amoníaco 32
Determinación de nitrógeno amígeno 35
Resumen de valores 35

CAPITULO IV

ANALISIS DE LAS "BASES" 37
Determinación de nitrógeno amígeno 37
Distribución del nitrógeno de las bases 38
Arginina 39
Histidina 40
Cistina 41
Lisina 41
Resumen de valores 42

CAPITULO V

Págs.

Análisis del "Filtrado de las Bases" 43
Nitrógeno amígeno 43
Nitrógeno no amígeno 44
Prolina y Oxiprolina 44
Distribución general del nitrógeno 45
Análisis general 46
Apéndice.—Determinación del nitrógeno amígeno 47

BIBLIOGRAFIA

A.—Referencias de la parte zoológica e histórica 51
B.—Obras de consulta y referencias de la parte química 51

ILUSTRACIONES:

Fig. 1.—Microfotografía de los huevecillos 14
Fig. 2.—Huevecillo esquematizado presentando su base de fijación 15
Fig. 3.—Aparato de Van Slyke 26
Fig. 4.—Dispositivo de Claisen de destilación al vacío 29
Fig. 5.—Aparato empleado en la determinación de Argina 39
Fig. 6.—Bureta de gases (aparato de Van Slyke) 48
Fig. 7.—Cámara de adsorción (aparato de Van Slyke) 49
Fig. 8.—Deaminizador (aparato de Van Slyke) 49

Introducción

La importancia cada vez mayor que en los últimos años han adquirido las proteín por lo que a su contenido en "aminoácidos" se refiere, especialmente si se les juzga desa el punto de vista de la nutrición y si se toma en cuenta el papel que juegan en el aspect bioquímico, me ha inducido a adoptar el tema de su análisis como tesis.

La necesidad de orientar el estudio de las proteínas hacia la investigación de si aminoácidos, plantea el problema de utilizar métodos de control suficientemente segur como para lograr una valoración de las mismas.

De los métodos conocidos en la actualidad, he escogido el de Van Slyke por par cerme que se adapta convenientemente al análisis proteico y por requerir cantidades rel tivamente pequeñas de material.

Por otra parte, he considerado de interés referir mi estudio a un producto nacion que de tiempo atrás ha venido atrayendo la curiosidad no sólo de investigadores mexicano sino también de científicos ajenos a nuestro medio.

El producto en cuestión es el Ahuautle, conocido de tiempo inmemorial y que h servido de alimento a los indios de la vasta región lacustre de Texcoco y de otras zon del Distrito Federal.

Anteriormente a este trabajo, el Dr. Marcel Bachstez, director técnico de los labor torios "Química Coyoacán, S. A.", había publicado un interesante estudio químico (1) sobr este producto, que mostraba un alto contenido en proteínas, lo que hacía pensar que t vez fuera esta fracción la de mayor interés tanto desde el punto de vista científico, cuan del comercial, si se toman en cuenta las importaciones europeas del producto antes de guerra, que llegaron a ser considerables y las frecuentes gestiones de químicos extranjer tendientes a conocer de los trabajos realizados en esta materia.

A continuación trataré de hacer una descripción del material así como a present algunos datos históricos que aunque no forman parte del trabajo, servirán para ilustr en alguna forma lo referente al producto para pasar después de lleno a considerar el a pecto del análisis proteico.

El Ahuautle.—*El "ahuautle" de Atl-agua y Huatli-bledo; bledo del agua, (semilla alegría), es el nombre que se dió a los huevos de insectos que guardan semejanza a l semillas de Amarantus paniculatus Saft., y que por extensión hoy día designa también los moscos que los ponen. Estos moscos en número de cinco, son los siguientes:*

Krizousacorixa azteca Jacs.
Krizousacorixa femorata Quér.
Notonecta unifasciata Quér.
Corisella mercenaria Say.
Corisella Texcocana Jacs.

Según Fco. Javier Hernández (1649), "son pequeños moscos lacustres que se reprod cen en la superficie de las aguas y se recolectan con redes en los lagos mexicanos, en cier

ɔoca del año, sus huevos llegan a ser tan abundantes, que triturados y formando una :asa, se venden en los mercados, después que han sido cocidos por los indígenas en agua : nitro, envueltos en hojas de mazorca de maíz".

Los aztecas designaban a los moscos con el nombre de Axayacatl (de a-xayacatl: atl-gua y xayacatl- cara, rostro).

Francisco Javier Clavijero (1780), refiere que: "Debido al aislamiento en que viven gunas tribus del lago, y a sus muy pobres recursos, se ven obligados a comer no sólo las lantas acuáticas, sino también batracios (como los ajolotes), e insectos de los pantanos, ɔmo el "atetepis" y el "atopinan", así como también los huevos del Axayacatl. Ellos o lguna substancia limosa que recogen sobre las aguas, son secados al sol y les sirve en la :bricación de un alimento, parecido por su sabor al queso, que se llama tecuitlatl".

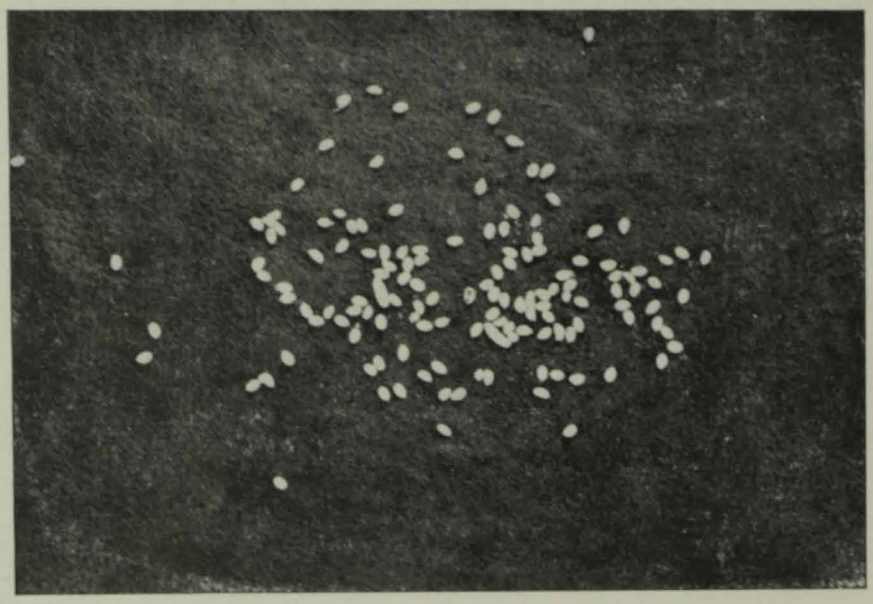


Fig. 1

Microfotografía de los huevecillos (Tamaño natural).

En las poblaciones próximas al lago de Texcoco, uno de los medios de vida ha sido exportación de los huevos e insectos del ahuautle, que eran enviados a diversos lugares : Inglaterra y Alemania, según parece para abastecer los "víveres de peces".

Los moscos pertenecen a las familias Notonectidae y Corixidae, y ambas al orden de s Rincotos o Hemipteros y al suborden Heterópteros, por tener dos pares de alas dife-ntes. El primer par hemiélitros y el segundo membranosas.

Su cuerpo es aplanado y alargado, antenas de cuatro artejos, pico oculto y no articu-do, pronoto grande cubriendo el mesonoto y el escudete, hemiélitros con líneas trans-rsales y negras, superficie ventral lisa.

El primer par de patas con las tibias muy cortas y los tarsos de un solo artejo, en rma de pala y sin uñas, lo cual es una adaptación para la natación. Nadan de espalda.

Deseo hacer constar que independientemente de la bibliografía, que sobre datos his-ricos y zoológicos presento al final del trabajo, las principales notas aquí expuestas, pro-enen del interesante estudio que sobre el particular presentó el señor Prof. L. Ancona H.,

en su obra "El Ahuautle de Texcoco" en los "Anales del Instituto de Biología", Tomo IV Núm. 1 1933, y de una comunicación personal que recibí de mi maestro el señor Prof

Fig. 2

Huevecillo esquematizado, presentando su base de fijación.

Don Santiago R. Gutiérrez, actualmente en el Instituto Queretano, y por la cual deseo expresarle mi sincero agradecimiento.

Considerando suficientes los datos que anteceden como introducción previa, al estudio químico, paso a describir lo referente al análisis proteico.

Capítulo I

DEL ANALISIS PROTEICO

Hasta el año de 1901 los conocimientos que se tenían sobre la relación cuantitativa de los aminoácidos en la molécula proteica, eran muy escasos. Para esta fecha, Fischer propuso su método de "Esterificación", que fué la base de muchos otros que se conocen en la actualidad.

Todos ellos requieren el fraccionamiento previo de las proteínas, mediante la hidrólisis.

Esta operación se realiza por acción de catalizadores como ácidos, bases o enzimas.

La mezcla de aminoácidos en algunos métodos es esterificada con alcoholes diversos, así, en el de Fischer después de eliminar la cistina y tirosina por cristalización en el hidrolisado, y separar el ac. glutámico previa concentración al vacío, por cristalizaciones sucesivas, se estirifican los demás aminoácidos con alcohol etílico absoluto, empleando HCl gaseoso. Por concentración y enfriamiento la glicocola podrá separarse totalmente como ester. Los demás aminoácidos se fraccionan por destilización a presión reducida. De las fracciones obtenidas, así como del residuo no destilable, se separan los distintos aminoácidos individualmente o por grupos.

El método requiere al rededor de 300 gr. de proteína, que se someten a hidrólisis, durante la cual algunos aminoácidos se destruyen parcial o totalmente. El análisis dista mucho de ser cuantitativo, ya que la esterificación no es total, y durante la destilación se descomponen con facilidad los ésteres, etc.

La importancia del método de Fischer en la actualidad, es más bien histórica, si se toman en cuenta las enormes dificultades que presenta en su manipulación y los resultados obtenidos.

Método del alcohol butílico de Dakin.—Está basado en la extracción de los aminoácidos con alcohol butílico. La proteína se hidrolisa con H_2SO_4 el que se elimina después con $Ba(OH)_2$. La solución obtenida se concentra al vacío. El producto semi-sólido obtenido, se extrae con alcohol butílico, obteniéndose dos fracciones, la de extracción (monaminomonocarboxílicos, etc.) y la **no** extraída ("bases", ácidos dicarboxílicos, etc.).

De las dos fracciones pueden obtenerse otras cinco, gracias a las distintas solubilidades de los productos contenidos en ellas, (alcohol etílico, butílico, etc.).

Los grupos obtenidos se componen de especies químicas semejantes. Practicamente todo el producto puede dividirse en los cinco grupos mencionados.

con pequeñas pérdidas, y la racemización de los aminoácidos queda reducida a un mínimo. Presenta el inconveniente de que grandes cantidades de ácido glutámico, así como porciones regulares de aminoácidos pertenecientes a las bases exónicas, son extraídos cuando la extracción se prolonga excesivamente.

De este método existen varias modificaciones, al igual que del de esterificación de Fischer. A continuación trataré en rasgos generales lo que se refiere al método del transporte eléctrico.

Método del transporte eléctrico.—Tiene su origen en una patente japonesa empleada inicialmente en la fabricación del ac. glutánico. El método no se ha usado aún en un sentido cuantitativo, pero sin embargo presenta grandes ventajas en el aislamiento de muchos aminoácidos, y en la actualidad se estudia con intensidad su aplicación en la investigación de la estructura de las proteínas. Está basado en la influencia del pH. sobre la disociación de los aminoácidos.

Como en los demás métodos, se requiere haber hidrolisado previamente la proteína. El aparato presenta tres compartimientos, el hidrolisado se coloca en el central, ajustando el pH. a 5.5. Se hace pasar la corriente directa, con lo cual los aminoácidos se desplazan por diálisis, según su mayor afinidad por ácidos o bases, al ánodo o al cátodo, permaneciendo en la celda central los que se manifiestan indiferentes por tener en la misma proporción acción ácida y básica.

Haciendo sucesivos transportes por variación del pH. con las fracciones desplazadas, se logran separar uno a uno muchos de los distintos aminoácidos.

La histidina contenida en hidrolisados de sangre se separa en gran escala por este camino.

Por último, existen métodos que no son sino combinaciones de los anteriores, y un buen número de reactivos para separar selectivamente los aminoácidos de los hidrolisados que los contienen, así: el ácido flaviánico, especialmente usado al aislar arginina, ácido pícrico, que da compuestos definidos con la glicina, arginina, histidina y lisina. Las dicetopiperazinas son precipitadas por este reactivo, utilizándose como prueba de las mismas; ácido picrolónico, que da compuestos con todos los ac. monoaminomonocarboxílicos, y se ha usado para caracterizar el grupo de las bases. Acido Rodanílico en la diferenciación de prolina, etc. Por último, algunas sales de metales pesados como cobre, cinc, plata y mercurio, encuentran gran aplicación en el análisis proteico.

Habiendo descrito en general algunos métodos que han servido de base al desarrollo del análisis de las proteínas y aminoácidos, paso a describir también en forma condensada lo referente al análisis por el método de Van Slyke.

El método debido al Dr. Donald Van Slyke, fué realizado en los laboratorios del Instituto Rockefeller para investigaciones médicas.

Como en todo método de análisis proteico, se requiere la hidrólisis previa. El material a analizar es muy pequeño, a diferencia de los demás métodos, que requieren cantidades hasta de 300 y 400 gs. de proteína. (Esterificación de Fischer.)

Por otra parte, el análisis se basa, no precisamente en el aislamiento de los aminoácidos, sino en la determinación de los grupos químicos que los caracterizan. El análisis puede desarrollarse con 3 y 4 gramos de proteína.

Algunos recursos matemáticos se emplean en la determinación de varios aminoácidos en forma muy precisa.

Por el método de Van Slyke se pueden cuantear la mayor parte de los aminoácidos, y algunos como el triptofano y tirosina que se destruyen durante la hidrólisis, habrán de cuantearse por otro camino, empleando métodos enzimáticos.

Los aminoácidos de la fracción no precipitable por el ácido fosfotúngstico, pueden determinarse siguiendo métodos selectivos, o bien cuantearse de conjunto.

Con esto quiero dejar asentado que el análisis proteico no puede realizarse sino por el empleo de diversos métodos, por medio de los cuales se tenga un conocimiento integral de las proteínas.

Sin embargo, los aminoácidos determinados en el método de Van Slyke, dan cifras que dentro de límites pequeños de error, pueden aceptarse como cuantitativos.

A continuación señalaré los pasos más importantes a seguir, con objeto de marcar un curso claro que facilite la comprensión de las operaciones realizadas durante el trabajo.

1º Nitrógeno total de la proteína.
2º Hidrólisis de la proteína.
3º Nitrógeno de la melanina insoluble.
4º Nitrógeno de la melanina soluble.
5º Nitrógeno amídico o amoniacal.
6º Precipitación de los aminoácidos del grupo de las "Bases" por medio del ácido fosfotúngstico.
7º Nitrógeno de la melanina adsorbida por el fosfotungstato de Bario.
8º Nitrógeno total de las "Bases", y nitrógeno amígeno total. (Van Slyke.)
9º "Distribución" del nitrógeno de las "Bases".
   A) Cistina.
   B) Arginina.
   C) Histidina.
   D) Lisina.
10. Distribución del "nitrógeno en la fracción del filtrado de las Bases".

Estos diez pasos traen consigo una serie de manipulaciones y cálculos que se expondrán en detalle durante el desarrollo del trabajo.

Capítulo II

PREPARACION DEL MATERIAL

A.—OPERACIONES PRELIMINALES:

1. **Selección.** El material adquirido consiste en una mezcla de huevecillos, semillas muy semejantes en su forma a los primeros, restos vegetales de diversa índole, tierra, etc. Resultaba necesario, separar los primeros lo mejor posible del conjunto, por medio del cernido, empleando mallas metálicas adecuadas.

A este fin se determinaron los diámetros del huevecillo por micrometría.

Determinación:

Empleando un objetivo 10 se hizo la medición por el procedimiento del ocular micrométrico. El coeficiente micrométrico para el objetivo usado es de 15.4.

El huevecillo en el sentido de su **diámetro mayor** ocupó 60 unidades del ocular.

El valor en micras será pues.

Diámetro menor = 60 × 15.4 = 924.

En el sentido del diámetro menor ocupó al rededor de 38 unidades en el ocular lo que arroja la siguiente dimensión:

Diámetro menor = 38 × 15.4 = 585.2.

Con estos datos se procedió a usar mallas comprendidas entre los números 18 y 24.

Si bien por este procedimiento fué posible limpiar considerablemente el huevo, los resultados no fueron muy satisfactorios, por lo cual fué necesario rodarlos en pequeñas porciones sobre papel encerado con lo cual, siendo más ligeros que los productos que los acompañan, su separación resulta practicamente total.

Los huevecillos empleados en el análisis se encontraban exentos casi en su totalidad de materias extrañas.

2. **Humedad.** En la determinación de humedad se usó una muestra con peso 1.0100 g. la que se mantuvo en estufa de 100° - 110° hasta peso constante y se encontró, por diferencia, que contenía 0.0883 g. de agua lo que porcentualmente arroja una humedad de 8.74 %.

B.—OPERACIONES PREVIAS A LA HIDROLISIS:

Estas operaciones tienen por objeto la eliminación de glicéridos y lecitinas.

Los primeros se extrajeron en un extractor de soxhlet hasta comprobación negativa empleando la prueba del papel.

Para ello, se tomaron 15 g. de huevecillos pesados exactamente y se practicó la extracción, encontrándose después de repetidas pruebas, el punto en el cual una gota del éter de extracción no dejaba residuo alguno de grasa por evaporación en un trozo de papel. Esta operación indicó que el producto húmedo contiene 6.58 % de grasas.

La lecitina se extrajo en el residuo agotando con alcohol de 96 grados y su completa eliminación se comprobó también por el método anterior.

Se encontró por este camino un 9.43 % de la lecitina sobre material húmedo. Esta operación debe interpretarse como no cuantitativa puesto que el cálculo indirecto basado en fósforo (aglícero fosfoamino lípidos) arroja porcentajes diferentes (1).

La extracción de lecitinas es de importancia capital ya que la aplicación del método de Van Slyke basado en nitrógeno, implica la eliminación previa de todo producto nitrogenado ajeno a las proteínas.

Haciendo un resumen de los valores obtenidos tan sólo a manera de una ordenación de los mismos y de ningún modo con miras a presentar un análisis cuantitativo tendríamos:

1) **Humedad** = 8.74 %.
2) **Extracto Etéreo** = 6.58 %.
3) **Extracto Alcohólico** = 9.43 %.
4) **Residuo para 100** = 75.52 %.

El residuo 4) nos da una idea aproximada del elevado contenido en prótidos, valor que será corroborado durante el proceso por otros métodos. Este residuo extraído de grasas y lecitinas, está en condiciones de ser sometido al análisis, ya que su principal componente nitrogenado no proteico, las lecitinas, le han sido extraídas.

Otros productos no nitrogenados que en pequeñas cantidades pudiesen existir, no estorbarán en modo alguno las futuras determinaciones, ya que no se trata de presentar un análisis de proteínas puras con miras a investigar su constitución, sino por lo contrario obtener un análisis cuantitativo de los diferentes aminoácidos que se encuentran en el producto total e independientemente del origen proteico de los mismos.

Así: los aminoácidos encontrados proceden de distintas especies químicas analizadas en conjunto y representarán por tanto el contenido de los mismos en la fracción proteica total y su reporte será dado en función de los huevecillos originales.

En estas condiciones se procede a fraccionar las proteínas en sus distintos aminoácidos mediante la "hidrólisis".

Capítulo III

HIDROLISIS

La primera operación a realizar en las proteínas previamente a su análisis, es la hidrólisis.

La operación se realiza por la ruptura de las uniones peptídicas que de manera general ligan a los aminoácidos dentro de la molécula proteica. Estas uniones son desde el punto de vista estructural del tipo amida substituída. Provienen de la condensación de los grupos carboxilo con los grupos amígenos, esto es, de la unión del carboxilo de un aminoácido con el NH_2 del que le sigue a continuación en la molécula de la proteína, con pérdida de agua.

Se ha visto que cuando se somete a ebullición una proteína suspendida en un medio acuoso que contiene un ácido fuerte o una base, después de que la proteína se ha disuelto, la cantidad de agua total va disminuyendo a medida que el proceso avanza.

Este consumo de agua es proporcional a la formación de aminoácidos libres.

De modo que la reacción con el agua que determina su consumo, vendría a ser la siguiente:

$$(\text{-CO.NH-}) + \text{H.OH} = \text{-COOH} + \text{-NH}_2$$

(Unión Peptídica.)

Podríamos, pues, definir la hidrólisis de las proteínas como la ruptura de las uniones peptídicas de las mismas por acción del agua, con formación de aminoácidos libres.

La acción del agua se logra mediante catalizadores que pueden ser ácidos o bases fuertes. También es posible conducir la hidrólisis por acción enzimática.

Al hidrolizar una proteína podemos encontrar que está constituída por aminoácidos solamente (proteínas simples) o bien por éstos y por grupos no proteicos (grupos prostéticos) con los que se encuentran asociados (proteínas conjugadas).

Resulta dudoso que por alguno de los métodos enunciados se llegue a la hidrólisis cuantitativa, pero sin embargo, existe un punto en el cual la concentración de carboxilos y amígenos ha alcanzado un máximo.

Esto plantea la necesidad de métodos de control que den a conocer por pruebas sucesivas el momento en el cual la hidrólisis ha alcanzado un máximo.

Según el Dr. Van Slyke, el máximo en la hidrólisis se alcanza independientemente de la temperatura, ya sea a 100° ó a 150°, lo que quiere decir

que la concentración de amígenos y carboxilos es la misma, si la máxima hidrólisis se logró a temperaturas diferentes.

Ningún caso de hidrólisis total se ha observado a las 10 horas de ebullición a 100° y existen proteínas que requieren hasta 48 horas (caseína).

HIDROLISIS ACIDA

En la hidrólisis por ebullición con ácidos se han empleado el ácido sulfúrico, clorhídrico y yodhídrico principalmente.

Acido Sulfúrico.—El ácido sulfúrico fué el primero en usarse, especialmente para la investigación y separación de ácidos monoaminomonocarboxílicos(método del alcohol Butílico). Presenta la ventaja de que puede ser eliminado después de la hidrólisis por precipitación con cationes como Ca y Ba empleando óxido o hidróxido respectivamente. Los precipitados insolubles son filtrados y lavados después de la hidrólisis con relativa facilidad; pero tienen el inconveniente de adsorber cantidades apreciables de aminoácidos debido a su gran volumen, lo que viene a modificar considerablemente el análisis.

Se ha usado principalmente en la concentración de 35 %. La mezcla de proteína y solución ácida se calienta a baño María de 1 a 3 horas hasta que la ebullición se detiene y a continuación se hierve a reflujo usando baño de aceite o de aire (105°-110°) hasta hidrólisis total la que se controla sucesivamente durante el proceso. Se emplean de 12 a 24 horas en estas condiciones, según el tipo de proteína.

Acido Clorhídrico.—El ácido clorhídrico es indudablemente el agente hidrolítico más usado. Fué introducido originalmente en la hidrólisis de proteínas vegetales. Se emplea preferentemente cuando se trata de analizar los monoaminoácidos y ácidos dicarboxílicos de una proteína. Se utilizan al 20 % en la proporción de 10 a 20 partes con respecto a la proteína. También se ha empleado una solución 3N en proceso a presión a la temperatura de 150° (autoclave). El tiempo de hidrólisis a presión ordinaria y en las condiciones de concentración antes señaladas es de 6 a 24 horas hirviendo a reflujo y usando baño de aceite o aire. En muchos procesos hidrolíticos se ha usado el clorhídrico adicionado de ácido fórmico, de cloruro estanoso o de titanio. El primer tipo de mezcla con ácido fórmico se ha usado principalmente al hidrolizar insulina.

La adición de cloruro estanoso tiene por objeto impedir la formación de melanina.

Tanto el sulfúrico como el clorhídrico se usan indistintamente para la investigación de los aminoácidos del grupo básico.

Acido Yodhídrico.—Se ha usado en la hidrólisis, solo y adicionado de un fosfato bibásico sin que, como otros reactivos, haya presentado ninguna ventaja al respecto.

HIDROLISIS BASICA

La hidrólisis básica se diferencia de la anterior por su rapidez. Se han usado los hidróxidos de Na, K, Ba Amonio y el carbonato de este último catión.

Los hidróxidos de Na, K, y Ba, hidrolizan rápidamente a las proteínas y tienen como única ventaja sobre los ácidos, que no destruyen el triptofano y la tirosina, los que pueden ser determinados directamente en el hidrolisado total.

La acción prolongada de los álcalis sobre proteínas que contienen serina, destruyen en parte este aminoácido. Otros aminoácidos son también parcialmente destruídos durante el proceso (Cistina, etc.).

La hidrólisis con amoníaco y carbonato de amonio se han llevado a cabo en autoclave a presión sin que constituyan ningún avance.

HIDROLISIS POR ACCION ENZIMATICA

La hidrólisis puede ser catalizada mediante las enzimas proteolíticas. Por este camino nunca es total, pero en algunos casos se acerca a la obtenida con bases y ácidos. El proceso se desarrolla dentro de ciertas condiciones específicas que dependen del tipo de enzima, su potencia, temperatura y acidez en la cual el efecto catalítico es óptimo.

Existen grupos proteicos resistentes a la acción enzimática y se ha visto que contienen usualmente la fenilalanina y la prolina de la molécula proteica.

Las moderadas concentraciones ácidas o básicas en las cuales el proceso se realiza, constituyen una de las ventajas del método sobre las anteriores, pues la destrucción de los aminoácidos queda reducida a un mínimo. Presenta dos desventajas de importancia que se refieren a la lentitud del proceso y a la subsistencia de las enzimas en los hidrolisados, lo que imposibilita en muchos casos su análisis.

El aislamiento de triptofano, tirosina y otros aminoácidos se realiza preferentemente por vía enzimática.

*

* *

En el método de Van Slyke se emplea como catalizador de la hidrólisis el ácido clorhídrico, el que se elimina después del hidrolisado por destilación al vacío, a diferencia de los demás reactivos que tienen que eliminarse por precipitación con los inconvenientes antes expuestos.

En nuestro trabajo se sometieron a hidrólisis 8 gramos de huevecillos de los que previamente se eliminaron grasas y lecitinas.

A los 8 gramos de materia proteica se adicionaron 160 c.c. de ácido clorhídrico al 20 % y se inició la hidrólisis calentando a reflujo a fuego directo.

En estas condiciones se mantuvo el calentamiento, observando posibles pérdidas de agua y de HCl, pesando el sistema cada vez que se hacía proseguir la hidrólisis durante 14 horas no consecutivas, al cabo de las cuales se tomaron 2 c.c. para practicar un control de grupos amígenos. Mientras tanto la hidrólisis se hizo proseguir.

Previamente al control de $N(NH_2)$ se hicieron pruebas de comprobación de un método químico que se consigna en la obra "The Aminoacid Compo-

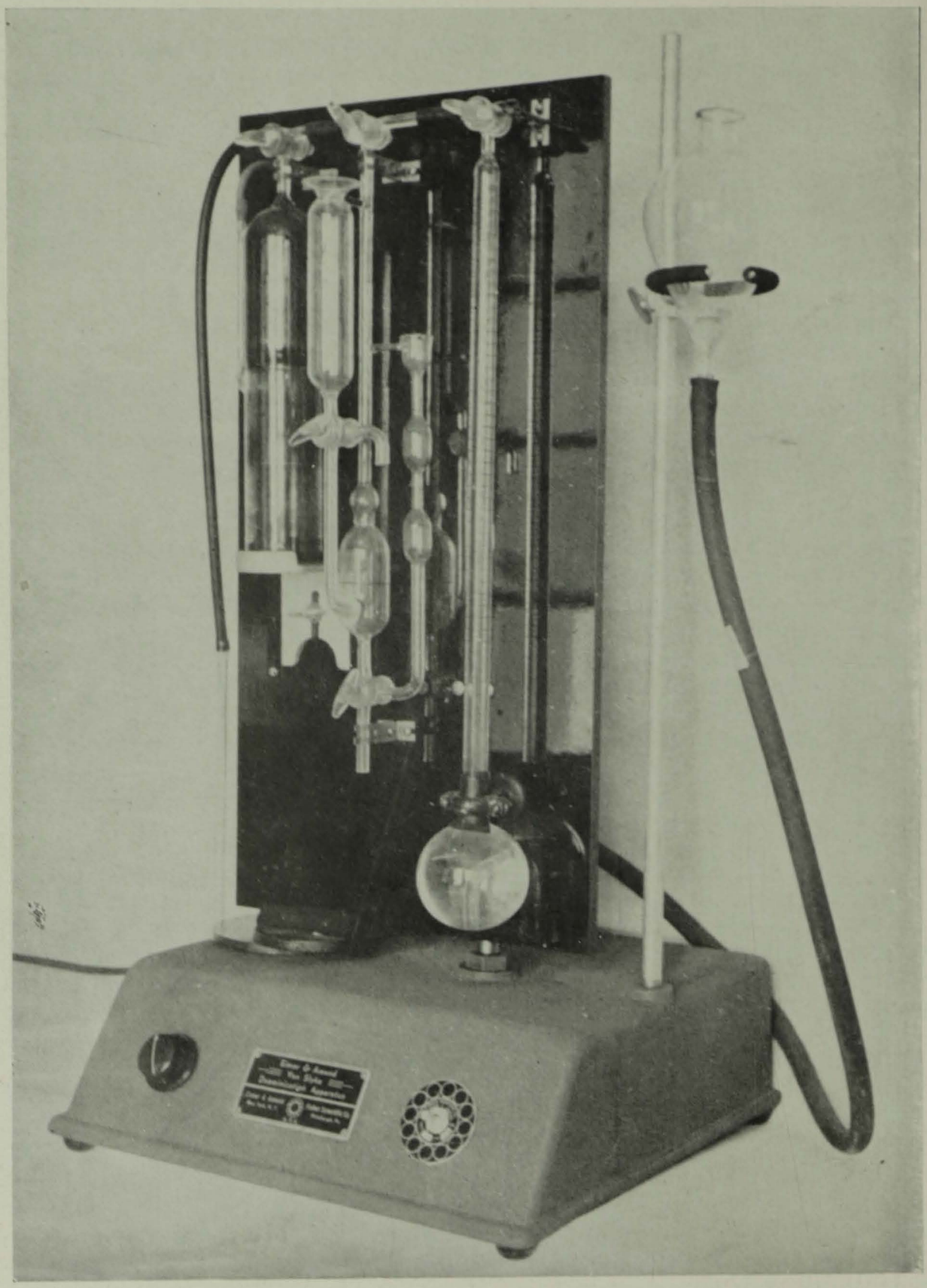


Fig. 3

Aparato de Van Slyke empleado en la determinación gasométrica del nitrógeno Amígeno.

sition of Proteins and Foods", de los autores Block & Bolling. Editorial Thomas.

Las pruebas de comprobación se realizaron con tirosina Q. P., y se llegó a la conclusión de que el método era muy preciso en virtud de que muestras iguales en concentración del mismo aminoácido arrojan valores muy semejantes en la titulación.

El método es el de Pope & Stevens denominado Método de Titulación del Nitrógeno Amígeno, el que presento al final del trabajo (Apéndice), y está basado en el principio de que los aminoácidos dan lugar a la formación de sales solubles de cobre.

El contenido en cobre e indirectamente el Nitrógeno amígeno del filtrado es determinado por iodometría.

La muestra tomada a las 14 horas de hidrólisis fué sometida a análisis por el método descrito.

Se obtuvieron los siguientes resultados:

A) 1 c.c. de hidrolisado contiene 3.58 mgrs. de N. (NH_2).
B) 1 c.c. de hidrolisado contiene 3.41 mgrs. de N. (NH_2).

1 c.c. promedio = 3.495 mgrs.

La hidrólisis proseguía mientras tanto hasta que se alcanzaron 19 horas de ebullición al término de las cuales se volvieron a tomar 2 c.c. Se hicieron como en el caso anterior dos análisis paralelos.

A) 1 c.c. de hidrolisado contiene 3.416 mgrs. de N. (NH_2).
B) 1 c.c. de hidrolisado contiene 3.52 mgrs. de N. (NH_2).

1 c.c. promedio = 3.468 mgrs. / c.c.

Como puede apreciarse, los resultados observados a las 14 horas de 3.495 mgrs. y los que se observan a las 19 horas de 3.468 mgrs., resultan muy semejantes. Los valores A del primer tiempo y B del segundo, son practicamente los mismos, por lo que podemos comprender que después de las 14 primeras horas, la hidrólisis no progresó, habiendo alcanzado un máximo desde entonces.

El empleo de calor después de las 14 horas trae consigo la destrucción parcial de los aminoácidos, con formación de humina y amoníaco, lo que hace que la concentración en N amígeno decrezca en parte.

Considerando pues, que la hidrólisis alcanzó su máximo, se inicia el Método de Van Slyke propiamente dicho, con la determinación de la humina o melanina insoluble y del nitrógeno amoniacal.

Melanina o humina.—Durante la hidrólisis, el líquido fué tomando un color cada vez más obscuro, llegando al final del proceso a un color café casi negro. Este pigmento es conocido como melanina o humina. Tiene su origen en la descomposición del triptifano y de la tirosina. El proceso es aún desconocido. La existencia de un grupo aldehido que se supone condense con el grupo indol del triptofano y por otra lado la acción de los hidratos de carbono sobre este último aminoácido explican en parte la formación del pigmento.

De hecho la casi totalidad del triptofano se pierde durante la hidrólisis lo que ha venido a limitar el empleo de ácidos fuertes cuando se trata de determinar tirosina y principalmente triptofano en una proteína. El hidro-

lisado se filtra y se lava con agua destilada hasta que una gota del agua de lavado no de la reacción de cloruros con nitrato de plata en medio de ácido nítrico.

El precipitado de "melanina insoluble" se somete a digestión por el método de Kjeldahl.

La solución sulfúrica obtenida fué aforada a 100 c.c. y de este volumen se tomaron dos partes alícuotas de 25 c.c., dando los siguientes resultados:

$$A)\quad 25 \text{ c.c.} = 13.52 \text{ c.c.} \frac{N}{50}$$

$$B)\quad 25 \text{ c.c.} = 13.59 \text{ c.c.} \frac{N}{50}$$

Valor Promedio:

$$25 \text{ c.c.} = 13.55 \text{ c.c.} \frac{N}{50}$$

$$1 \text{ c.c.} = 0.542 \text{ c.c.} \frac{N}{50}$$

Miligramos de Nitrógeno:

$$1 \text{ c.c.} = .542 \times 0.28 \text{ mgrs.} = 0.152 \text{ mgrs. } N_2$$
$$100 \text{ c.c.} = 15.2 \text{ mgrs.}$$

La melanina insoluble contiene 15.2 mgrs. de N_2.

Determinación del Nitrógeno amoniacal.—La determinación del N amídico es de gran importancia en el análisis proteico ya que según Osborn, Laevenworth y Brautlecht es generalmente igual al de los ácidos dicarboxílicos (ac. aspártico y glutámico), con los que probablemente se encuentra combinado en la molécula proteica en forma de radicales amídicos ácidos.

Es necesario eliminar previamente toda traza de amoníaco que el hidrolisado pudiese contener.

Por otra parte el álcali que se use para desalojar el amoníaco, será en proporción y condiciones tales, que no se ataque la arginina y la cistina. Según Denis, la ebullición a 100° C., con una base tan débil como el HgO es capaz de destruir en parte la cistina con formación de amoníaco. Van Slyke consigna el mismo fenómeno pero apunta que no sucede así con la arginina. Como resultado de la sensibilidad de la cistina a los álcalis, según Van Slyke, la operación habrá de realizarse a la temperatura ambiente, usando indistintamente el método de "aereación" de Denis o la destilación a vacío.

La siguiente técnica, adoptada según las experiencias anteriores, es la más conveniente y segura (Van Slyke).

La solución de proteína hidrolisada se pone en un pequeño claisen y se concentra bajo presión reducida hasta que la mayor cantidad de HCl se haya eliminado y el residuo se disuelve en agua caliente. La solución se transfiere a un matraz volumétrico de capacidad adecuada según la cantidad de pro

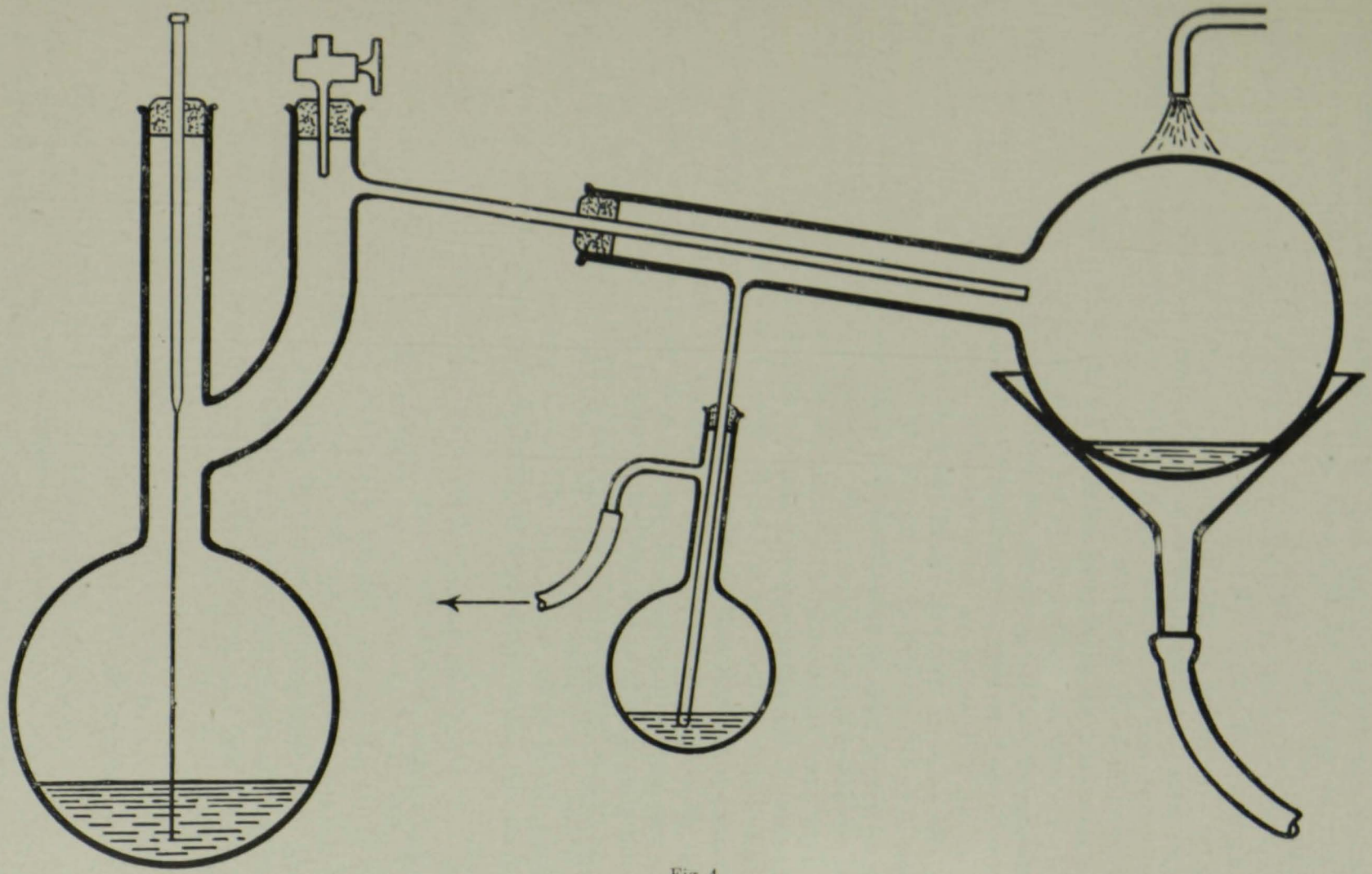


Fig. 4

Dispositivo de Claisen de destilación al vacío.

teína hidrolisada (en nuestro caso se usó uno de 250 c.c.). Una parte alícuota que contenga aproximadamente 2 g. de proteína se usa para determinar nitrógeno por el método de Kjeldahl que nos da el "nitrógeno total" del hidrolisado.

En nuestro trabajo se dividió el hidrolisado en dos partes de 125 c.c. cada una.

Una de las partes se usó íntegra para la determinación de amoníaco y demás operaciones según el método. En la otra se hicieron los controles de nitrógeno total por el método de Kjeldahl, modificación de Hengar, y las determinaciones de N_2 amígeno.

Determinación de nitrógeno total: * La determinación por el semimicrométodo de Hengar se realiza de la siguiente manera:

Sobre un pequeño recipiente de vidrio especial, se coloca un disco de papel exento de materia nitrogenada y con una varilla que se adapta perfectamente al recipiente, se hace introducir en él, adquiriendo la forma cilíndrica. Se pesa el sistema, se introduce luego en él la substancia nitrogenada, pesando una cantidad no menor de 0.05 g. A continuación se saca el cilindro de papel con la substancia y se introduce en el pequeño matraz de Kjeldahl de 100 c.c.

Se deja caer libremente en el interior del matraz de manera que no queden adheridos a las paredes partículas de substancia.

Se adicionan luego 1½ g. de $K_2 SO_4$, 1 gránulo de cuarzo Seleniado (catalizador) y $H_2 SO_4$ conc. u oleum en la cantidad de 2.5 c.c. o más dependiendo de la cantidad de agua que contenga el material.

Una vez hecho lo anterior se adapta a la boca del matraz un filtro poroso que acompaña al aparato quedando sujeto a ella por medio de una tira de papel que previamente se enrolla suficientemente sobre la base del filtro.

En estas condiciones se inicia la digestión aumentando progresivamente la intensidad del calor hasta que el líquido quede incoloro (10 m.).

Quítase el filtro poroso en el cual se ha depositado el selenio por sublicación.

Una vez frío el contenido del Kjeldahl adiciónase 35 c.c. de agua destilada agitando hasta disolución total.

Por otra parte, se coloca en un vaso de 100 c.c. de capacidad 10 — 15 c.c. de HCl N/50 medios con bureta y 4 gotas de rojo de metilo.

Conéctase el condensador de Hengar y se adiciona 4 a 5 gs. de NAOH cerrando inmediatamente después el sistema.

Hágase destilar lentamente el vapor de agua que arrastra los vapores de amoníaco hasta la solución de HCl.

Por último se títula la diferencia con sosa N/50.

En nuestro trabajo se tomaron muestras de 3 c.c. de hidrolisado y se emplearon 50 c.c. de HCl N/50 para recibir el amoníaco.

Los resultados fueron como sigue:

A) 3 c.c. de hidrolisado = (50 — 10.15) NH_3 N/50
= 39.85 c.c.

B) 3 c.c. de hidrolisado = (50 — 10.45) NH_3 N/50
= 39.55 c.c.

---

* Técnica para substancias sólidas.

A) $39.85 \times .00028 = 11.158$ mgrs. NP_2
B) $39.55 \times .00028 = 11.074$ mgrs. N_2.
A) 1 c.c. de hidrolisado = 3.7127 mgrs. N_2.
B) 1 c.c. de hidrolisado = 3.6691 mgrs. N_2.
1 c.c. promedio = 3.691 mgrs. de N_2 total.

Según esto, el volumen total del hidrolisado (250 c.c.) que proviene de toda la proteína contiene:

$$250 \times 3.691 = 922.75 \text{ mgrs. } N_2 \text{ total.}$$

De modo que a 8 gs. de "Huevecillos extractados" corresponden 922.75 mgrs. de N_2 total, lo que arroja porcentualmente la cifra de:

$$11.534\ \%\ N_2 \text{ (total).}$$

Este valor multiplicado por 6.25 nos da a conocer muy aproximadamente la fracción proteica real de nuestros "Huevecillos extractados".

$$11.534 \times 6.25 = 72.0875\ \% \text{ de proteína.}$$

Determinación de nitrógeno amígeno en el hidrolisado total.—Esta determinación se realizó en el aparato de Van Slyke que aparece en la figura 3 y cuyo funcionamiento será descrito posteriormente, (Apéndice).

El aparato es gasométrico y mide exclusivamente nitrógeno que proviene de grupos amígenos merced a la reacción del Acido Nitroso frente a la función NH_2.

La reacción en términos generales es la siguiente:

$$\begin{array}{l} R\text{-}CH\text{-}COOH \\ \quad\ \ | \\ \quad NH_2 \end{array} + HO\text{-}N{=}O \longrightarrow \begin{array}{l} R\text{-}CH\text{-}COOH \\ \quad\ \ | \\ \quad OH \end{array} + N_2 + H_2O$$

Para esta determinación se usaron 10 c.c. de hidrolisado que se diluyó a 50 c.c. Se tomaron 5 c.c. que contienen 1 c.c. de hidrolisado, los cuales arrojaron 7.3 - 0.25 (Blanco) = 7.05 c.c. de nitrógeno a 584 mm. de presión y 20° C. de temperatura.

$$\text{Cálculo: } \frac{7.05 \times 273 \times 584.6 \times 1.25}{293 \times 760} = 6.243 \text{ mgrs.}$$

Como solamente la mitad del nitrógeno corresponde a los grupos amígenos pues la otra, según la reacción, tiene su origen en el ácido nitroso, tenemos:

1 c.c. de hidrolisado = 3.1215 mgrs. de N_2 (NH_2).

Los 250 c.c. contendrán:

$$250 \times 3.1215 = 780.375 \text{ mgrs. N } (NH_2).$$

La relación de nitrógeno amígeno a Nitrógeno total es pues de:

$$\frac{780.375 \times 100}{922.750} = 84.59\ \%$$

Nota.—El valor 0.25 c.c. (Blanco) corresponde a la tensión de vapor de agua, valor que se obtuvo experimentalmente haciendo funcionar el aparato en ausencia de proteína.

Una vez realizados los controles de Nitrógeno total y N_2 amígeno en una parte alícuota del hidrolisado, procedemos a determinar el amoníaco en los otros 125 c.c. del mismo.

Determinación del amoníaco.—Para esta determinación haremos uso de óxido de calcio y de la destilación al vacío. El aparato empleado es el de Claisen (Figura 4), en el cual previamente habíamos concentrado nuestro hidrolisado hasta eliminación del ácido clorhídrico. En este caso el sistema se adiciona de un tercer matraz de destilación fraccionada, al cual se conecta el tubo de vacío.

Para recibir el amoníaco en ambos matraces se usa $H_2\ SO_4$ N/10.

El matraz de 1 lt. de doble cuello se coloca sobre baño de María a 45°-50° C. En el primer matraz se ponen 30-60 c.c. de $H_2\ SO_4$ N/10 y en el pequeño inferior 20 c.c. del mismo ácido. Como indicador se usó rojo de metilo. Se introducen los 125 c.c. de hidrolisado en el matraz y se adicionan de un 10 % de suspensión de $Ca\ (OH)_2$ (3 g. en 200 c.c.) hasta ligero exceso, lo que se demuestra por la turbidez y reacción alcalina.

Cien c.c. de alcohol se adicionarán antes de la destilación con objeto de impedir la formación excesiva de espuma durante el proceso.

Una vez ajustado el aparato como lo muestra la figura, se destila durante media hora. Si la destilación se inicia con mucha rapidez será necesario dejar entrar el aire por el tubo capilar con mucho cuidado.

Al terminar la destilación se quita el baño de María, se desconecta el vacío cuidadosamente, abriendo la llave de entrada de aire.

El ácido de ambos matraces se pasa a un erlenmeyer de medio litro, lavando cuidadosamente, y se titula acto seguido con NaOH N/10.

En nuestro caso uno de los matraces contenía 45 c.c. de ácido y el otro 20 c.c., de suerte que en total eran 65 c.c. de $H_2\ SO_4$ N/10.

Titulación.—Al titular se gastaron 42.85 c.c. de NaOH N/10.

Por lo que se destilaron: 65-42.85 = 22.15 c.c. N/10 de amoníaco.

El nitrógeno correspondiente será 22.15 x 1.4 mgrs. = 31.01 mgrs.

De modo que 1 c.c. de hidrolisado contendrá:

0.248 mgrs. de N_2 amoniacal.

Origen del amoníaco.—La ebullición prolongada de aminoácidos con ácidos fuertes, no da lugar sino a cantidades muy pequeñas de amoníaco, fruto de la descomposición parcial de dichos aminoácidos (monoaminoácidos

solamente). De aquí se desprende que el nitrógeno amoniacal se encuentra como tal originalmente en la proteína, considerándosele asociado a los carboxilos libres de la misma.

Las proteínas que pueden presentar este fenómeno contienen ácidos dicarboxílicos, como el aspártico y glutámico, en los cuales un carboxilo se encuentra condensado al grupo amígeno del aminoácido subsecuente, quedando libre el segundo carboxilo, y con capacidad de fijar al nitrógeno amoniacal en forma de una amida.

Malanina Soluble.—El $Ca(OH)_2$ no disuelto que resta después de la destilación, contiene la melanina soluble fijada por adsorción, el cual se filtra por papel y se lava repetidas veces con pequeñas porciones de agua, hasta que una gota del líquido no dé la reacción de los cloruros. El precipitado y papel se someten a digestión por el método Kjeldahl usando 35 c.c. de H_2SO_4.

Determinación.—Del producto digerido y llevado a 100 c.c., fueron tomadas dos fracciones de 25 c.c. para desalojar de ellas el amoníaco en análisis paralelos.

La cantidad de amoníaco obtenida de ambos casos fué tan pequeña que no fué posible determinarla, por lo que el nitrógeno correspondiente no se considerará en el análisis general.

Precipitación, lavado y redisolución de los aminoácidos del grupo de las "bases".—El filtrado de la melanina "soluble" que muestra una reacción alcalina, se neutraliza con HCl, y se regresa al aparato de Claisen de destilación al vacío.

Aquí se concentra hasta cerca de 100 c.c., volumen que previamente se marca en el matraz. A continuación se pasa a un erlenmeyer de 200 c.c., se adicionan las aguas de lavado del matraz de destilación, se añaden 18 c.c., de HCl concentrado y una solución que contenga 15 gs. de ácido fosfotúngstico.

Se lleva toda la solución a 200 c.c. y se calienta a baño de María hasta que el precipitado de las "bases" se ha casi redisuelto.

Al enfriarse las bases reprecipitan como fostotúngstatos cristalinos, pudiendo entonces ser lavadas y filtradas.

Condiciones para la precipitación y lavado.—Estas condiciones fueron dadas por Harris y Osborn con la única diferencia introducida por Van Slyke de usar ácido clorhídrico (18 c.c. que fueron añadidos) y no sulfúrico en el método.

La solución que contiene las bases se mantiene 48 horas en reposo con objeto de que el precipitado se forme bien, pues de lo contrario según Van Slyke la histidina no precipitará en su totalidad.

La cuestión del lavado es de gran importancia, pues es necesario que el precipitado quede enteramente libre de aguas madres y de aminoácidos de la fracción no precipitada.

También es necesario usar la menor cantidad posible de agua de lavado, pues el precipitado es algo soluble en ella. El método cuantitativo es el siguiente:

Se prepara un papel filtro suficientemente consistente y con un compás se traza un círculo con diámetro de tres pulgadas, que corresponderá al interior del Büchner de igual diámetro. Perpendicularmente a la circunferen-

cia se harán 20 cortes situados entre sí a igual distancia; los trozos se levantarán en ángulo de 90° con respecto al papel. En esta forma obtenemos un recipiente suficientemente grande como para contener todo el precipitado. A continuación lo introducimos en el Büchner de tres pulgadas y lo fijamos a él convenientemente, humedeciéndole con agua.

Introducimos el precipitado y las aguas madres que se filtran lo más completamente posible, haciendo succión en el Büchner.

A continuación se comprime el precipitado con una espátula. El filtrado se transfiere a un vaso. Sobre el precipitado se adicionan 10 a 12 c.c. de una solución de lavado que contiene 2.5 % de ácido fosfotúngstico y 3.5 % de HCl.

Con una varilla se agita cuidadosamente a modo de suspender el precipitado lo mejor posible en el embudo, reduciéndolo a gránulos finos.

Hacemos ahora vacío y filtramos lo mejor posible. Se continúa por este camino hasta que una gota de filtrado no contenga calcio, lo que se logra después de 8 a 15 operaciones similares.

En la prueba del calcio se usa una solución de ácido oxálico, en 3 % de sosa.

A 1 c.c. de esta solución se adicionan dos gotas de filtrado y se agita. Su presencia queda señalada por la turbidez.

Una vez terminado el lavado, las bases se pasan por medio de una espátula y de agua destilada a un vaso con capacidad de un litro.

El papel filtro se coloca en una cápsula y se lava primero con agua y después con solución muy débil de sosa, la que disuelve la pequeña porción de precipitado adherida al filtro.

Las aguas del lavado se encontraron algo turbias y se filtraron a través de un pequeño papel filtro, después de lo cual se sometió éste a la misma operación que el anterior.

A la suspensión de las bases se añadieron 5 gotas de fenolftaleina y a continuación una solución de sosa al 50 % gota a gota. Al final de la operación la solución formada con la adición de sosa deberá permanecer ligeramente roja, pero no debe contener más de tres gotas de la solución de álcali en exceso. La adición de mayor cantidad trae consigo la destrucción parcial de cistina y arginina.

La solución se diluye a 800 c.c. y se adicionan después una solución de $BaCl_2$ por porciones de 5 en 5 c.c. hasta que una prueba con solución de sulfato de sodio neutro, muestra presencia de ion Bario.

Durante el proceso la solución debe mantenerse alcalina.

No debe existir más de 5 c.c. de solución de cloruro de Bario al terminar la operación. Se usaron en total 50 c.c. de solución de Ba. El precipitado obtenido de fosfotungstato de Bario se filtra y se lava con agua destilada, usando el mismo papel que preparamos para filtrar las bases. Se lava hasta que el agua del lavado no contenga ion cloro.

El filtrado que contiene los aminoácidos del grupo de "las bases", se concentra al vacío en el dispositivo de Claisen hasta 50 c.c.

Durante la concentración una pequeña porción del fosfatungstato de Bario que permaneció en solución, precipita. El vacío se suspende, se filtra y lava el precipitado y se continúa la concentración.

La solución concentrada se llevó a un matraz aforado de 100 c.c. A continuación se pasó a un frasco de tapón esmerilado para posteriores análisis.

Hasta aquí hemos separado nuestro hidrolisado exento de melanina y amoníaco en dos grandes fracciones: la de las "bases" y la solución de los demás aminoácidos que permanecen en el "Filtrado de las Bases".

Melanina soluble adsorbida por el Fosfotungstato de Bario.—Los precipitados negruzcos de fosfotungstato con sus papeles filtros correspondientes, se sometieron a Kjeldahl.

En este caso se obtuvo un valor que, aunque pequeño, es menester consignar: El producto digerido se aforó a 300 c.c. y se tomaron dos muestras de 25 c.c.

Ambos dieron valores iguales de amoníaco a 1.3 c.c. N/50, a lo que corresponden:

0.384 mgrs. para 25 c.c., lo que da **4.608 mgrs.** para el volumen total.

RESUMEN DE VALORES

En el hidrolisado total se encontró:

Nitrógeno de Melanina insoluble	=	15.2	mgrs.
Nitrógeno de Melanina soluble	=	0.	„
Nitrógeno de Melanina (fosfotungstato)	=	4.608	„
Nitrógeno de Melanina total	=	19.808	„

En 1 c.c. de hidrolisado se encontró:

Nitrógeno amoniacal	=	0.248	mgrs.
Nitrógeno amígeno	=	3.1215	„
Nitrógeno total	=	3.691	„

Capítulo IV

ANALISIS DE LAS BASES

En el capítulo anterior habíamos descrito la separación de dos grandes fracciones del hidrolisado. Siguiendo la nomenclatura del original de Van Slyke, la una será llamada de las "bases" y la otra fracción "el filtrado de las bases".

Las "bases" comprenden a los aminoácidos que originalmente fueron precepitados por el ácido fosfotúngstico. Son todos ellos de seis carbonos y con carácter marcadamente básico de donde el nombre con que también se les designa, de "bases hexónicas".

La histidina, arginina, cistina y lisina son los aminoácidos que constituyen el grupo, todos con puntos insoeléctricos superiores a siete.

Este análisis constituye la parte más importante del proceso, en virtud de que los aminoácidos mencionados son de los que ofrecen mayor interés, no sólo desde el punto de vista de la investigación misma sino del industrial.

El análisis se inicia con la determinación del nitrógeno total.

Esta determinación se efectuó por el método de Hengar empleando 2 c.c. de la solución de las bases. El destilado se recibió en un vaso que contenía 25 c.c. de HCl $\frac{N}{50}$

En la titulación se gastaron 15.6 c.c. de NaOH de la misma concentración por lo que el destidado contiene 9.4 c.c. $\frac{N}{50}$ de NH_4OH.

Refiriendo este valor al nitrógeno, tenemos:

$$9.4 \times .00028 = 2.632 \text{ mgrs.}$$

de donde 1 c.c. de solución de bases = 1.316 mgrs. de N total.
Y 5 c.c. de la solución de base = 6.580 mgrs. de N total.

DETERMINACION DEL NITROGENO AMIGENO EN LAS BASES

Esta operación se realizó en el aparato de Van Slyke empleando 5 c.c de la solución de las mismas: Se hicieron dos análisis paralelos de los que se obtuvieron los siguientes resultados:

a) 6.8 c.c. de nitrógeno en la bureta.
b) 6.9 c.c. de nitrógeno en la bureta.
Promedio 6.85 c.c.

Tensión de vapor (experimental) igual 0.25 cm.
Diferencia 6.65 c.c. de nitrógeno.
Temperatura de laboratorio 20C, presión de 579.8.
Corrección a 0 y 760 mm.

$$V = \frac{6.65 \times 273 \times 579.8}{293 \times 760} = 4.728 \text{ c.c.}$$

Miligramos de nitrógeno:

4.728 c.c. N_2 a 760 mm. = 5.909 mgrs.

De los cuales, según la reacción con el ácido nitroso solo la mitad corresponde al problema, de donde:

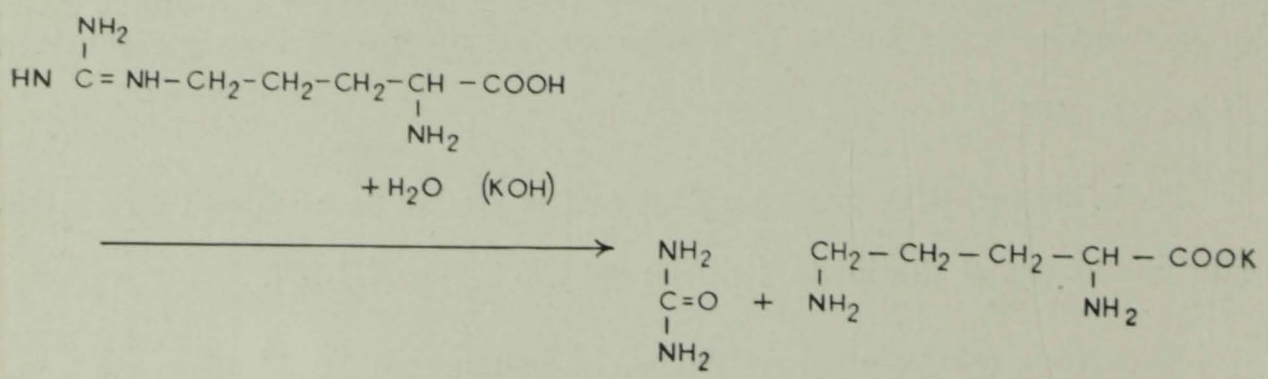
5 c.c. de solución de las bases 2.9545 mgrs. $N(NH_2)$.

DISTRIBUCION DEL NITROGENO DE LAS "BASES"

Arginina.—El fundamento del análisis de la arginina consiste en que cuando este aminoácido se hierve con un álcali diluido, se descompone la mitad de su nitrógeno en forma de amoníaco.

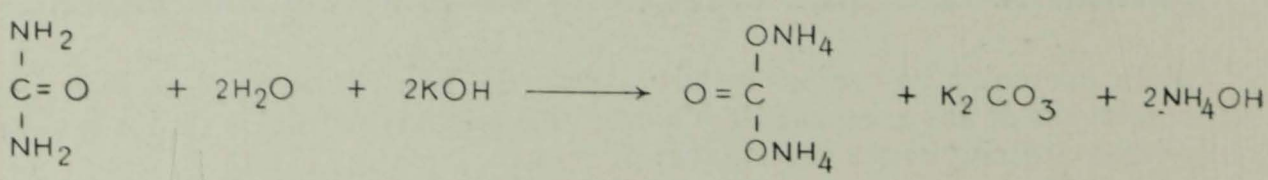
La explicación de la reacción según Schultze y Winterstein es que la molécula se descompone a su vez en una de urea y otra de ornitina. La urea es descompuesta a continuación en amoníaco.

Reacción:



diamino pentanoato de potasio.

La reacción de la urea es la siguiente:



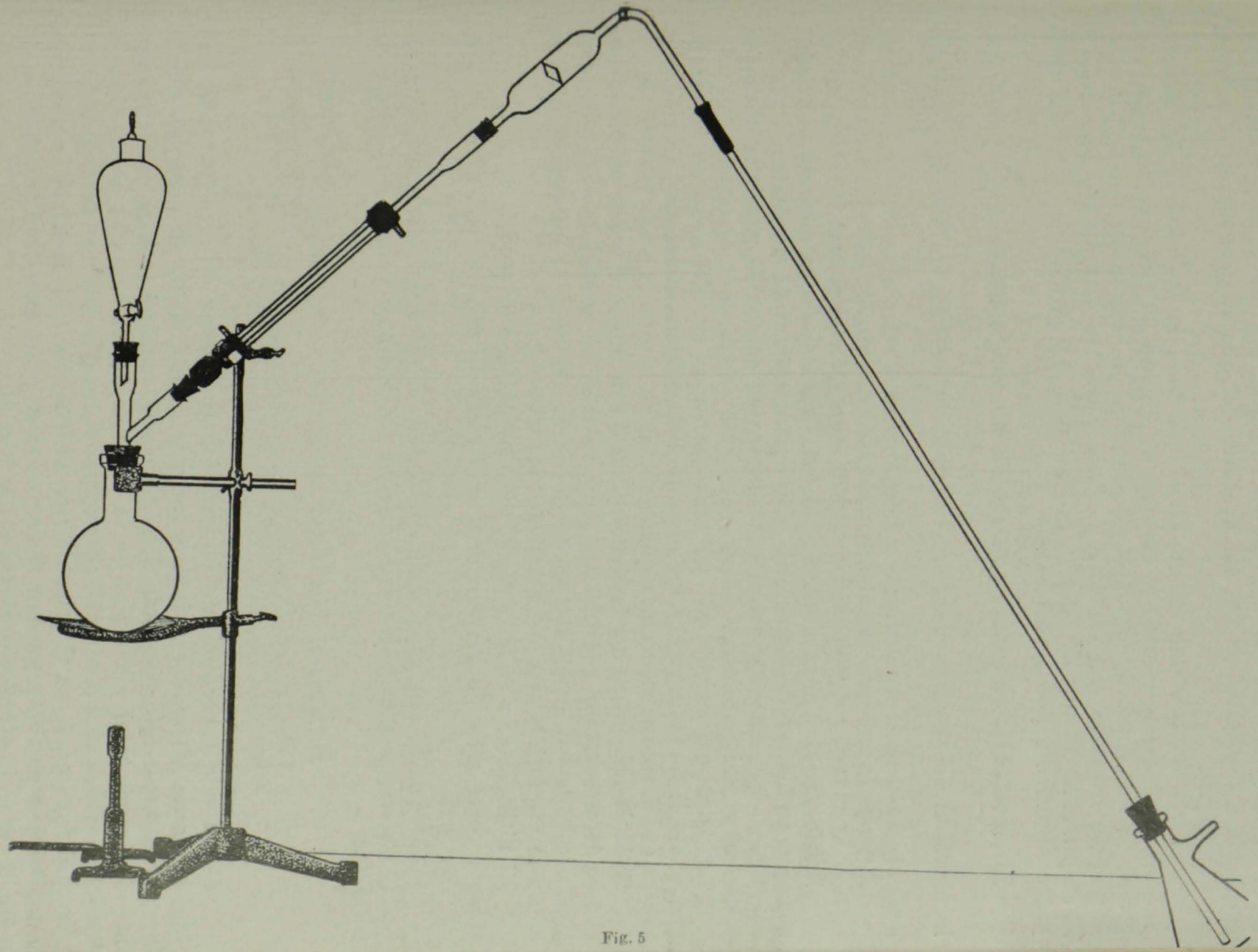


Fig. 5

Para esta determinación se usaron 25 c.c. de la solución de las bases y se trataron con 12 g. de KOH. Se hirvió a continuación durante seis horas en el aparato especial que aparece en la figura 5 y que es una modificación empleada a sugestión del Dr. M. Bachstez del que se propone en el original de Van Slyke.

Una vez llegado este tiempo en el que toda la arginina se ha descompuesto, se adicionan usando el embudo de separación, 200 c.c. de agua y un gramo de Zn en polvo, con objeto de facilitar la destilación por arrastre del hidrógeno liberado (Zn — KOH). Para lograr la destilación, simplemente se suspende la entrada de agua al refrigerante, con lo que los vapores podrán pasar libremente por el sistema.

El amoníaco se recibió en 25 c.c. de solución clorhídrica $\frac{N}{10}$ por lo que la cantidad de amoníaco será: 25 — 19.12 = 5.88 c.c. de $NH_4OH \frac{N}{10}$, valor que corresponderá en nitrógeno a 16.464 mgrs.

Refiriendo a 5 c.c. de solución de bases tenemos:

5 c.c. "bases" = 3.2928 mgrs. N_2 (arginina).

Histidina.—La determinación de este aminoácido se obtiene, matemáticamente de los valores anteriores y la explicación es la siguiente:

El nitrógeno **no** amígeno de las bases está contenido parcialmente en la histidina y en la arginina.

La primera contiene dos terceras partes de su nitrógeno en forma no amígena y la segunda (ac. delta, guanido alfa, amino pentanoico) tres cuartas partes del mismo tipo de nitrógeno.

Se le designa como **no** amígeno en virtud de que es incapaz de reaccionar con el ácido nitroso. Según ésto, para calcular el nitrógeno de la histidina será necesario restar ¾ del nitrógeno de la arginina al nitrógeno total **no** amígeno y multiplicar a continuación por 3/2.

El nitrógeno **no** amígeno total estará dado por la diferencia entre el nitrógeno total obtenido por Kjeldahl y el amígeno determinado en el aparato de Van Slyke. Llamaremos a este valor D.

Considerando por otra parte como Arg. el nitrógeno de la arginina obtenido anteriormente, podemos relacionar los distintos valores en la siguente fórmula:

$$\text{Nitrógeno (histidina)} = 3/2\ (D - \tfrac{3}{4}\ \text{Arg.}).$$

$$\text{o sea} = 1.5D - 1.125\ \text{Arg.}$$

Según este procedimiento la histidina constituye en el método de Van Slyke uno de los puntos sujetos a mayores posibilidades de error ya que la exactitud de su valor depende de la precisión con que se hayan determinado los nitrógenos total y amígeno en la solución de las bases así como el de la arginina. Cualquier error que se cometa en una de las tres determinaciones, afecta directamente en el valor de este aminoácido. Sin embargo, como todas estas determinaciones pueden realizarse con gran exactitud, no hay razón para obtener resultados erróneos en la histidina.

Cálculo:	Nitrógeno total:	6.5800 mgrs. en 5 c.c. de bases.
	Nitrógeno amígeno:	2.9545 mgrs. en 5 c.c. de bases.
	Nitrógeno **no** amígeno:	3.6255 mgrs. en 5 c.c. de bases.
	Nitrógeno arginina:	3.2928 mgrs. en 5 c.c. de bases.

Nitrógeno histidina: $(1.5 \times 3.6255) - (1.125 \times 3.2928) = 1.7338$ mgrs.

Cistina.—La determinación de cistina presente en las bases se obtiene por el análisis del azufre orgánico. El método más preciso y conveniente para el presente caso es el de Benedict, modificación de Denis, que está basado en la oxidación por ignición con nitrato de cobre previa evaporación del agua de la solución que contienen las bases:

Este método de Benedict modificado por Denis, así como el reactivo del mismo nombre está descrito en detalle en la obra Biochemical Laboratory Methods. Morrow & Sandstrom. 2a. Edición. John Wiley & Sons.

La oxidación es invariablemente completa, ni la más mínima traza de carbón o de otras materias insolubles debe permanecer después de la calcinación. Las sales de Ba que restan en la solución no estorban en modo alguno la operación, la que se realizó con 10 c.c. de las bases haciendo dos análisis paralelos. Se emplearon dos cápsulas de 7 a 10 cm. de diámetro y 5 c.c. en cada una de ellas de la solución de Denis. La mezcla, fué secada empleando lámpara de rayos infrarojos con objeto de impedir pérdidas por ebullición. (En el original se recomienda solamente hacer la evaporación en baño de María.)

Una vez obtenido en ambas cápsulas el secado se procede a calentar a fuego directo hasta el rojo y se mantiene a esta temperatura durante 10 m. El residuo se disuelve en 10 c.c. de ácido clorhídrico al 10 %, diluyendo después a 50 c.c. se lleva a ebullición y una vez en estas condiciones se añaden a cada volumen 10 c.c. de una solución al 5 % de cloruro de Bario.

El sulfato de Bario precipitado se lava y pesa por el método usual.

Al mismo tiempo que estas operaciones se realizan es necesario practicar un análisis en el cloruro de Bario, con objeto de cuantear el azufre que pudiera contener, valor que se restará al encontrado en las bases. En general se acepta un error de una muestra a la otra de 1.5 mgrs. expresados en sulfato de Bario, lo que viene a modificar solo en pequeña escala el valor de la cistina.

Resultados:

a) 10 c.c. de muestra	0.00829 grs. de $BaSO_4$
b) 10 c.c. de muestra	0.00630 grs. de $BaSO_4$
muestra en blanco (BaCl)	0.00199 grs. de $BaSO_4$

Obteniendo el valor promedio de los resultados anteriores y transformando a nitrógeno tendremos 10 c.c. de solución de bases corresponderán a 0.435 mgrs. de N_2.

La cantidad de nitrógeno de la cistina en las bases, considerando 5 c.c. de las mismas, será de 0.2175 mgrs.

Lisina.—El nitrógeno de la lisina se calcula por diferencia, conociendo el valor de los tres aminoácidos anteriores: así sumando los nitrógenos de la

histidina, arginina y cistina y restando el valor de esta suma al nitrógeno total de las bases, obtendremos el nitrógeno correspondiente a la lisina.

3.2928	6.5800
+ 0.2175	5.2441
1.7338	1.3359
5.2441	

Según êsto, el valor del nitrógeno de la lisina en 5 c.c. de la solución de bases será de 1.3359 mgrs.

RESUMEN DE VALORES

Para 5 c.c. de solución de "Bases"

Nitrógeno total	=	6.5800 mgrs.
Nitrógeno Amígeno	=	2.9945 mgrs.
Nitrógeno Arginina	=	3.2928 mgrs.
Nitrógeno Histidina	=	1.7338 mgrs.
Nitrógeno Cistina	=	0.2175 mgrs.
Nitrógeno Lisina	=	1.3359 mgrs.

Capítulo V

ANALISIS DEL "FILTRADO DE LAS BASES"

En el Capítulo III (Pág. 17), describimos como a partir del hidrolisado exento de amoníaco y melanina, separábamos las "bases" por medio del ácido fosfotúngstico. Estas fueron separadas por filtración y lavadas con solución diluida de ácido fosfotúngstico. El líquido filtrado, conjuntamente con las aguas de lavado, fué adicionado de una solución de NaOH al 50 % hasta que la solución adquirió ligera turbidez (Precipitación del $Ca(OH)_2$ empleado para desalojar el NH_4OH. Se agrega ácido acético hasta que la solución se vuelve nuevamente clara (reacción ácida).

Al adicionar la sosa, es necesario no agregar sino unas cuantas gotas por encima del punto neutro, pues de lo contrario se forma un precipitado incapaz de ser redisuelto.

A continuación fué concentrado al vacío en el aparato de Claisen hasta iniciarse la cristalización, y aforado después a 250 c.c. Este filtrado llamado en el original de Van Slyke "Filtrado de las Bases", contiene los demás aminoácidos del hidrolisado.

Determinación del nitrógeno total.—Esta determinación se hizo por el método de Kjeldahl, modificación de Hengar. Se emplearon dos muestras de 10 c.c. cada una, y se recogió en cada caso el amoníaco en 50 c.c. de $H_2SO_4 \frac{N}{50}$

Titulación del amoníaco:

A) para 10 c.c. del filtrado se emplearon = 10.50 de $NaOH \frac{N}{50}$

B) el mismo resultado.

Por lo que:

$$10 \text{ c.c. de filtrado corresponden a } 50 - 10.50 = 39.5 \frac{N}{50} \text{ c.c.}$$

Relación a nitrógeno:

$$10 \text{ c.c. filtrado} = 39.5 \text{ c.c.} \times 0.28 = 11.06 \text{ mgrs. de nitrógeno.}$$
$$250 \text{ c.c. (Filtrado total)} = 276.7 \text{ mgrs. } N_2.$$

Nota.—La digestión con H_2SO_4, se prolongó por tres horas, después de que el líquido era claro, por la existencia del ácido fosfotúngstico.

Determinación del nitrógeno amígeno.—El nitrógeno amígeno se determinó por gasometría en el aparato de Van Slyke.

Para ello se emplearon 10 c.c. del "filtrado" obteniéndose a 20° C. y 582.2 mm. un volumen de 21.75 c.c.

La corrección por tensión de vapor de agua es de 0.25 c.c. por lo que el volumen resulta ser de 21.75 — 0.25 = 21.50.

Corrección a 0° y 760 mm.

$$Vo = \frac{21.50 \times 273 \times 582.2}{293 \times 760} = 15.362 \text{ c.c.}$$

Como solamente la mitad proviene del nitrógeno amígeno, tenemos:

10 c.c. del filtrado = 7.681 c.c.

Relación a peso del nitrógeno:

10 c.c. del filtrado = 7.681 N gas = 9.601 mgrs. N_2

y 250 c.c. (filtrado total) = 240.025 mgrs. $N(NH_2)$.

Nitrógeno no amígeno.—Estará dado por la diferencia entre los valores anteriores: 276.7 — 240.025 = 236.675.

250 c.c. (filtrado total) = 36.675 mgrs. N_2.

Prolina y Oxiprolina.—Siendo estos aminoácidos de nucleo pirrólico, incapaces de reaccionar con el ácido nitroso y, por otra parte, las únicas en el filtrado de las bases con esta característica, el valor 36.675 mgrs. N_2 debe considerarse como correspondiente a estos productos, bien sea que coexisten o que en el hidrolisado solo aparezca uno de ellos.

RESUMEN DE VALORES

"Para el filtrado de las bases" (total)

Nitrógeno Total	=	276.7	mgrs. de N_2
Nitrógeno Amígeno	=	240.025	„ de N_2
Prolina y Oxiprolina	=	36.675	„ de N_2

Nota.—En el valor nigrógeno amígeno quedan representados todos los demás alfa aminoácidos no determinados, con excepción de los que durante la hidrólisis fueron destruídos (triptofano).

En el método de Van Slyke no se determinan estos sino en conjunto, pero pueden ser cuanteados en el filtrado individualmente por otros caminos.

Distribución General del Nitrógeno

La hidrólisis fué realizada con 8 gramos de huevecillos exentos de grasas y lecitinas.

Los 8 gramos provienen de 9.625 g. de huevecillos naturales.

En el proceso se empleó una solución aforada a 125 c.c. que representaba la mitad del hidrolisado, por lo que corresponde también a la mitad de los huevecillos empleados.

Relaciones:

9.625 g.	=	8.00 g.
Huevecillos naturales.		Huevecillos exentos de lípidos.

125 c.c. de **Hidrolisado** = 4 g. **huevecillos exentos de lípidos** = 4.8125 g. — **huevecillos naturales.**

A) Nitrógeno total (125 c.c. Hidrolisado) = 461.37 mgrs.

B) Proteina calculada (Factor 6.25) = 2.8830 mgrs.

C) Nitrógeno Melanina insoluble (125 c.c.) = 7.585 mgrs.
% Nitrógeno en Nitrógeno total = 1.64%.

D) Nitrógeno Melanina soluble (125 c.c.) = 0.0.
% Nitrógeno en Nitrógeno total = 0.0%.

E) Nitrógeno Melanina (Túngstico) (125 c.c.) = 4.608 mgrs. N_2.
% N_2 en Nitrógeno total = 0.9988%.

F) Nitrógeno Amoníaco (125 c.c.) = 31.01 mgrs. N_2.
% N_2 en Nitrógeno total = 6.720%.

G) Nitrógeno total "Bases" (125 c.c.) = 131.6 mgrs. N_2.
% N_2 en Nitrógeno total = **28.52%.**

I) Arginina = 65.856 mgrs. N_2.
% N_2 en Nitrógeno total = 14.28%.

J) Cistina = 4.35 mgrs. N_2.
% N_2 en nitrógeno total = 0.943%.

K) Histidina = 34.676 mgrs. N_2.
% N_2 en nitrógeno total = 7.516%.

L) Lisina = 26.718 mgrs. N_2.
% N_2 en nitrógeno total= 5.79%.

M) Nitrógeno total del "Filtrado de las Bases" (125 c.c.) 276.718 mgrs.
% de N_2 en nitrógeno total = 59.98%.

N) Nitrógeno Amígeno total "Filtrado de las Bases" (125 c.c.) 240.025 mgrs.
% de N_2 en nitrógeno total = 52.02%.

O) Prolina y Oxiprolina (125 c.c.) = 36.675 mgrs.
% de N_2 en nitrógeno total = 7.96%.

Análisis General

Para 125 c.c. de hidrolisado.—(4.8125 g. de Huevecillos Naturales).

	Nitrógeno Mgrs.	N_2 % sobre N_2 Total
A) Humina Insoluble	7.585	1.640
B) Humina Soluble	0.0	0.0
C) Humina (Túngstica)	4.608	0.9988
D) Amoníaco	31.000	6.7200
E) Arginina	65.856	14.2800
F) Cistina	4.350	0.9430
G) Histidina	34.676	7.5160
H) Lisina	26.718	5.7900
I) Prolina-Oxiprolina	36.675	7.9600
J) Otros aminoácidos	240.025	52.0200
Total	451.493	97.6158

Análisis de las Bases.

	Relación a peso	% en huevecillos
Histidina	127.9 Mgrs.	2.659
Cistina	37.3 „	0.775
Lisina	139.3 „	2.895
Arginina	408.6 „	4.243
Bases totales	713.1 Mgrs.	10.572 %

Apéndice

DETERMINACION DEL NITROGENO AMIGENO

Método Volumétrico.—(Pope & Stevens). El método volumétrico empleado en la determinación del nitrógeno amígeno, para el control de la hidrólisis (Cap. III) llamado "Método de Titulación del nitrógeno amígeno", es el siguiente:

Fundamento:—Los aminoácidos dan lugar a la formación de sales solubles de cobre.

El contenido en cobre e indirectamente el nitrógeno amígeno es determinado por yodometría.

Reactivos:

1) **Cloruro Cúprico.**—$Cu\ Cl_2$ 27.3 g. por litro (0.16 M).
2) **Fosfato Trisódico.**—Disolver 64.5 gm. de $Na_2\ H\ PO_4$ en 500 c.c. de agua exenta de CO_3. Adicionar 7.2 gm. de NaOH y diluir la solución a 1000 c.c.
3) **Solución reguladora de Borato**: Disolver 57.21 gm. de Borato de Sodio en 1500 c.c. de agua y adicionar 100 c.c. de HCl. N., diluir a 2000 c.c.

Suspensión de Fosfato Cúprico: Mezclar 1 vol. del Reactivo de $Cu\ Cl_2$ (1) y 2 vol. del reactivo de Fosfato trisódico (2) y adiciónese de dos volúmenes de solución reguladora (3), prepárese la suspensión antes de cada titulación.

Timolftaleina: 250 mgrs. en 100 c.c. de alcohol al 50 %.

Tiosulfato de Sodio: Disuélvase 49.6 g. de $Na_2S_2O_3$ en 200 c.c. de agua exenta de CO_3 y diluyáse a 2000 c.c., adiciónese 0.1 % de solución reguladora de Borato y dilúyase la mezcla a 0.01 N antes de usarla con agua que contenga un poco de solución reguladora de Borato.

Iodato de Potasio: Disolver 356.75 mgrs. de KIO_3 seco en 1 lt. de agua.

Almidón: Preparar una solución de almidón al 0.1 % y ajustar su PH a 7.

Método: Adiciónese a un volumen de 1 c.c. a 5 c.c. de solución de aminoácidos 4 gotas de indicador y NaOH N hasta un ligero color azul, añádase entonces 30 c.c. de la suspensión de cobre $Cu_3\ (PO_4)_2$ mezclando bien. Dilúyase en 50 c.c. y fíltrese.

A 10 c.c. del filtrado añádase 0.5 c.c. de ácido acético y 1 g. de KI.

Titúlese el yodo con solución 0.01 N de $Na_2\ S_2\ O_3$ usando almidón como indicador interno.

Relación.—1 c.c. de solución 0.01 N $Na_2\ S_2\ O_3$ = 0.28 mgrs. de $N(NH_2)$.

Explicación.—Al neutralizar el hidrolisado ácido con sosa usando la timolftaleina, los aminoácidos quedan solubles en forma de sales de sodio.

Al adicionar la suspensión de fosfato de Cobre se forman complejos solubles de este elemento. Se afora a 50 c.c. y se filtra.

En el precipitado quedarán los productos de destrucción proteica, como melanina, posibles proteínas sin hidrolisar, etc.

Al tratar 10 c.c. del filtrado con yoduro de potasio y ácido acético se liberará yodo por efecto de la oxidación del ion cúprico sobre el yoduro. Este yodo será titulado por el tiosulfato empleando como indicador interno el almidón. La reacción final es la siguiente:

$$4I + 2\,Cu \longrightarrow Cu_2\,I_2 + I_2$$

precip. blanco.

Donde cada átomo de Cu pone en libertad otro de yodo.

$$Y\ 2\,Na_2\,S_2\,O_3 + I_2 \longrightarrow 2NaI + Na_2\,S_4\,O_6$$

Tetrationato de Sodio

Las relaciones de: 2N (NH_2), Cu, I, $Na_2\,S_2\,O_3$ dan lugar a que 1 c.c. de sol. .01 N dé $Na_2\,S_2\,O_3$ = 0.28 mgrs. de N. (NH_2).

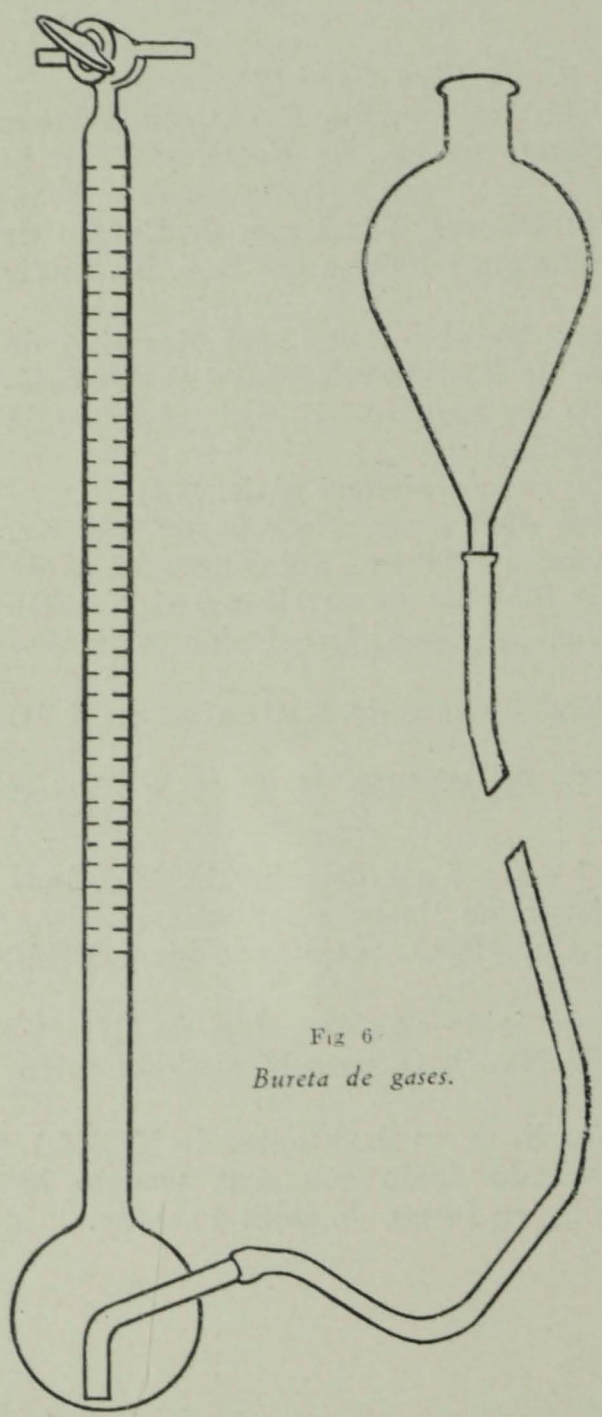


Fig 6
Bureta de gases.

Método Gasométrico.—Se realiza mediante el aparato de Van Slyke. (Fig. 3).

Consta de cuatro partes fundamentales: Deaminizador (Fig. 7), Bureta de gases (Fig. 6), Cámara de Absorción (Fig. 8) y Sistema de Agitación.

Está basado en la reacción del ácido nitroso con los grupos amígenos que da lugar a la formación de nitrógeno (gas).

$$R - CH(NH_2) - COOH + HNO_2 = R - CH(OH) - COOH + N_2 + H_2O.$$

La reacción se logra por el empleo de una solución de Nitrito de Sodio y Acido acético glacial.

En la primera fase de la operación se desaloja del sistema todo el aire que pudiere contener, reemplazándolo por el ácido nitroso. La bureta se encuentra totalmente llena de agua y su nivel se logra mediante un bulbo de altura regulable.

Al introducir la muestra de aminoácidos en el recipiente de reacción (Deaminizador), tiene lugar la producción de nitrógeno conjuntamente con la formación de óxido de nitrógeno según la reacción:

$$3HNO_2 \rightleftharpoons HNO_3 + 2\,NO + H_2O.$$

A fin de eliminar este gas, la mez-

cia se hace pasar a la cámara de absorción que contiene una solución alcalina de permanganato de potasio. Una vez que todo el NO ha sido fijado, el nitrógeno se hace pasar a la bureta de gases para su medición.

En todas las operaciones de reacción y absorción, el sistema de agitación

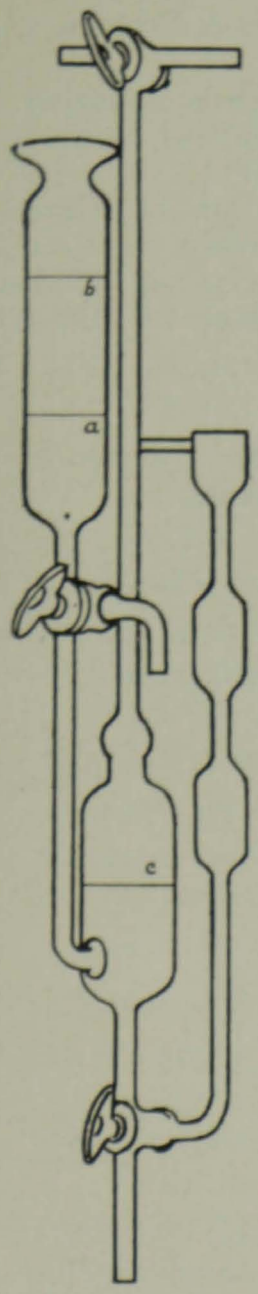


Fig. 7
Cámara de Absorción.

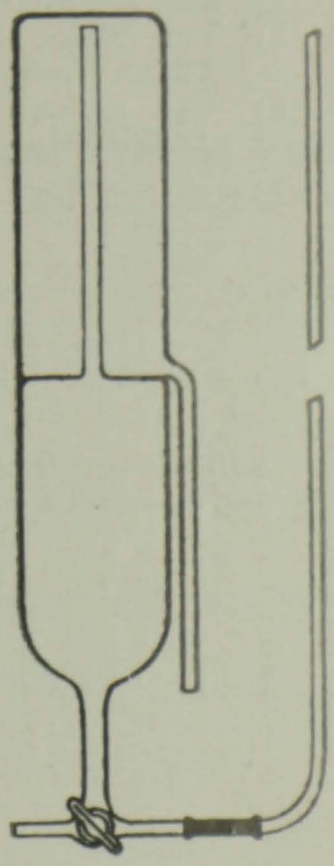


Fig. 8
Deaminizador.

que mueve a los tres aparatos fundamentales, permite alcanzar valores cuantitativos en unos cuantos minutos.

El aparato consta de una serie de llaves que comunican entre sí a los distintos aparatos del sistema, y cuyo manejo es en principio complicado.

El volumen de gas medido en la bureta es reducido a condiciones normales.

El aparato empleado es el modelo macro de Fisher Scientific Company, con el que se obtienen resultados de gran precisión.

Para mayores detalles sobre el aparato, su manejo y aplicaciones, pueden consultarse las siguientes obras:

1) Morrow C. A. "Biochemical Laboratory Methods", New York, 1927, P. 151.
2) Morrow & Sandstrom W. M.—1935.
3) Carl L. A. Schmidt.—The Chemistry of Aminoacids & Proteins with addendum.
4) Van Slyke, D. D.—A method for Quantitative Determinations of Aliphatic Amino Groups. Application to the Study of Proteolysis and Proteolytic Products. J. Biol. Chem. 9, 185 (1911).
5) Van Slyke, D. D.—The Quantitative Determination of Aliphatic Amino Groups II. J. Biol. Chem. 12, 275 (1912).
6) Van Slyke, D. D.—The Quantitative Determination of Aliphatic Amino Nitrogen in Minute Quantities. J. Biol. Chem. 16 (1913-14).

Bibliografía

Referencias de la parte zoológica e histórica.

1) *Sahagún Fray Bernardino de.*—Codex Original (1557) Biblioteca Nacional, México.

2) *Sahagún Fray Bernardino de.*—(1499-1590) "HISTORIA DE LAS COSAS DE ESPAÑA", Vol. III, (1938), Pág. 196.

3) *Hernández Francisco.*—"Rerum medicarum Novae Hispanie Thesaurus seu plantarum, animalium, mineralium mexicanorum". Roma, 1649.

4) *Clavijero Fco. Javier.*—"Storia Antica del Messico", Vol. I, II. Bologña, 1780.—Historia Antigua de México, Vol. I, 434-35 (1917).

5) *Prescott William H.*—"The ingenious contrivances to extract aliment from most unpromising sources". "The conquest of Mexico". Random House Inc. New York, N. Y., Vol. I, Pág. 137.

6) *Díaz del Castillo Bernal.*—"Historia verdadera de la Conquista de la Nueva España", 1904, Vol. I. Cap. 92. México.

7) *Coindet Leon.*—"Le mexique consideré du point de la vue medico chirurgical". París, 1867.

8) *Ancona L. H.*—Anales del Instituto de Biología, México. 4, 51. (1933).

Obras de Consulta y Referencias de la parte Química.

1) Notes on Mexican Drugs, Plants & Foods, III. Ahuautle, The Mexican Caviar By *Marced Bachstez y Altagracia Aragón.* México.

2) Biochemical Laboratory Methods.—*Morrow & Sanstrom.*—2ª Edición. John Wiley and Sons.

3) The Chemistry of Aminoacids and proteins with addendum.—*Carl L. A. Shmit.*—2ª edición.—Charles C. Thomas.

4) The Aminoacids Composition of Proteins and foods.—*Block & Bolling - Thomas.*

5) Précis de Chimie Biologique Médicale.—P. Cristol Collection de Précis Médicaux.—*Masson & Cia.*

6) Analytical Edition.—*Industrial & Engineering Chemistry.*—Julio 15, 1939, Vol. II, Nº 7, P. 355-414. Págs. 412-413.

7) Organic Quantitative Microanalisis.—*Niederl & Niederl.*—John Wiley & Sons.—1938, Págs. 16-17.

8) Outline of the Aminoacids and Proteins.—*Melville Sahyun M. A.*—Reinhold Publishing Corp.—1944.

9) Tratado de Química Orgánica.—*Dr. Enrique V. Zappi.*—El Ateneo.—Buenos Aires.

10) Organic Syntheses.—Vol. I, Págs. 49-612.—Gilman-Blatt. New York.—*John Wiley & Sons Inc.*

11) Handbook of chemistry and Physics.—20th. edition.—*Chemical Rubber Publishing Co.*—Cleveland Ohio, U. S. A.

12) Fisiología Química.—Págs. 62-111-153-159. *Prof. Dr. Emilio Lehnartz.*—Trad. *Dr. J. González.*—Campo de Coz, Barcelona. Manuel Marín, 1942.

13) Official and Tentative Methods Of Analisis of The Association Of Official Agricultural Chemists.—5th. edition.

14) Índice Merk.—5ª edición.—18-72-301-526.