

U N A M

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS QUIMICAS

# Estudio Papirográfico Comparativo de Amino-Acidos

ESTE LIBRO NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA  
TESIS PROFESIONAL QUE  
PARA OBTENER EL TITULO  
DE QUIMICO PRESENTA

ERNESTO HANHAUSEN ALBERT

MEXICO, D. F.

1 9 5 0

1777



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

ESTE TRABAJO FUE  
REALIZADO EN EL  
LABORATORIO DE  
PASANTES DE LA  
ESCUELA NACIONAL  
DE CIENCIAS QUIMICAS  
DE LA UNIVERSIDAD  
NACIONAL DE MEXICO,  
BAJO LA GUIA DEL  
APRECIADO MAESTRO  
DOCTOR EN QUIMICA  
DON JOSE GIRAL PEREYRA.

A mi padre (†)  
y a mi madre.

## CAPITULO I

### A. CROMATOGRAFIA.

a) ORIGEN E HISTORIA.

b) CLASIFICACION.

### B. AMINO-ACIDOS.

### a).—ORIGEN E HISTORIA.

El término Cromatograma (Cromatografía) proviene del alemán *Cromatogramm* que fué propuesto por Tswett (155) para designar un nuevo método mediante el cual se hacía posible la separación de los constituyentes de mezclas complejas (Clorofila de plantas); haciendo percolar el solvente que los contiene al través de una columna llena de material adsorbente. Los integrantes de la mezcla, se van separando en diferentes secciones de la columna conforme a su afinidad adsorbente.

Zechmeister (192) y Strein (155) atribuyen al descubrimiento de la mencionada "Cromatografía", al botánico ruso Tswett en el año 1906, sin embargo Martin (107) lo remonta al año de 1886 en que Schoenbeim publicó su "Análisis Capilar".

Desgraciadamente el libro de Tswett se publicó en ruso, (1910) y sus primeros trabajos, sólo aparecieron en revistas de botánica de poca circulación, a esto se debió que hubiera un periodo de estancamiento en el desarrollo de la Cromatografía, durante el cual sólo se publicaron trabajos aislados, sobre la separación de pigmentos de diferentes substancias, y que no tuvieron gran trascendencia en el terreno de la Química.

Entre estos trabajos se pueden citar los de los investigadores Dhéré y discípulos (1911); Palmer (1922); Palmer y Eckles (1922); Coward (1924) y Lipmaa (1926). También Willstaetter y Stoll; y Willstaetter e Isler (1912), habian hecho hincapié en las posibilidades que ofrecían las experiencias de Tswett (192).

La verdadera introducción de la Cromatografía como instrumento de la Química, puede decirse que se inició a principios de 1931,

cuando Khun y Lederer, y también Kuhn, Winterstein y Lederer, con todo éxito, aplicaron el "Análisis de Adsorción" al aislamiento de carotenos naturales, logrando la disgregación del caroteno, en alfa y beta carotenos.

Después siguieron los trabajos de Karrer y colaboradores, Strain y muchos otros.

Desde 1931 a nuestros días, el desenvolvimiento de la Cromatografía ha tomado gran importancia, encauzándose por diferentes caminos, y sujetándose a diversas transformaciones para aplicarse como un valioso procedimiento de separación en casi todas las ramas de la Química.

"Ningún otro descubrimiento ha ejercido tan gran influencia, y ha ensanchado el campo de la investigación del químico orgánico, tanto como el análisis Cromatográfico de Tswett..." Fueron las palabras de Karrer al referirse a la Cromatografía en su lectura ante el Congreso de Química efectuado en Londres en 1947, citado por Tiselius (163).

## b.—CLASIFICACION.

Con el objeto de localizar la posición que dentro de la Cromatografía en general, guarda la hoy tan en uso "Cromatografía de Partición en Papel Filtro" (Papirografía), de la cual nos ocuparemos en este trabajo, y en segundo lugar para dar una idea de conjunto de la variedad de procesos que se abarcan bajo el nombre de "Cromatografía", aprovecharemos la reciente clasificación propuesta por Meinhard (115), que se expone a continuación con toda amplitud.

Tratando de presentar a esta clasificación en forma más sencilla, se le han hecho algunas alteraciones, en el orden y forma de expresión, y se han omitido en ciertos casos algunos ejemplos.

El hacer una clasificación de la citada Cromatografía con fundamento en definiciones cuantitativas, es un problema un tanto complejo, y hasta cierto punto, imposible; pues aunque se conoce bien el efecto de los fenómenos que ocurren, la explicación de su mecanismo está aún muy discutida.

La diferenciación propuesta por Meinhard se fundamenta en el equilibrio en la disputa por el soluto que se lleva a cabo entre la fase móvil (líquido o gas) y la fase estacionaria (adsorbente), considerando completa reversibilidad entre los cambios intermedios que se efectúan, (requisito que en algunos casos no siempre es necesario).

Meinhard, agrupando de dos en dos los términos: Ion, Complejo, Dispersión y Asociación, establece arbitrariamente 16 combinaciones posibles, representando cada una de ellas a una clase; varias de las cuales se les puede identificar en los métodos ya co-

nocidos; otras, en cambio, sugieren nuevas posibilidades en la aplicación de la Cromatografía.

Definiciones que se les atribuye a los términos a que nos hemos referido:

**ION; (I).** Partícula de soluto con carga eléctrica definida, caracterizada por su estructura simple y su tamaño sub-coloidal.

**COMPLEJO; (C).** Producto de la interacción reversible entre una partícula de soluto de estructura sencilla y un agente complejante (formador de complejos), para dar lugar a nuevas especies. La combinación implica ligaduras coordinadas o de carácter auxiliar.

El complejo puede ser una estructura simple, (con o sin carga) o un agrupamiento relativamente grande y complicado, de partículas, que se puede representar como una dispersión coloidal, como un precipitado o bien como un depósito inmóvil en la fase sólida.

**DISPERSION; (D).** Producto de la interacción reversible de un soluto con otro soluto, o con el mismo solvente para producir especies menos asociables con este último.

Esta disminución de asociabilidad, se manifiesta cuando se agrupan las partículas para formar dispersiones coloidales o precipitados visibles.

Aquí no se incluye a las dispersiones que se originan por un proceso de formación de complejos. Sin embargo, sí se incluyen las dispersiones de proteínas, silicatos, jabones, colorantes, polímeros orgánicos y otras partículas que pueden o no tener carga iónica, según el pH, la adsorción, u oclusión de iones, la presencia de grupos disociables, etc.

**ASOCIACION; (A).** Mutua atracción entre una partícula de soluto y otra substancia (tanto en el líquido como en la fase sólida, o bien en ambos) o entre dos partículas de soluto de la misma especie, sin implicar ligaduras fijas.

Caracterizado por ser un complejo de ligadura muy débil de composición indeterminada (:H: Dipolos, etc.).

-----

Estas definiciones, según se da a entender en el reporte de Meinhard, están fundadas en la expresión convencional de los fe-



nómenos bien determinados que se originan, sin entrar a profundizar su mecanismo. Consecuentemente, estos términos los emplea como títulos descriptivos, y no como definiciones exactas, agrupándolos, hasta cierto punto, en forma arbitraria.

1a. CLASE; (I-I) Cambio de iones; solución de iones en la fase líquida contra resina cambiadora de iones en la sólida.

La relativa afinidad de los iones por adsorberse, parece depender en primer lugar de la valencia, grado de hidratación y de basicidad.

Un ejemplo lo tenemos en la separación del Zirconio y Hafnio, en solución 6M de ácido clorhídrico, contra una resina cambiadora de iones. El Hafnio, más básico, aparece primero en el efluente.

2a. CLASE; (C-I). Un refinamiento de la clase anterior, incorporando en la fase líquida a un agente complejante de los integrantes de la mezcla.

La separación se efectúa de acuerdo con el grado de basicidad, de los individuos que se traten de separar.

Se ilustra esta clase con el trabajo de Spedding (115) y otros, sobre la separación de tierras raras, en individuos espectrofotográficamente puros, empleando como agente complejante a una solución reguladora de citrato en la fase móvil y una resina cambiadora de iones como fase estacionaria.

La separación por este proceso equivale a la que se podría obtener mediante varios miles de recristalizaciones fraccionarias.

3a. CLASE; (I-C). Invirtiendo el sistema de la clase 2, empleando un agente complejante en la fase sólida, se hace posible la separación de iones.

Erlenmeyer y Dahn (115) proporcionan una ilustración de esta clase, empleando 8-hidroxiquinolina como "adsorbente", logran la separación de varios metales, reconocibles por los complejos coloridos que forman en la columna.

El pH en la fase líquida es el factor importante en esta clase.

Hace notar Meinhard, que este método no ha tenido mayor desarrollo, debido a la dificultad de encontrar agentes complejantes para la fase estacionaria; sin embargo, indica la posibilidad de incorporar estos agentes, en un sólido para constituir así la fase inmóvil de este sistema.

4a. CLASE; (C-C). Se puede también establecer el equilibrio en la competencia entre un complejo en la fase móvil y un complejo en la fase sólida.

Por ejemplo una mezcla de citratos cromatografiada en columna de 8-hidroxiquinolina, la separación se fundará también en el grado de basicidad.

Hasta ahora no parece haber sido reportado ningún trabajo sobre esta clase.

5a. CLASE; (I-D). Al tiempo del desarrollo cromatográfico, a una solución de cationes, se le precipitan éstos al estado coloidal, aumentando gradualmente el pH. El coloide formado, siendo menos móvil que los iones originales, es retenido en los intersticios del adsorbente, originándose zonas de separación.

Este mecanismo ha sido ensayado por Meinhard y Hall (115).

Parece que algunas de las separaciones inorgánicas por simple cambio de iones, que se han reportado, en general se efectúan conforme a este proceso.

6a. CLASE; (C-D). Al sistema descrito en la clase anterior, se le puede modificar, formando primero, complejos con los iones originales.

El mecanismo implica la previa descomposición del complejo, antes de la precipitación de una zona, y no debe confundirse con el de la clase 15 en la cual el complejo es adsorbido como tal en la columna.

La separación se basará en las estabilidades relativas de los complejos y en la movilidad del agente complejante.

Donde la cromatografía de iones simples no conduce a una separación útil, se puede emplear un agente complejante para modificar el orden y precisión de las zonas.

Al parecer, poco se ha trabajado en este tipo de separaciones, y la formación de especies menos móviles, a consecuencia de la hidrólisis, ha sido grandemente desatendida.

7a. CLASE; (Dispersión-dispersión). En esta clase, el grado de copulación del coloide en la fase líquida es a menudo diferente y casi siempre menor a su agregación cuando está en contacto con la fase sólida.

Desgraciadamente en el caso de la separación de proteínas, éstas son con frecuencia adsorbidas irreversiblemente, pudiéndose originar su desnaturalización en la fase sólido-líquida.

Esto sugiere un procedimiento que al parecer no ha sido reportado, que consiste en emplear como la fase inmóvil, a una estructura proteínica sólida, que además de presentar mayor especificidad por las diferentes proteínas, tendría un poder de adsorción más débil.

Se han reportado aplicaciones algo diferentes a esta clase, como por ejemplo, la preparación comercial de dispersiones de sílice; haciendo pasar una solución de silicato de sodio, sobre una resina cambiadora de iones, previamente tratada con ácido, que retiene los iones de sodio y libera al ácido silícico coloidal exento de sales.

8a. CLASE; (I-A). Se establece la disputa entre la solución de iones frente a un sólido, que no contiene centros individuales de atracción.

La atracción de los iones por el sólido, es debida a un fenómeno de doble capa eléctrica.

Una descripción del proceso, la da Bickerman (115), el efecto se incrementa solamente a bajas concentraciones.

Es difícil prever cómo está clase puede ser la base de un proceso cromatográfico útil; sin embargo, puede ser interesante la consideración de este efecto con relación a la migración de iones en los suelos y en otras formaciones geológicas.

9a. CLASE; (D-I). Se ha descrito la posibilidad de cromatografiar una dispersión coloidal (proteína) contra una resina cambiadora de iones.

En este proceso el coloide se combina iónicamente con el adsorbente.

En seguida se describe una interesante aplicación de este sistema al caso de sales inorgánicas solubles.

Si a una dispersión acuosa de sulfato de bario, se le cromatografía en una resina cambiadora de iones (cationes), previamente tratada con ácido, el ión  $\text{Ba}^{+2}$  debe adsorberse, mientras que aparece ácido sulfúrico en el efluente. Es claro que la separación de una mezcla de cationes puede efectuarse al mismo tiempo.

Esta aplicación puede ser de utilidad, en los métodos donde algunos iones interfieran y sean difíciles de eliminar por otros medios.

10a. CLASE; (D-C). Si sustituimos a la resina cambiadora de iones de la clase 9, por un agente complejante, se obtiene un nuevo proceso.

Un ejemplo lo tenemos, en el práctico método de cromatografiar en forma de dispersión, y sobre 8-hidroxiquinolina, a una mezcla de metales obtenidos al estado de sales muy poco solubles, sin necesidad de su transformación previa, en especies más solubles. El método, desde luego, tiene un empleo limitado.

11a. CLASE; (A-A). En este tipo, se considera la disputa entre el solvente y la fase estacionaria, por su "asociación" con el soluto, interviniendo sólo en grado mínimo la acción de cargas iónicas.

Ya que las diferencias en el grado de asociación pueden provenir de alteraciones mínimas en la molécula, la separación de los solutos depende únicamente de sus estructuras.

Aquí se cita como ejemplo a la cromatografía de compuestos orgánicos descrita por Zechmeister y Cholnoky (192).

Meinhard, clasifica a la CROMATOLOGRAFIA DE PARTICION SOBRE PAPEL FILTRO, dentro de esta clase, y afirma que su diferencia con la cromatografía ordinaria, depende en primer lugar de la selección de medio y no en su mecanismo.

Una consideración más completa sobre esta clase, trataremos de hacer en el siguiente capítulo.

12a. CLASE; (A-D). El efecto catalítico de un adsorbente sobre un soluto determinado, ocasionalmente puede dar lugar a la polimerización de este último, para causar la formación de agregados moleculares.

Este material puede adsorberse irreversiblemente, o circular a lo largo de la columna, a una velocidad tal que haga posible su separación de otro soluto que no haya sido afectado en la misma forma.

13a. CLASE: (A-I). Un adsorbente puede causar la disociación catalítica de una molécula de soluto con la formación de especies iónicas en el adsorbato.

Como el proceso puede ser irreversible, en algunos casos se puede usar un solvente lo suficientemente polar, para efectuar la recombinación de los iones.

Se puede prever que podrá tener lugar una recombinación en tal forma que se produzca una mezcla más compleja que la original.

Sin embargo, este proceso ha sido la base de varias separaciones por ciertos tipos de cromatografía de partición, donde ocurre una ionización solvolítica en la fase acuosa.

14a. CLASE; (A-C). El empleo de una fase sólida que forme complejos con solutos orgánicos parece que no ha sido reportado.

El desarrollo de este proceso debe verificarse en condiciones anhidras, para evitar complicaciones de carácter iónico.

15a. CLASE; (C-A). Encontrándose el soluto en forma de complejo, en el seno de un solvente, será retenido como tal por el sólido, y en forma de asociación.

Se puede ilustrar esta clase con el método de separación de ditizonatos de metales pesados, en columna de alúmina.

16a. CLASE; (D-A). Si el soluto de la clase anterior, se encuentra en forma de dispersión coloidal, y no de complejo, tendremos a esta última clasificación.

Tiselius describe este sistema aplicado a proteínas que son débilmente o no adsorbidas, haciéndolas fuertemente copulables mediante la presencia de una sal (salificación). Desde luego, la eficacia del método dependerá de la completa reversibilidad entre las especies presentes.

-----

De acuerdo con lo indicado por el autor de esta clasificación, se puede notar que algunos métodos cromatográficos como por ejemplo el consistente en una combinación de precipitación con adsorción por cambio de iones, con que recientemente se logró aislar al elemento 97 (149), no quedan totalmente definidos dentro de una sola de estas clases, sino que habría necesidad de recurrir a clasificar a las diferentes etapas del proceso, haciendo uso de más de uno de los tipos de clasificación que hemos relatado.

Debido a que la clasificación de Meinhard ha sido aparentemente hasta ahora la única reportada, y por el interés que encie-

rra, nos hemos detenido quizá un poco más de lo necesario sobre este punto.

El término Cromatografía, como se ha podido observar, a pesar de significar un proceso donde interviene la producción de color, también se aplica a varios otros donde no tiene lugar la formación de ninguna coloración, por lo cual probablemente fuera más propio emplear la palabra "Adsorbografía" para designar a todos estos procesos, incluyéndose así tanto a los que tuvieran relación con color, como a los que no.

## B. AMINO-ACIDOS

Ya que el presente trabajo está enfocado al estudio de los amino-ácidos, y en especial de los alfa-amino-ácidos, que son los que se obtienen como producto de la hidrólisis de proteína, en esta parte de este capítulo haremos un breve estudio de las propiedades de estos compuestos, insistiendo principalmente en algunas de aquellas que constituyen fundamento de métodos de identificación, separación y cuanteo.

Los alfa-amino-ácidos, son sustancias que se caracterizan por tener además del agrupamiento carboxílico, un átomo de nitrógeno ligado al carbón contiguo al  $-\text{COOH}$  en forma de un radical amino.

A estos cuerpos se les representa por la fórmula general:



Todos los alfa-amino-ácidos naturales, son ópticamente activos (L), exceptuando a la glicina. Esto es de gran trascendencia biológica, pues se ha podido comprobar que los amino-ácidos con excepción del citado anteriormente, que son inactivos a la luz polarizada, casi siempre son inactivos en las funciones biológicas.

Son sustancias cristalinas e incoloras, que debido a su carácter iónico, presentan propiedades de una sal.

Los alfa-amino-ácidos con excepción de la tirosina, tiroxina y cistina, son muy solubles en agua e insolubles en alcohol y éter, la prolina y la hidroxiprolina, son solubles en ambos solventes.

Al grupo de la glicina, alanina, valina, leucina, nor-leucina, iso-leucina, fenilalanina, tirosina, treonina, serina, prolina, hidroxipro-

lina, triptofano, tiroxina, metionina, cistina y cisteina; se le ha caracterizado por su neutralidad, sin embargo, hay que hacer notar que el agrupamiento = NH del triptofano, no presenta carácter básico, por otra parte los mismos agrupamientos, en la prolina hidroxiprolina e histidina, son marcadamente básicos. El grupo fenólico de la tirosina es ligeramente ácido.

(Connant, J. B., "The Chemistry of Organic Compounds", 1944).

Es interesante notar la relación entre las estructuras de la arginina y de la histidina, así como la existente entre la ornitina (que a su vez deriva de la arginina por acción de la arginasa) y la prolina; en ambos casos se puede suponer que tiene lugar una ciclización con pérdida de H y NH<sub>3</sub>, en igual forma se puede hacer la comparación entre las estructuras de la ornitina y la hidroxiprolina.

**CLASIFICACION.** Para agrupar a los amino-ácidos se han empleado varias clasificaciones, entre ellas podemos citar a la consistente en agruparlos según sus estructuras, en series: alifática, aromática y heterocíclica, o bien según su carácter ácido o básico, en ácidos, básicos y neutros.

**CARACTER DIPOLAR.** Como es bien sabido, los amino-ácidos son substancias de carácter anfótero como consecuencia de sus agrupamientos —COOH y NH<sub>2</sub>.

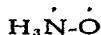
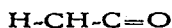
Por el paso del protón del carboxilo al radical amino, tenemos al ión anfótero (Iion-Zwitter).

En el caso de los alfa-amino-ácidos, al estar en solución en agua, el radical —COOH presenta mayor tendencia a perder su protón, que el grupo —NH<sub>2</sub> tiene de recibirlo.

En vista de este fenómeno, para obtener un equilibrio entre el centro de cargas negativas y positivas, es necesario aumentar ligeramente la concentración de protones en la solución. (H). Entonces se llegará al punto iso-eléctrico de la molécula, en este punto hay una neutralidad de cargas que se manifiesta porque en este estado la molécula es incapaz de ser transportada en el campo eléctrico, como sucede con los iones.

Antes se suponía que este estado se debía a una reacción interna del amino-ácido (A), o bien se le atribuía a que no había disociación, o si la había ésta era en un grado mínimo (B).



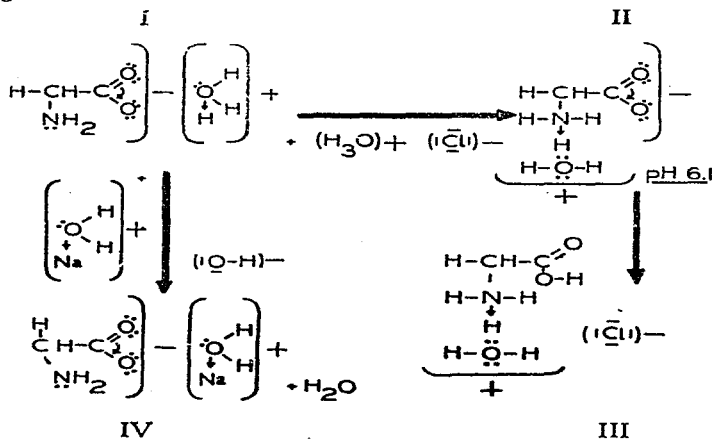


(A)



(B)

Tomando el ejemplo de la glicina, en seguida exponemos la acción de ácidos y bases sobre este amino-ácido, estando disuelto en agua.



La fórmula I), nos representa la mayor tendencia del carboxilo, de perder su protón; la (II), después de haber agregado una mínima cantidad de HCl, nos representa al ión anfótero, continuando la adición del ácido, tenemos al clorhidrato (III) y por otra parte la (IV) nos representa a la sal del ácido, también al estado disuelto.

El ejemplo anterior, ilustra el caso típico para un amino-ácido con un solo grupo básico y un grupo ácido, que reaccionan con un equivalente de ácido o de base.

Aquellos que tienen mayor número de agrupamientos ácidos que de básicos, reaccionarán con mayor cantidad de base, así el ácido



Las uniones Quelato del complejo se efectúan en vista de la relativa poca disociación de los iones metálicos.

Con metales alcalinos o alcalinotérreos, no se puede suponer la formación de un complejo, debido a la gran disociación de estos iones metálicos.

Desde los primeros trabajos sobre amino-ácidos, (como el aislamiento de la cistina (1810), de la glicina y leucina (1820), de la tirosina (1846), y de otros amino-ácidos, determinados aisladamente), no se había contado con un método sistemático, para la separación de ellos de las mezclas obtenidas de la hidrólisis de proteínas; sino hasta el año de 1901 en que Emil Fisher encontró que la mezcla de los esteres de estos ácidos podía fraccionarse sin descomponer, por destilación al vacío. Después se han empleado varios otros procedimientos sistemáticos de separación, por precipitación selectiva, y en condiciones controladas, de sus sales metálicas, o bien aprovechando sus solubilidades en diferentes solventes; por precipitación con ácido silicotungástico, etc.

Entre los métodos que han tenido mayor aplicación en los últimos años, se puede citar a otros procedimientos sistemáticos, como los basados en el transporte de iones en solución, y a la variedad de métodos cromatográficos, que como ya se ha dicho, han tenido un extraordinario desarrollo.

Una extensa discusión de todos los últimos adelantos sobre la determinación de amino-ácidos, se puede consultar, así como una abundante bibliografía, en el reporte de recopilación de Martin y Synge (110-a).

Sobre la importancia que implica el estudio de los amino-ácidos, ya no vamos a insistir, puesto que ya este punto, ha sido muy tratado en otros trabajos de tesis recientemente presentados en la Escuela Nacional de Ciencias Químicas. (U.N.A.M.).

## CAPITULO II

### PAPIROGRAFIA

- a. DESENVOLVIMIENTO Y APLICACION AL PROBLEMA DE SEPARACION E IDENTIFICACION DE AMINO-ACIDOS.
- b. CONSIDERACIONES TEORICAS.
- c. EXPRESION DEL VALOR "Rf" EN FUNCION DEL COEFICIENTE DE PARTICION.
- d. APLICACIONES (Incluyendo a las introducidas en este trabajo).

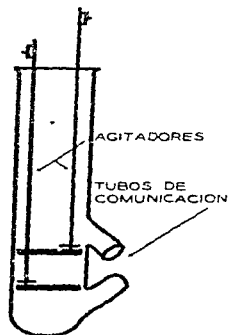
a. **DESENVOLVIMIENTO Y APLICACION AL PROBLEMA DE SEPARACION E IDENTIFICACION DE AMINO-ACIDOS.**

El primer intento de separación de amino-ácidos aprovechando sus solubilidades relativas entre dos solventes no miscibles, lo realizó Syngé en 1939 (109); más tarde, aprovechando sus experiencias preliminares, y en unión de Martín (1941), (109), publicó un trabajo sobre la separación de amino-ácidos, basada en la extracción por contracorriente líquido-líquido. En él se menciona que la resolución matemática de los problemas de destilación fraccionada continua aclaran la analogía entre todos los casos de contracorriente incluyendo las extracciones líquido-líquido. Se señala la ventaja de esta técnica en contraposición con los métodos de destilación, entre otras cosas, porque se hace posible la separación de substancias no volátiles, se pueden fraccionar cantidades muy pequeñas, y además en la extracción fraccional "los coeficientes de partición" (función del balance entre los núcleos polares y los no polares de la molécula) son el factor determinante de la separación. En el de destilación lo es la volatilidad, y esto ocasiona, que en muchos casos, la resolución del problema por el método de extracción resulte más sencilla.

El aparato que emplearon para su experiencia, estaba construido por una serie de cuarenta tubos comunicados unos con otros, al través de los cuales, y en direcciones opuestas fluyen dos solventes no miscibles. La separación de los constituyentes de la mezcla sólo es posible en los tubos de comunicación, pues dentro de los tubos principales, hay unos agitadores que mantienen constantemente una emulsión entre los dos líquidos.

La mezcla de los amino-ácidos (acetilados) se coloca en uno de los tubos del centro de la serie.

En el esquema adjunto se puede observar a uno de los tubos.



Los amino-ácidos, son arrastrados selectivamente en el solvente por el cual presentan mayor afinidad, avanzando primero el que sea más soluble en él.

La separación se efectúa siempre en un sentido, y éste será en el que avance el solvente más afin a los componentes de la mezcla.

De esta experiencia, se tomó como conclusión, que para efectuar una separación, se haría necesaria una serie de tubos mucho más numerosa.

En la siguiente tentativa, Martin y Synge (110) substituyen a las series de tubos por una columna cargada de gel de sílice, en la cual el agua contenida en el gel constituía una de las fases del sistema.

Se colocó en la parte superior de la columna una mezcla de amino-ácidos acetilados, contenidos en un volumen mínimo, sobre de ellos se dejó percolar lentamente el otro solvente, y los amino-ácidos se localizaron por una serie de bandas coloridas debidas al cambio de color del anaranjado de metilo que se colocó en la columna a manera de indicador. Esta columna representa varios millares de tubos de separación.

En 1943, Martin y Synge (68) en unión de Gordon, continúan los trabajos sobre la separación de amino-ácidos en columna de gel de sílice, y encuentran que el análisis es impracticable debido a la adsorción de varios de ellos por la sílice, sin embargo se indica que se obtuvieron buenas separaciones empleando celulosa en forma de tiras de papel filtro.

Consden, Gordon y Martin, publican en el año de 1944 (31) un trabajo describiendo una técnica microanalítica para la determinación de amino-ácidos contenidos en un hidrolizado de lana. El método no es sino un refinamiento de las experiencias adquiridas anteriormente, y emplean papel filtro como columna de absorción. Esta técnica es en parte similar al "análisis capilar" de Schoenbeim, modificado por Goppelsroeder (31) (155), publicado el mismo año en que Tswett reportó el uso de las columnas de adsorción.

La separación de los amino-ácidos por esta técnica, tiene lugar debido a las solubilidades relativas de cada amino-ácido, entre el líquido contenido en cantidad constante en las fibras de celulosa del papel filtro de porosidad adecuada, y un solvente no miscible o parcialmente miscible en agua, al cual se le deja absorberse lentamente por las fibras del papel, pasando por el lugar donde se ha aplicado la mezcla de amino-ácidos a los cuales irá separando a lo largo de su recorrido. Siendo las distancias a que se separan, función de los coeficientes de partición característicos de los diferentes amino-ácidos, pueden éstos identificarse fácilmente ya sea por el uso de un reactivo que al reaccionar con ellos produzca una coloración, que nos revele su posición en el papel o bien por cualquier otro medio que nos lleve a los mismos resultados.

— — — —

Para localizar, la posición a la que ascienden los diferentes solutos en un "papirograma", se emplea su valor "Rf"; término propuesto por Consden y colaboradores (31) para designar al cociente de dividir la distancia a la cual avanza el soluto, entre la que avanzó el solvente.

## b. CONSIDERACIONES TEORICAS.

Con objeto de visualizar el posible mecanismo de la "Cromatografía de Partición Sobre Papel Filtro", a la que en lo sucesivo nombraremos con el término de Papirografía (Papirograma) nombre que ya varios autores han propuesto (5, 143, 158), coconsideremos a continuación, la partición ordinaria de un soluto entre dos solventes parcialmente miscibles, e identifiquemos después a los factores de esta partición, en la "Papirografía".

Convencionalmente se ha designado con el nombre de "solvente" (líquido) a la substancia en la cual el "soluto" (material que se disuelve) está uniformemente distribuido y en un estado de división tal que las partículas no pueden distinguirse, ni separarse del seno de la "solución" al permanecer el líquido en reposo.

Agitando una mezcla de los solventes A y B parcialmente miscibles, si se les deja en reposo, se separarán al cabo de un tiempo dos capas; en una de ellas estará el solvente A saturado del B, y en la otra a su vez estará el B saturado del A, constituyendo dos fases en equilibrio, que designaremos con los números I y II.

Estas dos fases son totalmente inmiscibles mientras no se desplace el equilibrio por causa de una variación en la temperatura, o bien por la evaporación de uno de los solventes.

Si al tiempo de mezclar a los dos solventes, agregamos una porción de un soluto, al separarse las dos capas encontraremos que el soluto estará disuelto en las dos fases, en proporción definida.

La relación de la cantidad de soluto disuelta en una de las fases, y la cantidad disuelta en la otra, nos expresa el coeficiente de



partición característico del soluto entre los dos solventes (A y B) para una temperatura dada.

En un desarrollo Papirográfico, empleando líquidos parcialmente miscibles, como es el caso de la separación de amino-ácidos mediante el sistema fenol-agua, podemos considerar a la fase I de la partición ordinaria, como la fase móvil del sistema, y a la II como la estacionaria detenida en las fibras del papel filtro.

Al ponerse en contacto las dos fases con el soluto, éste será adsorbido por ambos en proporción determinada por su coeficiente de partición entre los dos solventes. La movilidad del soluto, a lo largo de la tira de papel, será directamente proporcional a su afinidad por la fase en movimiento, y en esto se basará su separación de otros solutos que tengan diferentes coeficientes de partición.

La idea general de partición, nos proporciona, como hemos visto, un medio para explicar el mecanismo "Papirográfico", cuando se pueden concebir dos fases bien diferenciadas; sin embargo, este concepto no nos aclara la forma en que se efectúa la partición papirográfica cuando se emplean solventes miscibles. Conden y colaboradores (31) reportan que este caso se puede explicar, si se supone, que la celulosa, por efecto de salificación (salting-out), permite al sistema actuar como un diagrama de partición.

Por otra parte Meinhard (115) al establecer la semejanza entre la Cromatografía "Ordinaria" y la de Partición, anota que la diferencia no estriba en los mecanismos, haciendo ver que la estructura del líquido, en la fase móvil de la de Partición, está notablemente modificada por la proximidad del adsorbente (celulosa) asemejándose en esta forma a una "fase líquida inmisible".

De acuerdo con lo anterior, podemos entonces explicar el mecanismo papirográfico, cuando se emplean solventes miscibles, teniendo en cuenta que el papel húmedo constituye una fase líquida no miscible, que se disputa con el líquido móvil, la asociación con el soluto.

Si bien la acción adsorbente, o mejor dicho sorbente, ya que tiene lugar tanto una absorción como una adsorción de la celulosa, se admite que obra sobre el solvente adherido a las fibras del papel, no se quiere con esto indicar que la celulosa tenga acción directa adsorbente sobre los solutos (amino-ácidos), al menos en

las condiciones en que se efectúa el desarrollo, pues de ser así, la separación se haría impracticable, como sucedió cuando Conden y colaboradores (68) intentaron la separación de una mezcla de amino-ácidos en la columna de gel de sílice. Además, por las experiencias de England y Cohn (J. Am. Chem. Soc., 57, 634 (1935)), se debe suponer que la cantidad de amino-ácidos que pueden ser adsorbidos por la celulosa, es despreciable, y por consiguiente se le puede considerar como un soporte inerte con respecto a los amino-ácidos.

El efecto de la temperatura es fácil de explicar, ya que cualquier cambio de la misma, nos indica un desplazamiento del equilibrio entre las fases, por lo cual es aconsejable mantener la temperatura constante durante el desarrollo.

Si profundizamos un poco más el mecanismo de la partición "Cromatográfica" nos encontramos ante el problema relativo a las fuerzas de interfase; adsorción, elución, etc.

Es interesante considerar la interpretación de la Cromatografía dada por el propio Tswett (116) "...El método; pone en juego uno de los caracteres físicos más sobresalientes de los compuestos químicos, su acción sobre la tensión superficial de las soluciones, conforme al teorema termodinámico de Gibbs; una sustancia que deprime la tensión superficial del solvente, tiende a acumularse en la superficie y a ser adsorbida, en tal forma que el coeficiente de partición entre la solución y la superficie, puede volverse infinitamente pequeño" es decir, desaparece el soluto de la solución, para formar el adsorbato "la filtración de una solución apropiada de una mezcla de pigmentos, al través de una columna de sustancia pulverulenta neutra, podrá, consecuentemente, conducir a la separación de los componentes, siguiendo el orden decreciente de sus actividades respectivas sobre la tensión superficial".

Como se puede observar, Tswett da una idea general de la interpretación fisico-química de la separación, pero no explica a qué fuerzas se debe esa unión del pigmento con las partículas de polvo, empacadas en la columna, ni indica el comportamiento del solvente a donde la tensión superficial es más afectada por el soluto.

Al principio se interpretaron estos fenómenos, por razonamientos puramente matemáticos (Wilson).

Willstaetter (1912) parece haber sido el primero que al hablar de la "Alomerización" de las clorofilas, durante el desarrollo Cromatográfico, despertó el interés por la interpretación de las fuerzas que permiten la copulación de unos cuerpos con otros durante esta operación analítica. No obstante el resurgimiento de la Cromatografía en el año de 1931 y los sucesivos, no se prestó atención a las ideas de Willstaetter.

Más tarde, Fisher y Stern 1940 atribuyen la "Alomerización" de las clorofilas, a la acción de los átomos de oxígeno en las moléculas, y no dan mayor importancia a este hecho.

Recientemente, aprovechando los trabajos de Higgins (1926), sobre los "mecanismos de adsorción", explicados con fundamento en la teoría electrónica de la valencia, y haciendo uso de los nuevos conceptos de esta teoría, Meunier y Vinet, dan un paso más hacia el esclarecimiento de estos problemas, llegando a la conclusión de que el antiguo concepto de la salificación es suficiente para explicar la adsorción en fase acuosa. Como hemos visto, Consden ya había explicado la partición en un sistema de solventes miscibles, (en papirografía) por efecto del "salting-out" (salificación) de la celulosa.

A continuación y principiando con una corta descripción de algunos de los principales tipos de ligaduras intermoleculares, veremos las formas de adsorción propuestas por los ya citados autores Meunier y Vinet; aquellas que sólo se verifican en ausencia de solventes polares (oxígeno y doble ligadura) y las que pueden ocurrir si que en ellas influya la presencia de solventes polares (Nitrógeno y oxígeno ligado a una estructura resonante).

Esto nos interesa desde el punto de vista de la explicación de la fluorescencia que adquieren los amino-ácidos impregnados en el papel filtro, al ser sometidos al calentamiento, y además nos pueden proporcionar una ilustración para la formación y modo de actuar de la "fase inmiscible estacionaria", a que ha hecho referencia Meinhard.

## LIGADURAS INTERMOLECULARES:

1.—FUERZAS DE VAN DER WAALS.—Es London (1930), quien por medio de la mecánica cuántica, da una interpretación de estas fuerzas. Son la resultante de las perturbaciones periódicas (muy

rápidas), que ejercen las envolturas electrónicas de las diferentes moléculas, unas sobre las otras. Esta perturbación es debida a la deformabilidad de las "nubes" electrónicas, por influencia mutua que ocasiona en cada molécula una especie de "dipolo por inducción instantánea".

Estas fuerzas desaparecen a corta distancia, pero siempre existen, sea cual fuere la estructura electrónica de la molécula, y es debido a ellas el que sea posible la licuefacción de los gases inertes.

Estas fuerzas no se localizan en un punto especial de la molécula, como sucede con otras de naturaleza electrostática mucho más poderosa. En general, no se les considera que desempeñen un papel de importancia en los fenómenos cromatográficos.

2.—UNION IONICA.—Entre las ligaduras electrostáticas, la más importante de ellas es la unión iónica; resultante de la atracción de Coulomb del exceso de las cargas eléctricas de iones con cargas opuestas (Pauling). Este es el tipo de ligadura de las sales solubles en agua (ver la primera ecuación de la segunda parte del capítulo primero).

En papirografía este tipo de unión se puede considerar que no tiene lugar, sino más bien intervienen las fuerzas polares y las ligaduras hidrógeno que en seguida describimos.

3.—FUERZAS POLARES.—Aquí se considera solamente a los dipolos que aparecen con la polarización parcial de una ligadura covalente (C-O, C-N), o en ligaduras semipolares, pero sin implicar el paso de un electrón como sucede en la ionización completa.

A estas fuerzas se debe la unión de las moléculas de celulosa.

Y es a ellas a quien se les atribuye lo que se puede denominar como adsorción polarizante. (116).

4.—LIGADURA HIDROGENO.—Se nombra a la asociación de una molécula neutra con un átomo donador de electrones, sirviendo de intermediario un átomo que coordine, generalmente H; cuando la unión implica la formación de ciclos que se le denomina Quelato.

Se supone que obren en esta forma, una parte de los oxhidrilos de la celulosa.

Como se ha visto, el término de partición, está intimamente ligado con la solubilidad, observemos ahora, la relación que guar-



un cuerpo oxigenado (aldehído), el (I) sobre una tierra ácida y el (II) sobre un adsorbente polar. La presencia de un donador de electrones (un solvente oxigenado, p. e.: un alcohol), provocará en ambos casos la elucción, pasando por la formación intermedia de un "oxónium" muy inestable; ver esquemas (III) y (IV).

La descomposición de uno de estos oxónium, generalmente dará lugar a la regeneración de los compuestos iniciales (adsorbente, adsorbido y solvente).

El oxónium formado, únicamente tendría estabilidad, en aquellos casos en que participe de un fenómeno de mesomería. Ej. esquema (V).

Lo que se ha dicho para los cuerpos oxigenados, se puede aplicar para la adsorción de una doble ligadura.

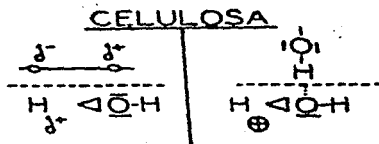
A continuación veamos la forma de adsorción de un cuerpo nitrogenado, tomando como ejemplo a una amina adsorbida por una tierra ácida (VI).

Esta adsorción, es mucho más estable que la de los cuerpos oxigenados, debido a la formación de la cuarta ligadura del N, no habiendo empobrecimiento de algún octeto como sucede en la adsorción de los cuerpos oxigenados que acabamos de ver; la presencia de un solvente con átomos donadores de electrones no causará la elucción, y ésta se llevará a efecto agregando un ácido (HCl).

Así nos podemos dar una idea de la forma en que pudieron haber sido adsorbidos, algunos amino-ácidos, en la columna de gel de sílice que emplearon Consden, Martin y Syngé. Suponiendo que el N del radical amino, (para determinado pH) tuviera una mayor afinidad por el adsorbente que por el protón del carboxilo, y esto podría interpretarse, porque algunos y no todos los amino-ácidos, fueron adsorbidos en las condiciones de la experiencia, solamente aquellos en los que el pH en el gel, favoreciera este tipo de adsorción.

Sin embargo, la adsorción en estos casos, también se pudiera deber, a la neutralización de dipolos.

La influencia de la celulosa sobre el solvente (agua por ejemplo), de la "fase líquida inmiscible a que se refiere Meinhard, pudiéramos representarla por uno de los esquemas siguientes:



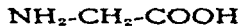
En la misma forma en que se establece (116) la relación entre cromatografía (adsorción y color) y mesomería, trataremos de hacer ver la influencia de la adsorción, sobre la resonancia en una estructura, con relación al notable incremento de la fluorescencia a la luz U. V. que presentan los alfa-amino-ácidos frente a la celulosa, al ser sometidos al secado a diferentes temperaturas.

Ya De Ment (38) había reportado que los amino-ácidos al estado cristalino producen fluorescencia bajo la luz de 3650 Å de longitud de onda. Probablemente esta fluorescencia sea debida a una cristaloluminiscencia.

La fluorescencia se incrementa extraordinariamente, al ser secado el papel filtro donde se encuentran adheridos los amino-ácidos, no sucediendo esto si se les seca sobre un vidrio, (Patton); aquí se puede notar cómo la celulosa desempeña un papel activo en el fenómeno.

Patton y colaboradores (129) reportan que la fluorescencia de los amino-ácidos en estas condiciones, aparece al ser secados (sobre papel) a una temperatura de 105 grados C. y no aparece si son secados al aire. Phillips (133) reporta que la fluorescencia comienza a aparecer a pesar de que el secado se haya hecho solamente a 37 grados C., y hace notar que aumenta notablemente a medida que se eleva la temperatura; además, nos proporciona un dato que parece ser de interés para las consideraciones que haremos a continuación, y es que todos los amino-ácidos, presentan visiblemente la misma fluorescencia, lo cual da lugar a pensar que este fenómeno se origina en alguno de los agrupamientos comunes a todos ellos.

Tomemos el caso concreto de la fluorescencia en la glicina, adherida sobre el papel y secada entre 37 y 105° C.:



De las formas de adsorción vistas más atrás, se puede precisar, que es el radical  $-\text{NH}_2$  el que toma parte activa en la adsorción frente a un dipolo (ligadura C-O polarizante) o frente a un oxhidrilo ( $:\text{H}:$ ) de la celulosa (papel) y podemos sacar en conclusión, que necesariamente las consecuencias de este hecho deben transmitirse al resto de la molécula.

Meunier y Vinet, al comprobar la gran disminución de la "adsorbilidad" de los grupos alcohólicos, cuando se les esterifica, explican que se puede interpretar este hecho como una manifestación de la mesomería que, se engendra en el agrupamiento carboxílico, sustituido o libre. Anotando que el sistema electrónico de este grupo se estabiliza por su resonancia, teniendo, por consiguiente, poca tendencia, a ceder sus electrones a un sistema exterior.

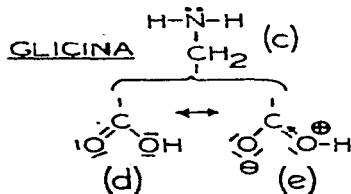
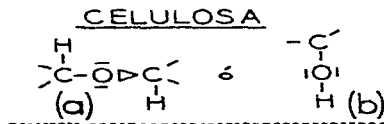
Este hecho, además de indicarnos la existencia de la mesomería en este agrupamiento, nos da otro argumento sobre el porqué no puede el  $-\text{COOH}$  actuar frente a la celulosa.

La fluorescencia producida puede servir de medio de comprobación de la resonancia de un carboxilo.

Los esquemas de Adsorción-fluorescencia que presentamos nos muestran una posible forma de representar el fenómeno:

#### Adsorción-fluorescencia.

- (a) Ligadura polarizante (C-O, dipolo).
- (b) Oxhidrilo de la estructura ( $:\text{H}:$ ).





c. EXPRESION DEL VALOR  $R_f$  EN FUNCION DEL COEFICIENTE DE PARTICION.

Movimiento de la banda de soluto

$$R_f = \frac{\text{Movimiento de la banda de soluto}}{\text{Movimiento del frente de avance de la fase móvil.}}$$

Movimiento del frente de avance de la fase móvil.

Martin y Synge (108), verificando un cálculo similar al de una columna de destilación continua (empacada), de acuerdo con el concepto de Peter (del H.E.T.P.), y considerando un cromatograma de tipo especial, constituido por dos fases líquidas, obtienen el valor R:

Movimiento de la posición de máxima concentración del soluto.

$$R = \frac{\text{Movimiento de la posición de máxima concentración del soluto}}{\text{Movimiento simultáneo de la superficie del líquido desarrollador, en la parte vacía del tubo sobre la columna cromatograma.}}$$

Movimiento simultáneo de la superficie del líquido desarrollador, en la parte vacía del tubo sobre la columna cromatograma.

$$R = \frac{A}{A_1 + \alpha A_2}$$

en donde; en el papel:

$A$  = Area de la sección transversal del papel más agua más solvente.

$A_1$  = Area de la sección transversal de la fase líquida móvil.

$A_s$  = Area de la sección transversal de la fase líquida estacionaria.

$\alpha$  = Coeficiente de partición =  $\frac{\text{Conc. en la fase acuosa.}}{\text{Conc. en la fase solvente.}}$

Como este valor  $R$  no es fácil de medir en un papirograma, Conden y colaboradores (28), proponen la introducción del término  $Rf. = f' (A_1, A_s, \alpha)$ .

$$Rf. = \frac{A_1}{A + \alpha A_s} = \frac{A_1}{A_1 + \alpha A_s}$$

$$y \quad \alpha = \frac{A_1}{A} \cdot \left( \frac{1}{Rf} - 1 \right)$$

$\frac{A_1}{A}$  es igual a la relación de volúmenes en la fase agua y en la fase solvente del Papirograma.

Varios intentos se han hecho para calcular la cantidad de soluto presente en una región del papel, Flood (28a), establece una relación entre la magnitud del radio de la zona ( $r$ ) y la concentración ( $C$ ).

$$r = F (\log C - A)$$

$A$ , representa una constante para el papel.

A pesar del trabajo de varios investigadores para establecer las bases teóricas (de cálculo) de la "Cromatografía de Partición", hasta ahora no se ha llegado a aclarar el problema. Algunos otros informes sobre este punto, pueden consultarse en el reporte de recopilación de Clegg (28a).

#### d. APLICACIONES.

El trabajo de Consden y colaboradores (31) ha sido el punto de partida de muchos otros, que presentando ciertos cambios e innovaciones, se han venido publicando, durante los últimos años.

Del estudio de un buen número de estos reportes, con aplicaciones a diversos problemas, se puede decir a pesar de la cantidad de trabajo realizado, que el campo de aplicación de la papirografía, está comenzando a explorarse. Cada publicación abre las puertas a nuevas e imprevistas investigaciones.

Se ha tratado de aplicar el método papirográfico, ya no sólo a la separación e identificación de amino-ácidos, sino a un gran número de otros cuerpos, habiéndose obtenido para algunos de ellos, resultados aún más satisfactorios que los encontrados en la determinación de los propios amino-ácidos.

A continuación vamos a mencionar algunas aplicaciones que se han dado a la papirografía, comenzando con los trabajos relacionados con la determinación de amino-ácidos:

**AMINO-ACIDOS.**—La primera aplicación fué realizada por el propio Consden (31), al determinar los constituyentes de un hidrolizado de lana; proponiéndose en esta ocasión, por vez primera, el empleo de la Técnica Papirográfica, haciendo uso de solventes como el fenol y la colidina, y empleando la reacción de la ninhidrina para la localización de los amino-ácidos sobre el papel.

Ultimamente se ha determinado por este método las características de la lana pura o desaminada (29).

Dent (41) hace uso de esta técnica para la determinación de amino-ácidos en la orina de casos patológicos, y otros líquidos bio-

lógicos, empleando para el caso de la orina, muestras sin hidrolizar, aplicadas directamente al papel. También se ha empleado el método papirográfico, para la determinación de amino-ácidos libres en saliva humana (64), habiéndose efectuado los análisis, dos horas después de haber ingerido alimento.

Albanese y Lein (3), determinan lisina (como su sal de Cu) en concentrados de orina humana y en filtrados de sangre.

Se ha reportado el contenido de amino-ácidos obtenido por papirografía, de hidrolizados de seda (141), insulina (133) gramicidina (157), glándula tiroidea (80), de proteínas, de espermatozoos de mamíferos (162), de núcleos de células (162), y de salmón (71).

Polson (139), reporta la composición de la *Escherichia Colli*, Wykoff (138), la de los bacteriófagos.

Consden (32) consignó la ausencia de nor-leucina en la médula espinal (ver 107). Se ha investigado por papirografía la presencia de amino-ácidos y otras sustancias que reaccionan con la ninhidrina, en plasma humano deproteinizado (2).

Roberts y Tishkoff (145, 146), determinaron la distribución de amino-ácidos en epidermis de ratón, en diversas fases de su desarrollo, haciendo un comentario sobre la diferencia entre los tejidos normales y los anormales.

Se han hecho otros estudios (7) sobre el contenido de amino-ácidos en diferentes tejidos de ratón, confirmándose la presencia de ácido aspártico, glicina y alanina, llamando la atención el parecido en la constitución de los diferentes tejidos (corazón, hígado, etc.).

Se reportan otros trabajos sobre el contenido de amino-ácidos en tejidos (146), extractos de los mismos, y proteínas de enzimas (170).

Pratt y Auclair (143), identifican varios amino-ácidos en la sangre y tejidos de insectos.

Li y Roberts (97), utilizan la papirografía, para la determinación de amino-ácidos libres, en embriones de rana y en fracciones de mitocondrios.

Agren (1), reporta la constitución de la proteína de Bence-Jones, donde, aparecen la mayoría de los amino-ácidos conocidos, con excepción de la hidroxiprolina y la metionina.

Auclair y Jamieson (6) determinan la presencia de amino-ácidos libres y en hidrolizado de proteínas, de diferentes muestras de polen.

se consigna la utilidad del método para poder valorizar el poder nutritivo de las mieles de abeja.

Se ha investigado la presencia de amino-ácidos libres y en hidrolizado de proteínas de la jalea real, extraída de un panal de abejas (144).

Linggood y Woiwod (99), aplican la papirografía al control de producción de toxinas diftéricas, habiéndose notado un aumento progresivo de casi todos los amino-ácidos, durante el periodo de cultivo. Experiencias preliminares indican la presencia de algunos amino-ácidos desconocidos en vibrios de cólera (15).

Por otra parte se reporta (90), haber determinado por el método de Consden, que en la *Drosophila*, glándulas salivares, y clara de huevo, no hay amino-ácidos libres, y se encontraron estos ácidos al estado de libertad, en las raíces del trillium, anteras de trandescantia y en las yemas de huevo.

Patton y Foreman (128), investigan la presencia de glicina, empleando como reactivo específico de este cuerpo, al o-ftaldehído, aplicado sobre el papel; el método lo aplican a la determinación de este amino-ácido en hidrolizados de caseína. De tres muestras de hidroxiprolina expandidas en el comercio, se determinó por este procedimiento, que una de ellas estaba contaminada con glicina (128).

Se han reportado varios otros trabajos que tratan de hacer de la papirografía un método cuantitativo para la determinación de amino-ácidos (16, 52, 92, 122, 183).

Fink, Dent y Fink (50) llevan a cabo estudios sobre el metabolismo de la glándula tiroidea, inyectando ratas con yodo radioactivo; la presencia de los amino-ácidos ordinarios se determinó con ninhidrina, y la tiroxina y diyodotiroxina, mediante el procedimiento "Cromatográfico-radioautográfico" (50).

Se reportan estudios biológicos con el auxilio de la papirografía, de la "Clorela" tratada con radio-isótopos. También se ha reportado otro trabajo sobre la distribución del yodo en la tiroidea (25).

Se determina la presencia de amino-ácidos sulfurados, en las diferentes zonas del papel, mediante la reacción de la azida de sodio (26), o empleando yodoplatinato como reactivo ( $\text{Pt I6} =$ ) (180), o bien empleando S radioactivo como marcador (166).

Se han realizado diferentes estudios sobre la constitución de proteínas, determinando su contenido de amino-ácidos o péptidos (2,

33, 35, 37; 39, 43, 56, 77, 79, 81, 87, 101, 131, 136, 137), también se ha ensayado el estudio de proteínas y enzimas, desarrollándolos sin hidrolizar (58).

Bergstroem y Paabo (14), publican la determinación del ácido amino-adípico; otros autores (8), reportan haber experimentado el procedimiento de partición en papel, en extractos de tejidos a los cuales se les purifica previamente de grasas y proteínas. Repórtese la aplicación del procedimiento de Conden y colaboradores, a la vestigación de amino-ácidos en queso rancio (156) y en fracciones de proteínas de hojas de plantas (103, 104).

Woiwod y Linggood (184) publican un trabajo sobre la determinación de N amino.

. Aparece un reporte en que se describe la separación de 19 di péptidos diferentes, de los ácidos aspártico y glutámico se les identifica en fracciones obtenidas por tratamiento con resinas cambiadoras de iones seguida de una separación ionoforética (34). Se estudian otras fracciones de proteínas (127), y se comprueba la pureza de péptidos obtenidos sintéticamente (96).

También se reporta la separación de N amino-ácidos substituídos (60).

**ACIDOS GRASOS** (156) y otros ácidos orgánicos (102). Se reporta la determinación de ácido fumárico y otros ácidos orgánicos relacionados con el ciclo metabólico del ácido cítrico determinado en tejidos de rata (106).

Se ha efectuado también la determinación papirográfica de la presencia de ácido úrico en alas de mariposa (Pieris Napi) (67) y se habla de la separación de estos ácidos. (24).

**AMINAS PRIMARIAS AROMATICAS**, determinadas por Ekman (47); aquí se propone la aplicación del método a la determinación de sulfas; Tabone y colaboradores (159) reportan un trabajo sobre la determinación de arilaminas.

**ANTOCIANINAS Y ANTOCIANIDINAS** (9, 10, 152), y otros compuestos relacionados con extractos de pétalos de flores (9, 10).

**AZUCARES Y SUBSTANCIAS REDUCTORAS**. (20, 26, 125, 185); Forsyth (56) introduce el empleo de reactivos coloridos (resorcinol y naftoresorcinol) para la determinación de azúcares reductores y no reductores; Flood y colaboradores (54) reportan la

determinación cuantitativa de mezclas de 3 ó 4 azúcares simples y metilados, con una exactitud del 5%, empleando como revelador el reactivo micro-Cu de Somogyi. Aplican su método (54) al análisis de gomas vegetales y otros materiales similares, y establecen la composición de la goma de *Opuntia Fúlgida*.

Se emplea la reducción del permanganato en solución alcalina, para determinar la presencia de carbohidratos reductores (124); Partridge (126), determinó por papirografía, el contenido de azúcares en el jugo de naranja, clara de huevo y sangre fetal de carnero. Se determinaron cuerpos reductores en la orina, empleando como reactivo sobre el papel, una solución de bencidina (82). Hawthorne (75), describe un procedimiento para la microdeterminación papirográfica de azúcares con una aproximación del 5%.

#### COLINA Y SUBSTANCIAS ANALOGAS (19).

CREATINA Y CREATININA (4) Maw (112, 113), determina creatina en presencia de creatinina, en orina de rata. El desarrollo lo efectúa en cámara con control de temperatura (15 — 0.05° C) y localiza la presencia de estas sustancias con picrato de sodio en solución alcalina.

ERGOTIONEINA, determinada por Work (184), empleando la reacción de Folin y Marenzi.

ESTEROIDES, Zaffaroni (191), publica un trabajo sobre la separación e identificación de esteroides.

HISTAMINA, Urbach y Giscafré (168, 169), identifican la histamina en la sangre.

HALOGENUROS y SCN-; se ha aplicado la papirografía a la separación de halogenuros y sulfocianuros (126) y halogenuros entre sí (93, 94, 95, 175).

HORMONAS, Burton y colaboradores (23), han logrado determinar por el procedimiento de Consden, cantidades muy pequeñas de hormonas (adrenal y cortical) en orina humana.

#### LIPIDOS NITROGENADOS, (26).

PURINAS Y PIRIMIDINAS (171, 172), Hotchkiss (83), reporta la separación cuantitativa de purinas, pirimidinas y nucleósidos; también se aplica la papirografía a la separación de derivados del ácido nucleico, y a la purina, y pirimidina (105).

PENICILINA. Las primeras técnicas papirográficas para la resolución de mezclas de penicilinas, fueron reportadas por Goodall



y Levi (65, 66). Se han publicado otros trabajos muy completos sobre la determinación de estas sustancias (86, 89).

**PIGMENTOS FLAVONOIDES**, Pterinas y cuerpos similares: Good y Johnson (67) determinan la presencia de Xantopterina, leucopterina y otros varios no identificados, Wender y Gage, (174) reportan la determinación de pigmentos flavonoides empleando reactivos que produzcan color o fluorescencia bajo la luz ultravioleta.

**RIBOFLAVINA**, Hais y Pakáková (70), estudian los productos de descomposición fotolítica de la riboflavina.

A estas y muchas otras aplicaciones que pueden leerse en el reporte de Clegg (28a), podemos añadir las aplicaciones que nosotros hemos hecho de la papirografía, sobre los estudios papirográficos comparativos preliminares de concentrados de hidrolizados de cabellos humanos, de diferentes colores, y la aplicación a la determinación comparativa de sustancias que dan la reacción de la ninhidrina en concentrados de hidrolizados de pescado (mojarra, guachinango, etc., muestras obtenidas de la tesis de la E.N.C.Q. de Anza, S. B., en la proteína de huevos de ahauatli (Muestra donada por el Instituto de Nutriología Nacional), en la levadura de cerveza, y en proteína de maíz integral.

### CAPITULO III

#### METODO

- A. DESCRIPCION DEL TRABAJO DE CONSDEN Y COLABORADORES.
- B. MUESTRA. (Hidrólisis).
- C. PAPEL FILTRO.
- D. SOLVENTE.
- E. SEPARACION E IDENTIFICACION.
- F. REACCION DE LA NINHIDRINA.  
ESPECIFICIDAD:  
FORMACION DEL CUERPO COLORIDO.
- G. APARATO.

## A. DESCRIPCION DEL TRABAJO DE CONSDEN Y COLABORADORES.

El método original de Consden, Gordon y Martin (31) se puede resumir en la forma siguiente:

En una tira de papel filtro de grueso y porosidad adecuados, se coloca una muestra de la mezcla de amino-ácidos que se van a separar, ocupando una pequeña área cercana a uno de los extremos de la tira; el borde de este mismo se sumerge en un baño que contiene el líquido que va a ascender (179) o descender sobre el papel (31), y que a su paso irá dejando en diferentes zonas a los constituyentes de la mezcla.

Si la separación no es completa por la ascensión o descenso de un solo solvente, se emplea un segundo solvente; para lo cual se substituye la tira por un cuadro de papel; cerca de uno de sus vértices, se coloca la muestra, y un borde adyacente a este lugar se sumerge en un solvente. Verificada la separación, se elimina al líquido del papel y se le hace girar 90° sobre la arista cercana al lugar donde se colocó la muestra, de tal forma que el otro borde se pueda sumergir en un segundo solvente, que se moverá en dirección perpendicular al recorrido del primer solvente. Los salutos que avancen más despacio en el primer solvente, serán separados por el segundo.

La separación en todos estos casos, se efectúa en cámaras cerradas, donde se mantiene una atmósfera saturada en equilibrio con el sistema líquido que se esté usando. La localización de los solutos en el papel, se puede hacer por cualquier procedimiento que los haga visibles, mediante un reactivo que produzca con ellos una coloración o bien por su fluorescencia a la luz ultravioleta.

## B. MUESTRA (Hidrólisis).

Tratándose del análisis de aminoácidos, la preparación de la muestra, debe asociarse en la mayoría de los casos, con los procedimientos de hidrólisis de proteínas.

La hidrólisis de proteínas se puede efectuar mediante la acción de enzimas, álcalis o ácidos, en condiciones apropiadas (17).

La hidrólisis enzimática, no es aconsejable para la preparación de muestras papirográficas, ya que el desdoblamiento de la proteína del enzimo, falsearía los resultados.

En la mayor parte de las determinaciones papirográficas en las cuales se ha necesitado hidrolizar proteínas, en general, se ha preferido la hidrólisis ácida (Ej. con HCl 0.5N durante 40 horas a 90° C. (71) ó 6N, HCl, 24 horas en tubo cerrado (97, 98).

Tanto en la hidrólisis con sosa o potasa como en la llevada a cabo con HCl, se presenta el problema de la eliminación de estos reactivos, después de completada la desintegración de las proteínas.

La eliminación del ácido clorhídrico, o de sosa o potasa, por mutua neutralización, tiene el inconveniente de dejar un exceso de sales solubles.

Consden y colaboradores, en su trabajo original (31) efectuaron la hidrólisis de la lana con HCl, y ponen especial cuidado en evitar la presencia de un exceso de sales solubles, ya que su presencia interfiere en la separación papirográfica, para lo cual eliminan el exceso de HCl por destilaciones sucesivas al vacío.

No obstante, Dent (41) reporta haber realizado papirogramas satisfactorios, con líquidos biológicos conteniendo una relación de amino-ácidos a sales solubles, algunas veces superior a 15 a 1.

Consden (30) en un reporte posterior vuelve a insistir sobre la interferencia de las sales solubles, y afirma que el efecto de distorsión en la separación papirográfica, se puede observar aun estando estas sales en cantidades muy pequeñas.

Hasta ahora el procedimiento que ha resultado tener mayor aplicación para la eliminación del exceso de sales solubles, es el propuesto por Consden y colaboradores, para desalar electrolíticamente, (35). Sin embargo, tratándose de determinaciones en serie, donde la purificación por este procedimiento resultaría demasiado lenta,

Kirby y Cain (88), estudiando un método que les permitiera efectuar determinaciones rutinarias de amino-ácidos en orinas, proponen un sistema que consiste en la interpretación de papirogramas obtenidos con muestras de concentrados de orina, de alto contenido en sales solubles.

Por medio del control del efecto de estas sales, en el desarrollo de amino-ácidos en papirogramas, se pudo interpretar la posición de las bandas distorsionadas, en papirogramas de concentrados de orinas (88), a pesar de esto, en el mismo reporte, se hace notar que no se pudo obtener un resultado tan preciso, como el que se obtuvo con muestras purificadas.

El desarrollo papirográfico, debe de mantenerse dentro de un equilibrio constante, entre las fases del sistema. La localización de sales solubles en alguna región del papel, produce una acumulación de agua en esa zona, debido a la higroscopicidad de estos cuerpos, originándose entonces un desequilibrio momentáneo entre las fases en ese punto, que originará la difusión de las bandas de soluto que atraviesen ese lugar.

Algunos autores (88, 179), entre ellos el mismo Consden (35), propone para contrarrestar en parte este efecto, el saturar el agua con que se mezcla el solvente (fenol) con sal (NaCl) (35, 179), o con  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (88); también se ensayó para el mismo fin, el saturar el papel con sal (35).

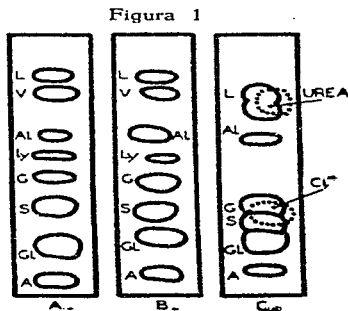
La adición de estas sales al solvente o al papel, tiene influencia sobre el color producido por algunos amino-ácidos con la ninhidrina, por ejemplo, se reporta que la adición de una solución 0.2N de NaCl disminuye el tamaño y produce un enrojecimiento muy notable de la mancha de la alanina (21).

Consden encuentra que este sistema saturado de sal, hace que se enrojezca el color de las manchas de los amino-ácidos con la ninhidrina, y los valores  $R_f$  disminuyan considerablemente.

La aparente discordancia entre el reporte de Dent y los de Consden, con respecto a la interferencia de las sales solubles, es explicable, puesto que en los líquidos diluidos (como en la orina de casos patológicos con que trabajó Dent), aunque la relación de sal a amino-ácidos es elevada, la concentración de la sal en la muestra, no llega a ser tan excesiva para motivar que los fenómenos de distorsión, fueran muy apreciables. La interferencia del

efecto salino, más bien se hace notable al trabajar con concentrados, en los cuales, la muestra que se aplica al papel tenga una alta concentración salina.

En la figura 1, tomada del reporte de Kirby y Cain (88), podemos apreciar objetivamente el efecto de la presencia de sales solubles.



- A.—Papirograma típico de una mezcla de amino-ácidos desprovista de sales.
- B.—Papirograma típico de amino-ácidos en orina, con su usual contenido salino.
- C.—Papirograma típico de amino-ácidos en un concentrado de orina.

Para el desarrollo de estos papirogramas, (88), se empleó fenol, con agua saturada de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , con objeto de contrarrestar la difusión excesiva de las manchas, por causa de la presencia de sales.

No teniendo medios para ensayar la técnica de purificación electrolytica de Consden, y habiendo llegado el reporte de Kirby y Cain, demasiado tarde para haberlo considerado en el presente trabajo, se ensayaron los métodos que a continuación exponemos.

Por habernos propuesto el estudio comparativo de diferentes contenidos proteinicos, los cuales se les obtenia en la mayor parte de los casos, en hidrolizados conteniendo un exceso anormal de sales solubles, y presentando el método por destilaciones sucesivas al vacío, un problema superior al posible de resolver en forma prác-

tica dentro de las condiciones del laboratorio, se ensayó un procedimiento aprovechando las experiencias de McCollum y Rider (114) sobre el fraccionamiento de hidrolizados de proteína en sistemas no acuosos.

Se ha encontrado que todos los alfa-amino-ácidos, son solubles en algunos solventes orgánicos, muy especialmente en acetona, cuando están presentes ácidos orgánicos, como el canfo-sulfónico, dicloro-acético, tricloro-acético, p-tolueno-sulfónico, benceno-sulfónico, y n-butil-sulfónico. Se puede precipitar los amino-ácidos de tales soluciones con gas amoníaco seco. En un hidrolizado de caseína, lograron (114) recuperar por este procedimiento muy cerca del 100% del contenido de amino-ácidos.

El procedimiento de McCollum y Rider, está basado en el fraccionamiento por extracciones sucesivas, de unas 20 a 60 porciones, conteniendo cada una de ellas respectivamente a los ácidos más solubles, en las primeras fracciones, y a los menos solubles en las últimas; cada una de estas fracciones, se les sometió a desarrollo papirográfico.

También se reporta el empleo de ácido tricloro-acético, para eliminar yodo inorgánico en hidrolizados de glándulas tiroides (25).

En los últimos meses apareció un trabajo en el cual se describe la extracción de los amino-ácidos que se encontraban al estado de libertad en un material, extrayéndolos con acetona conteniendo una muy pequeña cantidad de ácido clorhídrico. (Boulangier, P. y Biserte, G. Bull. Soc. Chim. Biol., 31, 696 (1949), en C. A., 44, 1556 (1950).

Nosotros hemos elaborado un procedimiento sencillo de purificación de muestras de hidrolizados secos, de muy alto contenido salino, (ver capítulo siguiente), empleando una solución de ácido tricloro-acético en acetona, para separar los alfa-amino-ácidos de las sales solubles.

La recuperación de los amino-ácidos se puede efectuar, precipitándolos en el seno del solvente con gas de amoníaco seco. Sin embargo, para la obtención de muestras en serie, resultó más rápido el eliminar a la acetona, y al ácido tricloro-acético, por evaporación a temperaturas entre 40° y 60° C.; sometiendo todas las muestras a idéntico tratamiento. Esta forma de eliminar al "solvente", aunque para nuestro estudio comparativo preliminar, re-

sultó satisfactorio, en la mayor parte de los casos; no es recomendable cuando se trate de análisis cuantitativos individuales, pues la presencia de otros compuestos que se solubilizan junto con los alfa-amino-ácidos, pueden en esas condiciones catalizar la descomposición de cierta cantidad de algunos de ellos.

Esto se hizo particularmente notable al eliminar por evaporación los solventes en una muestra de hidrolizado de maíz, donde hubo probablemente una total descomposición de los amino-ácidos; esto se pudo comprobar al resultar negativa la reacción con la ninhidrina. Tratándose de la purificación de hidrolizados de proteínas, prácticamente puras, como lo son las de cabello humano, la eliminación de solventes por evaporación dió buen resultado. También se empleó este método en la purificación de hidrolizados de pescado, ahuatli y levadura de cerveza, obteniéndose también en estos casos buenos resultados.

También ensayamos un método que consiste en hidrolizar con hidróxido de bario, eliminando el exceso de esta base, con ácido sulfúrico, hasta llegar al punto de neutralización; esta parte se llevó a cabo en condiciones propicias para eliminar al mínimo la posibilidad de adsorción, por el precipitado, y para facilitar el filtrado (forma descrita para la precipitación cuantitativa de sulfato de Ba; del Dr. F. Hahn).

Después de separar el precipitado, se concentró el líquido restante, con el cual se preparó la muestra papirográfica.

El papirograma obtenido con hidrolizado de maíz integral que reportamos, fué preparado en esta forma:

Después del hidrolizado, el siguiente motivo de consideración, es la forma de preparar y aplicar la muestra papirográfica.

Generalmente se emplea una disolución acuosa de los amino-ácidos, y se les coloca en muestras desde 400 microgramos (31), aplicados con un volumen de 12 microlitros, con ayuda de tubos capilares, en una área relativamente grande, hasta cantidades inferiores a 1 microgramo aplicadas en volúmenes menores de 0.2 microlitros, con ayuda de la ultra-Microbureta de Gilmont (147), ocupando una área húmeda no mayor de 1.5 mm. de diámetro.

También se reporta haber aplicado alicuotas mayores de muestra, entre 50-100 microlitros. (6, 144).



Se ha podido analizar muestras cuantitativas desde 1 microgramo (91) hasta 5 microgramos (134), y mayores.

El problema se presenta, cuando se quieren colocar mayores cantidades de muestra, en una pequeña área del papel.

Urbach (168), describe un dispositivo de aplicación continua que le permite colocar mayores cantidades de muestra, pudiendo colocar 1 ml. por hora, en una zona entre 2-3 cm. de diámetro. Emplea soluciones en solventes, por tener éstos menor tendencia a extenderse sobre el papel. El mecanismo del aparato, podemos verlo en la figura 2.

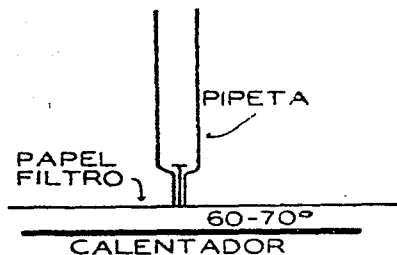


Figura 2

Se reporta otro dispositivo, con el cual se pueden aplicar sobre una zona angosta, hasta 5 ml. en un tiempo de 15 minutos, Figura 3.

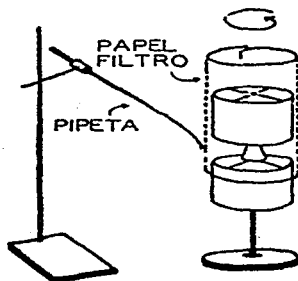


Figura 3

En los trabajos de Tomarelli y Florey (166), para la determinación de sulfuros radio-activos, consignan haber hecho las aplicaciones al papel, dentro de una área mínima de 1 cm. de diámetro, colocando fracciones de 10 en 10 microlitros, secando cada vez antes de agregar nuevas fracciones.

Nosotros ensayamos un método que nos permitía colocar muestras con suficiente concentración de amino-ácidos (0.05-0.10 mg./microlitro), para poder verificar buenos papirogramas dentro de zonas húmedas de 1-2 mm. de ancho, por cerca del ancho de la tira, o bien en una mancha de 2-4 mm. de diámetro, verificando cuando mucho de 2 a 4 aplicaciones sucesivas de alicuotas de 0.25-2.00 microlitros, secando cada vez a 75-80° C. antes de poner una nueva aplicación.

Para poder lograr nuestro objeto, se prepararon soluciones de muestra del 5-10% en fenol al 80%, las aplicaciones se efectuaban mediante una micropipeta, cuya forma de hacerse, calibrarse, etc., consignamos en el siguiente capítulo. El fenol al 80% se escogió entre otros solventes, entre los cuales estaba el agua.

El desarrollo papirográfico, siempre se efectuó después de haber eliminado por calentamiento, al fenol, de la zona donde se aplicó la muestra, y después de haber dejado equilibrar al papel, con la humedad ambiente.

La separación en mayor escala hasta ahora, realizada por el principio papirográfico, se debe a Mitchel y Haskins (117); la llevaron a cabo, empleando a manera de columna, una pila formada por 400-450 discos de papel filtro W No. 1. de 9 cm. de diámetro, colocando la muestra embebida en uno de los discos, colocado cerca del extremo superior de la pila; el procedimiento es esencialmente el mismo que el seguido para las tiras de papel; en esta forma, pueden separarse cantidades del orden de 250 mg. de muestra.

## C. PAPEL FILTRO

Se ha empleado el papel filtro en varias formas, como pulpa (22,173), pulverizado (84, 125, 131), o como acetato de celulosa (18).

En la gran mayoría de los trabajos, se emplea el Whatman No. 1, propuesto por los inventores del método, como resultado de la selección entre varios otros papeles (31).

Algunas veces se ha hecho uso de otros papeles filtro, por ejemplo el de la marca Schleicher y Schuell No. 507 (21), o el S. S. No. 604 (185), más densos que el W. No. 1, o bien menos densos para ascensiones más rápidas como el W. No. 4. (86).

También se ha empleado (para la separación de vitamina A) papel W. No 54, impregnado con alúmina hidratada (Oser, B. L. Anal. Chem., 22, 221 (1950)).

Aparte del empleo de papel en forma de tiras o cuadros, Rutter (148), reporta una técnica en que se emplearon discos de papel de 11 cm. de diámetro.

En nuestro trabajo, encontrándonos en un principio con la dificultad de conseguir papel W. 1, ensayamos varios de los números de la Eaton & Dikeman, comparando sus velocidades de absorción, con tiras cortadas de discos de papel W. 1, en la forma que se describe en la parte experimental.

Para encontrar un sustituto del W. 1, se ensayaron, los que aparentemente fueron semejantes en textura como el E.&D. 609, 607 y 613, encontrándose que este último fué el más apropiado; sin embargo, el poder absorbente más similar, se encontró en la muestra E. & D. 612, pero no se le empleó debido a su superficie es-

triada. En un reporte reciente, Karnovsky y Johnson (86), hablan del empleo del propio papel E. & D. 613, en sustitución del W. 1.

No obstante esta posibilidad, casi siempre utilizamos papel filtro W. 1, que más tarde se pudo conseguir.

También se hizo un intento de obtener tiras largas, cortadas en forma de espiral, de discos de 19 cm. de diámetro.

En el caso de papirogramas con tiras extralargas, se intentó añadirlas, de tal forma que la distorsión en la absorción del líquido fuera relativamente pequeña, al pasar por las uniones.

El papel, puede estar a menudo contaminado con sales de metales pesados, como el Cu; Consden y colaboradores (31), reportan que la adición al solvente, de algunas sustancias que reaccionen con los iones metálicos, en particular con el Cu (KCN, Cuprón), constituye un método para eliminar su interferencia; también reportan, que se puede eliminar su efecto, verificando un previo lavado papirográfico; y también se consigna (141), la presencia de nitrógeno contaminante del papel, que interfiere las determinaciones por microkjeldahl, en zonas cortadas de los papirogramas, y en particular la presencia de sustancias semejantes a péptidos, en algunos papeles filtro, que se les puede eliminar con un lavado prolongado con agua (187).

En este trabajo empleamos papel sin tratar.

#### D. SOLVENTE.

Hasta ahora no se han encontrado reglas fijas que orienten a escoger solventes apropiados para un desarrollo papirográfico.

Conden y colaboradores (31) ensayaron varios solventes antes de proponer el empleo del fenol, colidina, etc. Encontraron que los solventes más apropiados para la separación de amino-ácidos, son aquellos parcialmente miscibles en agua; notaron que en una serie homóloga de solventes, las correspondientes razones de velocidad de los amino-ácidos, aumentan progresivamente conforme a la mayor solubilidad en agua de los términos de la serie de solventes. Se hace notar, que se pueden emplear solventes miscibles en agua, siempre que el contenido de agua no sea muy alto; sin embargo, las bandas de los amino-ácidos, tienden a ensancharse más, que cuando se emplean solventes parcialmente miscibles; además se indica que el efecto de la temperatura es más notable, con los solventes miscibles en agua.

Se ha visto, por otra parte, que las soluciones de fenol, son más afectadas por los cambios de temperatura, en el punto de saturación con el agua (21, 44); por esto se propone el empleo de fenol al 80% en agua (31), donde los valores  $R_f$  para los diferentes amino-ácidos, son más constantes; también se ha podido apreciar que los amino-ácidos más sensibles a los cambios de temperatura durante el desarrollo papirográfico, son el ácido aspártico y el glutámico (21).

Algunos autores (44, 179), proponen la purificación del fenol, de trazas de metales pesados, para evitar la presencia de rayas de colores indeseables en los papirogramas.

Williams y Kirby, reportan haber evitado la presencia de rayas de color indeseables, efectuando las ascensiones con fenol purificado por destilación al vacío, en presencia de Zn en polvo, y en aparato todo de vidrio (179).

Se ha publicado otra forma de purificar el fenol, destilándolo en presencia de limaduras de aluminio (0.1%) y  $\text{NaHCO}_3$  (solución al 0.05%) destilando la solución acuosa primero a presión ordinaria, hasta eliminar la mezcla azeotrópica; después se continúa la destilación al vacío con trompa de agua (25 mm.). (44).

Bull y colaboradores, al escoger las mejores condiciones para el desarrollo con fenol, refieren haber tenido muy buenos resultados empleando fenol "reactivo Merck" sin mayor purificación.

Nosotros empleamos fenol "reactivo Mallinrodt".

Se reporta el empleo de una mezcla de ácido isobutírico e isovalérico, saturado con agua, en substitución al fenol (46).

Otro solvente muy utilizado, de propiedades de separación de amino-ácidos opuestas a las del fenol, es la colidina; generalmente se empleó la s-colidina (2, 4, 6-trimetil piridina) (30). Edman (46), propone el empleo de una mezcla de 1:1 piridina y alcohol amílico técnico como substituto de la colidina. La s-colidina, generalmente se usa como segundo solvente en los desarrollos en dos dimensiones. También se habla (143) del empleo de la mezcla 1:1 de gamma-colidina y 2,4-lutidina (2-4-dimetil piridina) en lugar de la s-colidina sola. Los valores  $R_f$  en la colidina, varían con la temperatura, hasta un 25% (41).

Aunque aparece posible el empleo de colidinas en mezcla, sobre todo en descensos capilares, nosotros fracasamos al intentar su aplicación por ascensión capilar, a pesar de haber efectuado las ascensiones a varias temperaturas; los valores  $R_f$ , en general fueron demasiado bajos; entonces se procedió a la destilación fraccionada de la mezcla de colidinas, y obtuvimos valores  $R_f$ , que coincidieron muy cercanamente con los reportados por Dent (40), con la primera fracción que se colectó; para los siguientes ensayos, se empleó s-colidina saturada con agua, las condiciones mejores para el desarrollo, se obtuvieron a temperaturas entre 10-15° C.; esto se puede confirmar con los datos reportados por Consden y colaboradores, sobre el efecto de la temperatura, en los valores  $R_f$  de algunos amino-ácidos, arrastrados por la colidina. (31 pág. 229).

Se pudo obtener esta temperatura, mediante la refrigeración

producida por un trozo de hielo de 10 Kg. colocado dentro de la gaveta a donde se guardaba el aparato; la temperatura se observó frecuentemente, encontrándose que permanecía durante el tiempo del desarrollo, entre 10-15° C. Para verificar ensayos a temperaturas más bajas (5° C), se introdujo el aparato dentro de un refrigerador eléctrico.

Se han reportado otros solventes que dan buenas separaciones de amino-ácidos: el alcohol etílico y agua, entre 65-85% (77% mejor). (128). También se ha indicado, que el alcohol furfurílico, y compuestos análogos, mezclados con agua, producen buenas separaciones de amino-ácidos (13).

Se han propuesto otras mezclas: alcohol butílico-ácido acético en proporción 4:1 (v/v) (71), y n-butanol-morfina; y n-butanol-dioxano; n-butanol-piridina (26), n-butanol-alcohol bencílico (31).

Nosotros experimentamos, además del fenol y la colidina, el alcohol bencílico, alcohol n-butílico y etanol. El alcohol etílico dió buenos resultados, muy especialmente con el etanol al 77% en agua; sin embargo, se adoptó finalmente una mezcla de alcohol bencílico saturado con agua, y alcohol etílico al 77% en proporción 3:1 (v/v); esto, además de producir una buena separación, nos permitió controlar con precisión, el frente de avance del solvente, con más facilidad que con el alcohol etílico, que presenta una volatilidad muy grande.

Se reportan valores Rf para los diferentes amino-ácidos: en fenol, alcohol bencílico, colidina, alcohol n-butílico; 1:1 (v/v) alcohol bencílico-n-butanol; alcohol bencílico y ácido isobutírico (79); fenol y colidina (40, 143); alcohol etílico al 77% (128). Fenol con diferentes aditivos (HCN, NH<sub>3</sub>, Cuprón CO<sub>2</sub> etc.) (31) colidina sola y con diferentes aditivos (Cuprón, NH<sub>3</sub>) (31). 1:1 n-butanol-alcohol-bencílico con HCN, ácido isobutírico, alcohol amílico terciario, o-m y p-cresol con cuprón, o cuprón y amonio (31).

Nosotros reportamos unos cuantos valores Rf de amino-ácidos en fenol al 80%, y de etanol 77%-alcohol bencílico (sat.) 3:1 (v/v).

Se ha observado que los valores Rf son independientes de la cantidad de amino-ácidos presentes (21).

Bull y colaboradores, observaron, que los valores Rf para los diferentes amino-ácidos, son independientes del pH (Obs. en fenol) entre pH 4 y 7.6, empleando fenol como solvente desarrollador.

## D. SEPARACION E IDENTIFICACION

Una vez seca la zona donde se aplicó la muestra, se procede a efectuar su fraccionamiento, mediante el procedimiento de partición en papel.

Algunos autores, efectúan un fraccionamiento previo de los amino-ácidos del hidrolizado, ya sea mediante sus solubilidades en determinados solventes (144), o bien según su poder de adsorción en resinas sintéticas, para poder aplicar al papel muestras menos complejas. (16).

Synge y Tiselius (158), reportan el desarrollo papirográfico de péptidos, separando primero en fracciones más simples, mediante la separación en columna de carbón.

El empleo de resinas sintéticas, parece ser uno de los complementos más efectivos de la separación papirográfica. Desgraciadamente no fué posible su empleo, debido a la dificultad de conseguir estas substancias.

Tiselius y colaboradores (164) describen un procedimiento para la división en grupos, de los amino-ácidos de un hidrolizado, separándolos por adsorción en resinas, en las fracciones siguientes:

- a. Aromáticos; Ej. fenilalanina y tirosina.
- b. Básicos, punto isoeléctrico »7
- c. Ácidos punto isoeléctrico «5
- d. Neutros, punto isoeléctrico cerca de 6.

En este último grupo, se incluyen los amino-ácidos que tienen un solo grupo  $-\text{COOH}$  y  $-\text{NH}_2$  exceptuando los aromáticos, pero incluyendo la prolina e hidroxiprolina.



En este reporte se describe la marcha separatoria, y las clases de adsorbentes que pueden emplearse, así como el tratamiento previo al que deben ser sometidos.

Block (16) describe un método mixto, de adsorción y partición en papel, para la separación y determinación cuantitativa, de amino-ácidos, dividiendo los hidrolizados de proteínas en tres grupos:

1. amino-ácidos dicarboxílicos.
2. amino-ácidos ácidos y básicos.
3. amino-ácidos neutros.

Alicuotas de las diferentes fracciones, se sometieron al análisis papirográfico; el método no se pudo aplicar para la leucina e isoleucina.

Se pueden emplear otros procedimientos de fraccionamiento previo de hidrolizados; entre ellos, podemos citar, a los ionoforéticos, al análisis frontal de Tiselius, y a otros métodos "Cromatográficos líquidos" también desarrollados por este investigador (107); así mismo se pudiera hacer uso, del procedimiento de separación por espuma que describe Hesse (76) o el sistema de fraccionamiento de McCollum y Rider (114) del que ya hemos hablado.

Para la localización de los amino-ácidos en el papel, el procedimiento más en uso es el de emplear la reacción de la ninhidrina, a la cual nos iremos refiriendo, según se presente el caso, y en especial detalle, al consignar en otra parte de este capítulo, sus propiedades, y especificidad, con relación a su reacción frente a los alfa-amino-ácidos.

También se les puede localizar sobre el papel, por su fluorescencia bajo la luz ultravioleta (124, 132, 133), el procedimiento, se considera como menos sensible que la reacción de la ninhidrina. Con la luz ultravioleta, la mínima cantidad visible es de 20 microgramos por pulgada cuadrada. El principal inconveniente del método fluoroscópico, radica en la presencia de impurezas, en el papel o en el solvente, que pueden producir fluorescencia indeseable; sin embargo, se habla de la forma de solucionar en parte estas dificultades (133).

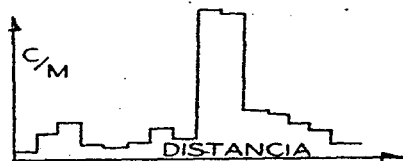
Albanese y Lein (3), proponen el desarrollo papirográfico de los amino-ácidos, en forma de sus sales de Cu, localizándolos sobre el papel, con una solución de ferrocianuro al 10%; este procedimiento, sirve casi exclusivamente para la determinación de la lisina;

los mismos autores, reportan tener en experimentación, el desarrollo con las sales de otros metales.

También, se ha considerado el desarrollo con complejos de Cu y fosfato (142).

Se pueden identificar algunos amino-ácidos, como la tiroxina (165), marcándolos con yodo radio-activo ( $I^{131}$ ), que después se reconoce en el papel, por su radio-actividad, mediante película sensible, o bien con ayuda de un contador Geiger.

Un procedimiento análogo, se puede seguir para la determinación de los amino-ácidos sulfurados, con azufre radioactivo ( $S^{35}$ ) (166) obteniéndose diagramas como el de la figura 4.



Radio-papirograma de la orina de una rata (166).  
Figura 4

Para la determinación de otros compuestos, se ha empleado en la misma forma, la aplicación de C radio-activo ( $C^{14}$ ) (51, 153).

Se ha propuesto el empleo de la reacción de la azida de sodio (26), o el yodoplatinato (180), para determinar el azufre en amino-ácidos sulfurados.

Otros autores reportan el empleo de reacciones específicas de amino-ácidos para determinar su posición en el papel; se propone el empleo del *o*-ftalaldehído, como reactivo específico de la glicina, produciéndose con este amino-ácido, una coloración verde o café bajo la luz de 3650 A; este mismo reactivo, produce una coloración gris oscuro con las sales de amonio; y, con la histidina y el triptofano, una fluorescencia amarilla intensa; otros amino-ácidos que se ensayaron, no fueron sensibles a este reactivo, en las condiciones que ya mencionamos. (Se reporta forma de preparar el reactivo) (128). También se han identificado por reacciones específicas, la valina, histidina, triptofano, arginina y metionina (1).

Cuantitativamente, se ha determinado los amino-ácidos por la medida de la máxima extensión, y contorno de la mancha producida por la ninhidrina (52) y por la medida de la intensidad de la luz transmitida al través de las manchas coloridas del papel, mediante un densitómetro fotoeléctrico (16) u otros dispositivos que trabajen en forma similar (21) (157), trazando después gráficas de transmisión luminosa contra la distancia recorrida en la tira de papel, por los diferentes amino-ácidos; se determina la concentración, relacionándola con la medida del área, arriba de la curva (21).

Nosotros empleamos un dispositivo, que adoptado a un fotocolorímetro Klett-Summerson, permitía la determinación de la intensidad de color de las manchas producidas con la reacción de la ninhidrina en una tira de papel. Probablemente, por falta de un filtro adecuado, las lecturas variaban al repetir la valoración de una misma tira, lo suficiente para impedirnos verificar una comparación cuantitativa entre las diferentes gráficas. En la parte experimental, reportamos los detalles y el tipo de gráfica que se podía obtener.

Otro procedimiento para determinar la concentración de amino-ácidos en las manchas, es el procedimiento de dilución de ellas, y comparación con papirogramas de concentración conocida. Este procedimiento, fué empleado primero por Dent (41), y después, reportado por Polson y colaboradores (141). Es aplicable, para determinar la concentración de los diferentes amino-ácidos, siempre y cuando se obtengan en bandas bien separadas.

En el caso de hidrolizados de proteína, donde hay una variedad relativamente grande de amino-ácidos, el análisis cuantitativo en tiras es prácticamente imposible, debido a la sobreposición de las manchas de varios de éstos ácidos. Sin embargo, es posible el cuanteo de algunos de ellos siempre y cuando se presenten aislados.

El método de desarrollo en dos dimensiones, presenta mayores ventajas para la determinación de la concentración, de cada uno de los amino-ácidos, localizados en las diferentes regiones del papirograma.

Landua y Awapara (92) reportan un procedimiento, para la determinación cuantitativa, de los amino-ácidos esparcidos en el papel. En resumen, el método consiste en: 1o., localizar la posición

de los amino-ácidos en el papel, con una solución de ninhidrina, al 0.05%, 2o., cortar las manchas, y eluirlas, desarrollando su máxima coloración, con un ml. de solución acuosa de ninhidrina al 2% en presencia de piridina, o en solución de metil-celosolve, saturado con agua, y en presencia de cloruro estannoso (118), calentando a baño de maría, y 3o., transportar la solución colorida, al espectrofotómetro, verificando las lecturas con luz de 570 micromicrones.

El empleo del análisis retenciométrico, se ha reportado ser de utilidad en las determinaciones cuantitativas, en papirogramas (177).

Se han ensayado otras formas de determinar la concentración de una banda determinada en el papirograma, como la determinación del N amino, coloriméricamente con sulfonato de beta-naftoquinona (7), o por microkjeldahl (141, 183), no habiendo dado buenos resultados este último método, por la presencia de materia nitrogenada, en el papel que se empleó (141). El empleo de diagramas de difracción electrónica, (28, 141), o de rayos X (28), aplicado a los extractos purificados, obtenidos de las diferentes zonas del papel, parece haber dado muy buenos resultados, especialmente tratándose de muestras muy pequeñas (135). Se sugiere la aplicación del método de difracción electrónica para emplearse en la determinación de los constituyentes de virus purificados (141).

Otros trabajos que se han reportado, en los que se trata de emplear la papirografía, como método cuantitativo (57, 64, 75, 87, 122, 161 y ver 28a).

Se puede determinar la concentración de un amino-ácido en una zona del papel, recortando el pedazo, y sembrándolo en un medio de cultivo apropiado, y observando su crecimiento (182, 188).

Cuando los compuestos se les separa en forma de sus sales metálicas, se les puede determinar indirectamente, cuanteadando el metal, en las cenizas (5).

Un método para facilitar la identificación de los componentes en un papirograma, que ha probado ser particularmente útil en el análisis de azúcares en gomas vegetales, es el que consiste en incorporar a la muestra una cantidad determinada de un cuerpo, cuyos valores R<sub>f</sub> se tengan bien controlados, y que se sepa no se encuentre originalmente en la muestra (54).

Müller y Clegg (119, 120), describen un método para la valorización automática de "Cromo-papirogramas", al tiempo en que se efectúa el desarrollo.

El recorrido del solvente en el papel, se limita por zonas preservadas con parafina, (ver trabajo de Yagoda 189) según se puede apreciar en la figura 5a.

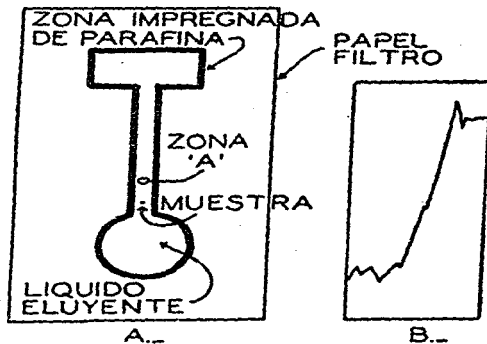


Figura 5

Proyectando un rayo de luz perpendicular al papel sobre la zona A (Fig. 5-a), y midiendo con ayuda de un dispositivo adecuado, la intensidad de luz transmitida en esa sección al través del papel, se puede controlar la partición, al tiempo del desarrollo.

El procedimiento fué experimentado en la separación de mezclas de dos colorantes, obteniéndose curvas, del tipo de la figura 5-b.

Nosotros intentamos la valoración completa, de tiras de papel W. 1 de 1.2 mm. de ancho, tratadas con ninhidrina en forma análoga a la descrita por Bull y colaboradores (21) (ver más adelante), para hacer la comparación de las gráficas fotofébricas obtenidas de los diferentes contenidos proteínicos que se estudiaron.

## F. REACCION DE LA NINHIDRINA

Por el nombre de ninhidrina, se conoce al hidrato de triceto hidrindeno, cuerpo cristalino, que pierde una molécula de agua, a 125-130° C., pasando por la tricetona correspondiente. Es moderadamente soluble en agua fría, y fácilmente en agua caliente. También es soluble en la mayoría de los solventes orgánicos (se puede encontrar datos sobre su síntesis, en la cita (160), y otras propiedades de este cuerpo, y compuestos relacionados en la (11).

Los alfa-amino-ácidos, al ser calentados con un exceso de ninhidrina en solución acuosa, producen: amoniaco, bióxido de carbono y un aldehído con un carbón menos, que el correspondiente amino-ácido. También se produce un color azul a púrpura (arriba de pH 2.5) (Tomado del folleto de la Midwest Extraction Co., Rockford, Ill.).

Los primeros en emplear la ninhidrina, fueron Harding y Mac Lean (72, 73), y Harding y Warneford (74).

El método (31) para localizar la posición de amino-ácidos en el papel, consistía en aplicar una solución de ninhidrina al 0.1% en butanol, desarrollándose el color al calentar el papel, durante 10 min. a 100° C.

Después se propone el empleo de una solución de este reactivo al 0.25% con objeto de lograr una mayor intensidad de color.

Bull y colaboradores (21), pusieron especial interés en encontrar las condiciones más propicias, en que la reacción de la ninhidrina sobre los alfa-amino-ácidos, produjera en el papel la máxima coloración; encontraron que rociando con una solución de ninhidrina en la proporción de 0.4 gr. de ninhidrina, 10 gr. de fe-

nol y 90 gr. de alcohol butílico, dejando orear el papel hasta que desapareciera el aspecto húmedo, secando después en la estufa a 90° C., 10 min., y finalizando con un baño de vapor de 5 min.; era el procedimiento que daba mejores resultados. Los mismos autores reportan, que la coloración producida en estas condiciones por la arginina, serina, valina, glutámico, leucina, treonina, alanina y lisina, siguen más o menos una misma ecuación, en cambio otros amino-ácidos (aspártico, fenilalanina, metionina y glicina) desarrollan menor coloración, siguiendo cada uno a su ecuación, dependiendo de la forma en que se lleve a cabo el desarrollo (21).

Se reporta que uno de los amino-ácidos menos sensibles a la ninhidrina, es la histidina (143).

Pratt y Auclair (143), estudian la sensibilidad de la reacción de la ninhidrina, empleándola en solución al 0.1% en n-butanol, y hacen notar, que si la temperatura está abajo de 70° cuando se coloca el papel, éste se amarillea, disminuyendo entonces la sensibilidad. Se estudió (143) la intensidad de la coloración en los amino-ácidos, sobre papel filtro, sin haber sido corridos con solvente; resultando que algunos eran más sensibles de lo que aparecían en los papirogramas, probándose con esto, que una cierta cantidad de amino-ácidos, es descompuesta por los solventes; el descenso en la sensibilidad, se hace más notable, con la histidina, arginina, fenilalanina e histamina.

Se reporta haber obtenido buenos resultados observando las manchas producidas con ninhidrina, mediante luz transmitida (143), y que la coloración disminuye a medida que se calientan los amino-ácidos, por arriba de 80° llegándose por la acción prolongada del calor, a hacerse inactivos frente a la ninhidrina (88). El mejor método para eliminar al solvente (fenol) del papel, se logra mediante una corriente de aire caliente a 85° durante 8-10 min.

Los colores producidos por la ninhidrina, sobre el papirograma, varían con los diferentes amino-ácidos (40, 143).

La cistina, debe oxidarse a ácido cistéico estable, y la metionina a metionina-sulfona, para poderse determinar en el papirograma (39, 98).

Se puede fijar el color producido por la ninhidrina con los diferentes amino-ácidos, mediante un fijador de cuadros, como el empleado por los pintores (28-a); en esta forma se pueden archivar los papirogramas, para posteriores comprobaciones.

## ESPECIFICIDAD DE LA REACCION DE LA NINHIDRINA

Prácticamente, es específica, dentro de las condiciones en que se trabaja en papirografía, para los alfa-amino-ácidos y péptidos. (41).

Las sales de ácidos orgánicos simples (acético, láctico) parecen no interferir (41).

Entre las sustancias que pueden dar la reacción de la ninhidrina, se cita a algunas sales de amonio, urea, y aminas orgánicas (27, 72, 73, 74), como la histamina (143).

Siempre que se presente una mancha en posición desusual, sobre el papel, debe sospecharse la presencia de sales de amonio o péptidos (41).

Se ha consignado otra forma de emplear la reacción de la ninhidrina, que consiste en incorporar a este reactivo (al 1%) en el solvente desarrollador (colidina). Después de la separación en el papel, se le seca, apareciendo con el calentamiento la coloración en los lugares donde se localicen los amino-ácidos (123).

Nosotros ensayamos la reacción de la ninhidrina, en la forma propuesta por Consden (31), para los ensayos donde no era de interés el obtener una máxima coloración, empleando en los demás casos, el procedimiento de Bull y colaboradores (21), efectuando el secado entre 80-90° C.

Se ha empleado como sustituto de la ninhidrina, el hidrato de naftindano-2-3-4, triona (111), que descompane a los amino-ácidos, al igual que la primera, pero no es posible su empleo en papirografía, porque el cuerpo reducido que se forma, (por lo que se reporta) parece que no reacciona con el  $\text{NH}_3$  desprendido, para formar un cuerpo colorido.

## FORMACION DEL CUERPO COLORIDO

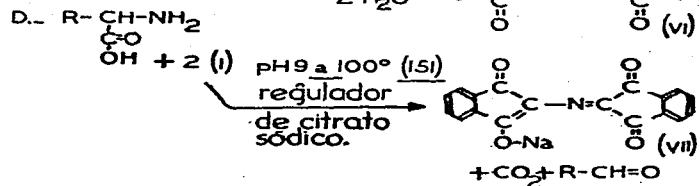
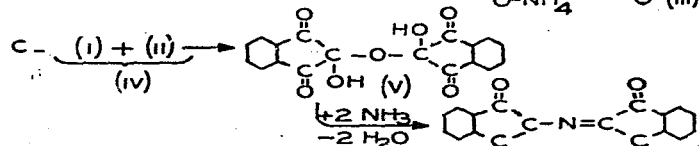
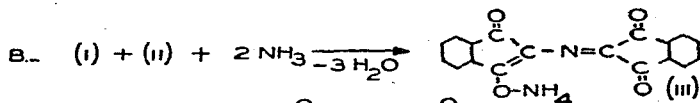
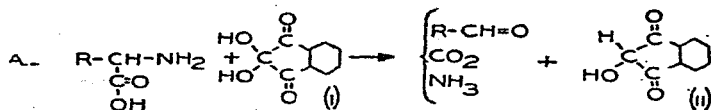
La formación del producto colorido (78), se verifica por un sistema de oxidación-reducción, representado por las ecuaciones A y B; reaccionando el amino-ácido con la ninhidrina (I) se produce el aldehído inferior correspondiente,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_3$ , y el cuerpo de re-



ducción de la ninhidrina, o sea el hidroxidiceto hidrindeno (II). Al reaccionar la ninhidrina con su producto de reducción (II) y dos moléculas de  $\text{NH}_3$ , se produce el cuerpo colorido, al que Hill y Kelley (78) representan con la fórmula que hemos marcado con el número III.

Polonovski y Lespagnol (137) suponen la formación intermedia de (I más II) la hidrantina (V), la cual al reaccionar con  $\text{NH}_3$ , da lugar a la sal colorida, que representan con la fórmula VI.

Stein y Moore (151, 118), reportan que el compuesto azul que se forma en esta reacción es el marcado con el número VII,



al cual aislan en forma de su sal sódica, comprobando su estructura por análisis elemental. A este producto se le obtiene, ya sea haciendo reaccionar el amino-ácido con la ninhidrina, o bien por

reacción entre la ninhidrina y su producto de reducción y amoniaco (Ruhemann).

En el laboratorio, se pudo comprobar, que el amoniaco da directamente la reacción al contacto con la ninhidrina.

Se reporta, el empleo de  $\text{SnCl}_2$ , con objeto de obtener un completo desarrollo del color; en este caso interfieren las sales de amonio, y aminas, por lo cual, solamente se debe emplear este sistema, en valoraciones, donde se sepa que sólo hay amino-ácidos como en la determinación de eluidos de zonas de papel cortadas de papirogramas (Landua y Awapara).

## APARATO

El aparato en que se efectúa la partición papirográfica, no es más que una cámara hermética, donde se mantiene una atmósfera equilibrada con el sistema solvente que se esté empleando; con ciertos dispositivos, que permitan la colocación del papel en tal forma que uno de sus bordes, que esté cercano al punto donde se colocó la muestra, quede introducido dentro de un baño que contiene el líquido que va a efectuar la separación, mientras que la parte restante del papel, se mantenga en posición tal, que el solvente que avanza, no tenga ningún entorpecimiento, en la regularidad de su absorción.

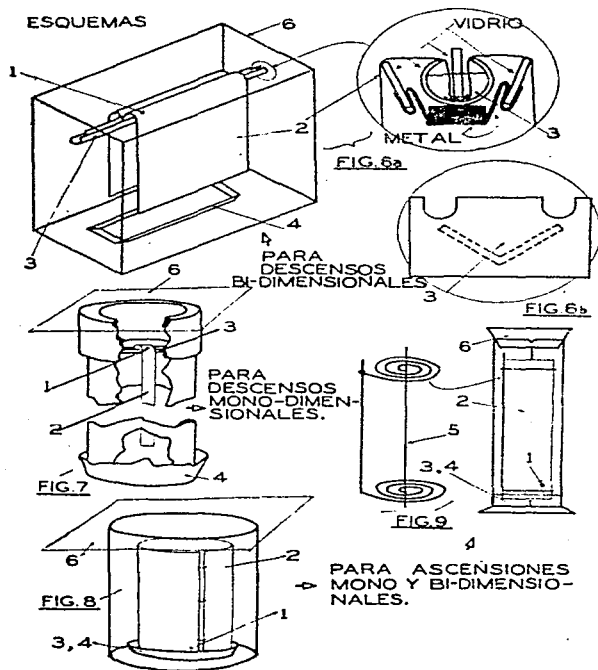
Para la confección de estas cámaras, deben de emplearse materiales, que no sean atacados por los solventes que se usen. El mejor material en primer lugar, es el vidrio, también se puede emplear acero inoxidable (185).

Algunos autores, reportan haberse fabricado cámaras de desarrollo con jarras de barro (179), o bien tubos de albañal (ver figura 7) (31). Utilizando uno de estos aparatos, siempre para un mismo solvente, y empleando material de vidrio en todas aquellas partes que estuvieren en contacto directo con el papel o el líquido.

Los aparatos que emplearon en un principio Consden y colaboradores (31), los hemos esquematizado en las figuras 6 y 7.

Entre las diversas modificaciones a estos aparatos, que se han reportado, citaremos algunas; por ejemplo, el recipiente de latón, pintado con barniz anticorrosivo, para cámaras de desarrollo bi-dimensionales, que consignan Steward y colaboradores (154) Fig.

5-b. (Una forma para hacer un baño de vidrio para el aparato de la fig. 8 se puede ver en el reporte de Longenecker) (100). Una de las modificaciones de más importancia, ha sido la de verificar los desarrollos por ascenso capilar, propuesta por Williams y Kirby (179). El empleo de esta técnica permite improvisar aparatos en forma más sencilla, además, presentan una más fácil manipulación, como se puede ver en la fig. 8, colocando al papel en forma de un cilindro, sobre un plato que contiene al "solvente", y verificando la ascensión dentro de un recipiente cerrado. Se ha reportado un apa-



rato para ascensión capilar, que consta solamente de un tubo de ensaye con un tapón de corcho (147), del cual hablaremos en el siguiente capítulo.

Nosotros empleamos un aparato para desarrollo de tiras por descenso capilar, algo similar al consignado por Winsten (181), también empleamos para el desarrollo en una dimensión, un aparato de ascensión capilar, al cual también se le usó para separaciones de dos dimensiones (Cap. siguiente).

Podemos ver en la figura 9, una interesante adaptación al procedimiento de William y Kirby, colocando pliegos de papel filtro, enrollados mediante una espiral de alambre de acero inoxidable, y empleando como cámara a una probeta de 1,000 ml. (55).

#### *Explicación de los esquemas:*

- 1.—Lugar donde se coloca la muestra.
- 2.—Papel filtro, colocado en una hoja extendida, o bien en forma de tiras de papel; o formando un cilindro, o enrollado.
- 3.—Baño donde se coloca al solvente que va a efectuar la separación.
- 4.—Depósito donde se coloca solvente con objeto de saturar la atmósfera de la cámara.
- 5.—Espiral de alambre inoxidable, para colocar al papel enrollado.
- 6.—Tapa.

**CAPITULO IV**

**PARTE EXPERIMENTAL**

## MUESTRA

Los hidrolizados empleados para los ensayos preliminares, fueron obtenidos por uno de los procedimientos usuales, seguidos cuando se trata de efectuar análisis por métodos ordinarios; efectuándose la hidrólisis del material seco, en proporción del 2% en solución de NaOH al 10%, neutralizando después con ácido sulfúrico o clorhídrico.

La proporción de material hidrolizado, a sal (producto de la neutralización), después de haber llegado al punto de neutralidad, estaba en relación aproximada de 1 a 9.

Si tenemos en cuenta que el porcentaje de proteína en la muestra, en la mayoría de los casos, estaba entre 20 y 60%, la proporción de ésta con respecto a la sal soluble, estaba en relación de 0.2-0.60 a 9.

Hidrolizado de:

- A. Levadura de cerveza (seca y pulverizada).
- B. Carne de pescado (parte comestible, seca y pulverizada).
- C. Grano de maíz (harina integral seca).

A 2 gr. de material (A, B, C.), se les hidrolizó, hirviendo a reflujo 1 hora con 100 ml. de NaOH al 10%, se filtró, decoloró si era necesario, y neutralizó con solución de ácido sulfúrico, llevando después a un volumen de 250 ml.

- D. Cabello humano, (desengrasado y seco).

A 1 gr. de material (D.), se le hidrolizó con 20 ml. de HCl 1:1, hirviendo a reflujo durante 4 horas, continuando después la hidrólisis a 120° C. durante 9 horas en baño de arena (45). Después se neutralizó (Na OH); filtró y diluyó a un volumen de 100 ml.

En las primeras tentativas para la preparación de una muestra papirográfica, se encontró en primer lugar con la necesidad de eliminar el exceso de sales solubles, enfrentándonos directamente a la resolución del problema, no se intentó en un principio que los hidrolizados tuvieran un contenido mínimo de sales solubles, sino que por el contrario, se trabajó con concentrados de hidrolizados que tenían un exceso muy grande de ellas.

El procedimiento que resultó ser de mayor utilidad para la purificación de los hidrolizados, fué el de extraer el contenido total de amino-ácidos, de la muestra seca, con una solución de ácido tricloroacético en acetona.

5 ó 10 ml. de hidrolizado se colocaron en una cápsula de porcelana de 7 cm. de diámetro, y se secaron en la estufa (80° C.). El producto seco, se trituró sobre la misma cápsula, con un agitador de vidrio, teniendo uno de sus extremos, terminando en forma de gota; el polvo, con ayuda de un pincel, se transfirió a un filtro de vidrio, de fondo poroso (F), adaptado a un matraz Kitasato, de tal manera que el pico del embudo, quedara introducido en un tubo de ensaye, colocado dentro del matraz (Fig. 1). Se agregó una porción de 2 ml. de solución 0.24N de ácido tricloro acético en acetona pura, se agitó el solvente sobre el filtro, durante unos minutos, par aconseguir la mayor disolución, y después se aplicó un ligero vacío, la operación se repitió varias veces, procurando que las porciones de la solución solvente, se vertieran primero en la cápsula de porcelana, y después en el filtro, para recoger los restos de hidrolizado que se habían quedado adheridos en las paredes de la primera.

Después de haber agregado la tercera porción y sucesivas, se ensayó, tomando cada vez una pequeña fracción del liquido que filtraba, sobre un papel filtro, y con solución de ninhidrina, si la extracción era completa.

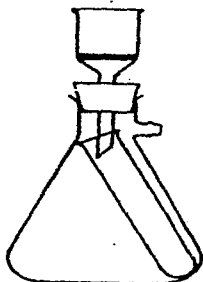


Figura 1

Este procedimiento, se desechó, entre otras cosas, y en primer lugar, por la cantidad excesiva de solvente, (con el consiguiente exceso de tricloro acético), que era necesario de emplear, para verificar una extracción total, y además, porque durante el proceso, la evaporación de la acetona era muy considerable, variando con esto la concentración de la solución solvente.

El procedimiento que finalmente se adoptó, consistía en secar, 5 ml. de hidrolizado en un tubo de ensaye de 2 x 5 cm., agregar una pequeña cantidad de arena lavada seca, y triturar dentro del mismo tubo, con un agitador con uno de sus extremos terminado en forma de gota; añadir después 1 ml. de solución 0.24 N de ácido tricloro acético en acetona, para facilitar la trituration; después agregar una porción de 2 ml. de solución solvente y agitar continuamente durante unos minutos, marcando el nivel del solvente en el tubo, en tal forma, que si había una pérdida de acetona por evaporación, se pudiera reponer la cantidad perdida, agregando unas gotas de este solvente, continuando después la agitación. Transfiriendo la casi totalidad del contenido del tubo a uno de centrifuga, se le centrifugó y, el líquido sobrenadante se pasó a un tubo limpio de 2 x 5 cm. Se repitió la operación, agregando otra porción de solución solvente al tubo, que todavía tenía el residuo del hidrolizado, pasándolo al tubo de centrifuga en el que estaba el sedimento de la primera extracción, agitándolo con la nueva fracción de líquido; se volvió a centrifugar y se reunió esta nueva por-



ción de sobrenadante, con la primera fracción. Volviendo a agregar una nueva cantidad (2 ml.) de solvente, se repitió por tercera vez la operación.

A las fracciones así extraídas, y colectadas en un tubo, se les sometió a la eliminación del "solvente".

La eliminación de la acetona, no implicó problema. Para quitar el exceso de ácido tricloroacético, se ensayaron varios procedimientos:

Primero se intentó su eliminación, evaporando a presión reducida, con ayuda de una corriente de aire seco caliente, este procedimiento fué eficaz, pero en vista de lo tardado, se le reemplazó por una simple evaporación en estufa a 70° C. que dió en la mayoría de los casos, resultados satisfactorios, sobre todo tratándose de la preparación de muestras en serie. El arrastre de ácido-tricloroacético por la acetona, contribuía a su eliminación; algunas veces se agregaron fracciones de este solvente, para ayudar la operación.

Si se coloca sobre papel filtro, una pequeña muestra de amino-ácidos extraídos, conteniendo cierta cantidad de ácido otriclora-acético, y después se le trata con solución de ninhidrina, se puede observar, que este ácido, ejerce una acción decolorante, sobre el color producido; no obstante, esto no implicó interferencia, porque el valor Rf del ácido tricloro-acético, en los solventes que se emplearon era muy cercano a cero; sin embargo, se procuró reducir al mínimo, el residuo de este ácido.

Con el extracto así obtenido, libre de sales solubles en primer lugar, y en segundo de los solventes con que se verificó la extracción, se prepararon, como se verá más adelante, las soluciones para aplicar las muestras en el papel.

El método de eliminación de la solución solvente, por evaporación, dió buenos resultados, al aplicarse en hidrolizados de pelo, levadura de cerveza, carne de pescado y huevos de ahuahutli, y fracasó al tratarse de emplear, en la purificación de hidrolizados de maíz, de lo cual hablaremos más adelante.

Es claro, que mientras mayor cantidad de sal se encuentre en el hidrolizado seco, se necesitará un volumen mayor de solución solvente, para poder operar; como ya se ha visto, es preferible trabajar, con una cantidad menor de ácido-tricloro-acético. Se ha comprobado (114) que un pequeño volumen de ácido en acetona, es

suficiente para extraer todos los amino-ácidos de una muestra. Así para dejar asentadas las mejores condiciones para efectuar el método, a los huevos de ahuahutli, y a la serie de pescados, que después sometimos a estudio, se les hidrolizó empleando solamente para 0.05 gr. de material seco (menos el ahuahutli que se le empleó tal como viene, y exento de cascarilla) 5 ml. de HCl al 10% (10 horas a 15 lbs. de presión) neutralizando después con solución de sosa. La extracción, se llevó a cabo con 5 ml. de ácido tricloroacético en acetona, empleando cada vez alicuotas de 1 ml. del solvente.

A todas las muestras de la serie, se les sometió a idéntico tratamiento.

Se ensayó también, el hidrolizar con  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  eliminando el exceso después de completada la hidrólisis, con ácido sulfúrico, en la forma que a continuación describimos:

A 0.5 gr. de muestra se le hidrolizó con 5 ml. de  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  al 14% (10 horas a 15 lbs. de presión); después, se filtró, y se transfirió el líquido a una bureta; en otra bureta, se colocó solución de ácido sulfúrico al 10%. Sobre un poco de agua en ebullición, se iba dejando gotear de las dos buretas; tomando pequeñas gotas, con un agitador, y aplicándolas a un papel de perhidrón, se controlaban las variaciones del pH hasta llegar al punto de neutralidad. El precipitado así obtenido, de cristales grandes, fué fácilmente filtrable; el líquido neutro, se concentró, y de ahí se prepararon muestras para ensayos papirográficos preliminares.

El papirograma de maíz, que presentamos más adelante, fué obtenido, con hidrolizado de harina integral de maíz, tratada en esta forma.

## PREPARACION Y APLICACION DE LA MUESTRA PAPIROGRAFICA

Para colocar una cantidad apropiada de muestra en una pequeña área del papel, se encontró que el sistema de suspenderla en agua destilada, como de ordinario se hace no nos daba buenos resultados, pues no se podía preparar una solución de muestra lo suficientemente concentrada, y además, porque el agua tiende a absorberse en zonas muy amplias; se ensayaron varios otros solven-

tes, habiendo obtenido el mejor resultado, suspendiendo las muestras puras, en fenol al 80%.

Preparándose en esta forma, soluciones tipo conteniendo entre 5-10% de amino-ácidos.

Las muestras preparadas en la forma descrita, se dispusieron en soluciones de concentración conocida, según se puede apreciar en la tabla I.

Para aplicar fracciones de 0.5 a 5 microlitros, se emplearon en un principio, pipetas capilares calibradas en la forma que a continuación se describe:

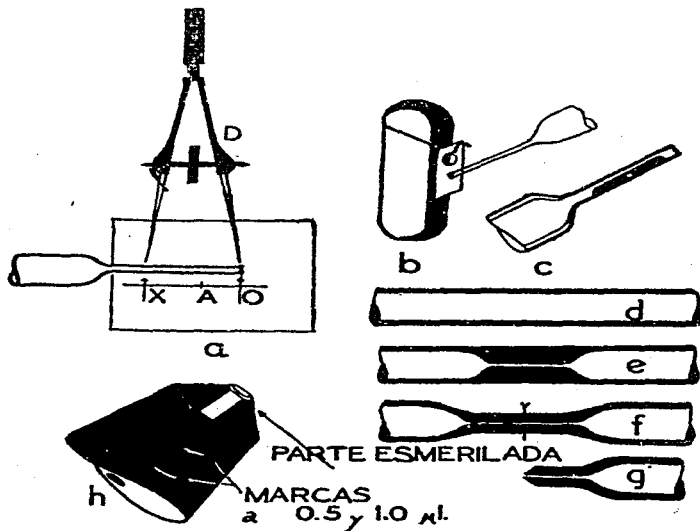


Figura 2

Las pipetas, hechas de un tubo de vidrio ordinario de 4-6 mm. de diámetro, terminando en tubo capilar, se calibraron, llenando la pipeta perfectamente desengrasada, con agua destilada, a una

distancia arbitraria X sobre el tubo capilar (ver figura 2a.), cuya medida desde la punta de la pipeta o sea OX se marca en un papel, sobre el cual se coloca la pipeta, o bien con un compás, de puntas D cuya abertura se puede graduar mediante un tornillo, que permite que sus puntas se abran o se cierren; esta porción de líquido así medida, se pesa, en la balanza de torsión, empleando un trozo de papel filtro, a manera de platillo tarado (Fig. 2-b); esta pesada nos sirve de orientación para calcular aproximadamente el volumen que es capaz de contener la punta capilar de la pipeta, por unidad de distancia marcada sobre OX. Suponiendo que el líquido contenido hasta la marca X pese 4.6 mg., entonces se aproxima el lugar donde debe quedar la marca A para contener, por ejemplo, 1 mg. de agua pura a 20° C., o bien la cantidad que se desea calibrar, la cual se marca también en el papel sobre el cual se coloca la pipeta. O bien mediante el mismo compás de puntas, el cual se gradúa a la distancia OA; esta nueva medida, se va corrigiendo (aumentando o disminuyendo) hasta que corresponda en dos o tres lecturas consecutivas, con la cantidad deseada. El punto así obtenido, se señala en el tubo capilar, con barniz de uñas (Fig. 2 c.).

Esta operación, se repite para cada marca que se ponga en la pipeta.

Las pesadas deben de hacerse siempre en la misma forma, procurando que la aplicación de las alicuotas, sea también la misma en que después se vayan a aplicar las muestras en el papirograma.

Aun cuando se comprobó que la volatilidad del agua durante el tiempo de pesada, no era de consideración, siempre se procuró, hacer las pesadas con rapidez.

Las pipetas capilares que acabamos de describir, tienen el inconveniente de su gran fragilidad y, además, al lavarlas y desengrasarlas, era fácil perder la marca puesta con barniz; por lo cual se optó por emplear una pipeta, cuya forma de hacerse, la describimos en la Fig. 2-e.f.g.h. y d. Esta pipeta se calibró, a 0.5 y 1 microlitros, pudiéndose aplicar, punteando con ella, aun fracciones menores.

La pipeta que empleamos fué calibrada con agua destilada a 20° C.; sin embargo, para efectuar una calibración correcta, cuando se empleen soluciones en fenol al 80%, deben calibrarse con este sol-

vente, para evitar errores por adherencia a las paredes. En nuestro trabajo, de carácter preliminar, más bien se necesitó aplicar volúmenes iguales de las diferentes muestras, o bien doble o triple, etc., por lo cual no se calibró la pipeta con la solución de fenol, sino solamente como ya hemos dicho, con agua destilada. Una calibración a medio tramo de la punta capilar, para efectuar medidas entremarcas, no fué práctica, debido a la rapidez con que se absorbía el líquido sobre el papel, por esto se prefirió calibrar hasta la punta.

Se prepararon también soluciones tipo de amino-ácidos puros, para las medidas de los valores Rf., conteniendo 10 mg./ml., ajustando el pH entre 6-7 con cantidades mínimas de sosa y clorhídrico, preparándoseles en agua destilada conteniendo una pequeña cantidad de fenol como preservativo.

Para preparar mezclas tipo, en condiciones análogas a las muestras con cantidad conocida de problema, se pesaba las cantidades deseadas de amino-ácidos, y se les suspendía en un volumen determinado de fenol al 80%.

Todas las soluciones preparadas con fenol al 80% se les guardaba en ampollitas de vidrio, cerradas a la llama, y se les conservaba dentro de un frasco de color ámbar.

## PAPEL

En general, se empleó papel filtro W. 1.; sin embargo, antes de haber conseguido este papel, como ya hemos hablado, se ensayaron varios otros, comprobando sus velocidades de absorción en agua, para lo cual se emplearon tiras de 2 x 10 cm. de cada una de las diferentes clases; las muestras de papel W. No. 1 se cortaron de discos de 11 cm., ya que entonces no se disponía de este papel en otra forma.

Las tiras, se colocaron una al lado de la otra, con uno de sus extremos sujeto a una regla, en tal forma que los extremos libres de todas ellas, pudiesen entrar simultáneamente al líquido, al colocar la regla sobre el recipiente que tenía como 1 cm. de agua, como se puede apreciar en la figura 3.

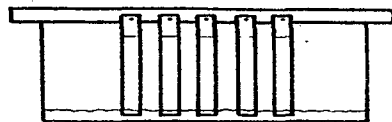


Figura 3

En esta forma se probaron varios números escogidos entre los de la serie de la Eaton Dikeman, el 607, 609, 612 y 613.

El más parecido en absorbilidad, al Whatman 1, fué el 613 de la E. & D.; sin embargo, el 612, de no estar estriado, probablemente hubiera sido mejor substituto.

### SOLVENTE

Se ensayaron varios solventes, para escoger entre ellos a uno que se adaptara especialmente al método comparativo en tiras; buenos resultados se obtuvieron, con alcohol etílico al 77%; sin embargo, su demasiada volatilidad, dificultaba la determinación precisa del límite de avance del líquido, a pesar de haber puesto especial atención en mantener una completa saturación de la cámara, mientras se verificaba la separación.

Se encontró que pudiera ser más conveniente el empleo de una mezcla de alcohol etílico, y bencílico en la proporción que aparece en la tabla II, para alcohol etílico al 77% en agua, y alcohol bencílico, saturado con agua. Cualquier coloración indeseable (junto a la banda de máximo avance) producida por la presencia de bencílico, se elimina agregando unos cristales de KCN al baño.

TABLA I

Material	Muestra seca en gr.	Concentración del hidro- lizante ml.	Tiempo y con- diciones de hi- drólisis.	Neutralizado con Soln. de	Volumen afo- rado. ml.
1. Levadura de cerveza (*)	2	100 ml. NaOH, 10%	1 hora hervido a reflujo.	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	250
2. Carne de pescado (*)	"	"	"	"	"
3. Maíz, 1a. Muestra (*)	"	"	"	"	"
4. Maíz, 2a. Muestra (*)	0.5	5 ml. Ba (OH) <sub>2</sub> , 10-14%	10 horas 15 lbs. de pres.	"	100
5. Pelo humano (de los di- ferentes colores)	1	20 ml. HCl, 1:1.	4 horas a reflu- jo, y 9 horas a baño de arena 120° C.	NaOH	"
6. Pescados (robalo, mojarra, etc.).	0.05	5 ml. HCl, 10%	10 horas 15 lbs. de pres.	"	"
7. Huevo de ahuahutli.	"	"	"	"	"

(\*) Primeros ensayos.

TABLA I

Material	Muestra seca en gr.	Concentración del hidrolizante ml.	Tiempo y condiciones de hidrólisis.	Neutralizado con Soln. de	Volumen aforado. ml.
1. Levadura de cerveza (*)	2	100 ml. NaOH, 10%	1 hora hervido a reflujo.	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	250
2. Carne de pescado (*)	..	..	..	..	..
3. Maíz, 1a. Muestra (*)	..	..	..	..	..
4. Maíz, 2a. Muestra (*)	0.5	5 ml. Ba (OH) <sub>2</sub> , 10-14%	10 horas 15 lbs. de pres.	..	100
5. Pelo humano (de los diferentes colores)	1	20 ml. HCl, 1:1.	4 horas a reflujo, y 9 horas a baño de arena 120° C.	NaOH	..
6. Pescados (robalo, mojarra, etc.).	0.05	5 ml. HCl, 10%	10 horas 15 lbs. de pres.	..	..
7. Huevo de ahuahutli.	..	..	..	..	..

(\*) Primeros ensayos.



m a t e r i a l	Volumen de muestra de hidrolizado que se secó a '80° C.' en ml.	Volumen de fenol al 80% en ml. para suspender al purificado. (am-ács.).	Cantidad de muestra aplicada sobre el papirograma, en microlitros
1.	10	De 0.05 a 0.20	s d h
2.	"	"	e c a
3.	"	"	s s
4.	5	0.1	a d t
5.	"	0.2	p e a
6.	"	0.1	l i 2 ó 4
7.	"	"	c n
			a f
			r e
			o r
			n i
			o
			m e
			u s
			e
			s a
			t
			r
			a
			s 0.5

TABLA II

Valores Rf. que reportamos:

	A Et.OH al 77% T.A.	A n-But. OH sat. H <sub>2</sub> O. T.A.	A Fenol al 80% en H <sub>2</sub> O T.A.	A Colid. Mezcla sat. 10-15° C.	A Colid. Idem. a 5° C.	A Colid. Frac. Dest. a 157-8° 10-15° C.	D Et. OH 77% y Benc. OH sat. prop. 3:1 (v/v) T.A.
Arginina	0.18	0.01	0.54	0.03	0.02	0.14	0.09
Histidina	0.28	0.02	0.61	0.06	0.06	0.26	0.09
Lisina	0.20	0.00	0.46	0.02	0.02	0.11	0.09
Triptofano	0.39	0.21	0.75	0.32	0.31	— (°)	0.27
Fenilal-alanina	0.54	0.27	0.84	0.31	0.31	—	0.44
Metionina	0.54	0.21	0.78	0.26	0.27	—	0.39
Treonina	0.44	0.04	0.45	0.09	0.09	—	0.29
Leucina	0.62	0.33	0.83	0.28	0.23	—	0.50
Isoleucina	0.61	0.29	0.85	0.24	0.24	—	0.52
Valina	0.57	0.15	0.77	0.15	0.15	—	0.41
Alanina	0.44	0.03	0.64	0.04	0.04	—	0.19

Los valores Rf. para s-colidina y fenol saturado con  $\text{NH}_2$ , coincidían con los reportados por Dent, o Williams y Kirby.

Los valores de ascensión ( $^\circ$ ) de esa fracción, se probaron sólo con algunos de los amino-ácidos de valor Rf menor.

A = ascendente

D = descendente

T.A. Temp. ambiente.

El fenol se empleó sin purificación especial, obteniéndose buenos resultados, con fenol al 80%; sin embargo, se prefirió el empleo de etílico-bencílico de que ya hablamos en el párrafo anterior, porque la separación entre los amino-ácidos "indispensables" (17), era más notable, en esta mezcla.

La formación de una tenue coloración amarilla en todo el papel, cuando se emplea al fenol, fué otro de los motivos por el cual se empleara más el alcohol etílico en mezcla con bencílico.

Los otros solventes ensayados, no dieron el resultado apropiado.

Se estudiaron los valores Rf en mezclas de colidinas, (valores Rf de amino-ácidos) habiéndose efectuado una previa destilación de ésta, para obtener un producto más claro. Se probó por el método ascendente con avance de 25 cm. del líquido sobre el papel, y a diferentes temperaturas, los valores Rf. de algunos amino-ácidos que se ensayaron, resultaron demasiado bajos (ver tabla II).

Después se fraccionaron las colidinas, recogiendo las fracciones que destilaban a diferentes temperaturas; la primera fracción recogida, dió resultados similares a los valores reportados por Dent.

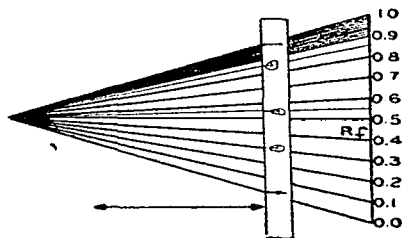
Se efectuaron ascensiones con s-colidina, conservando la temperatura entre 10 y 15 $^\circ$  C., obteniéndose valores que coincidían con los reportados por otros autores. Esta temperatura, se logró, como ya hemos dicho, metiendo al aparato dentro de una gaveta, con trozos de hielo (10 Kg. a un volumen de gaveta de aproximadamente 0.4 m $^3$ .). Algunos desarrollos experimentales en dos dimensiones se efectuaron con fenol saturado conteniendo 3% de amoníaco, en el agua con que se saturó, y s-colidina saturada con agua destilada.

Se pudo comprobar, que la tendencia del fenol, a producir coloraciones extrañas en presencia de ciertos metales, es mucho me-

nor. trabajando con soluciones al 80%; se emplearon, cilindros de papel filtro, detenidos con grapas de alambre niquelado, y a pesar de que el fenol al 80%, pasaba por el lugar donde estaban las grapas, no se originó ninguna coloración en esas regiones; cuando se operó en las mismas condiciones, con soluciones de fenol en la forma reportada por Consden (31), aparecía en todo el borde donde estaban las grapas, una coloración, café rojiza intensa, por lo cual se tuvo que emplear, fibras de ixtle, para sujetar el papel.

Los valores  $R_f$ , como se ha visto, son el cociente de dividir, la distancia de avance del soluto que se separa (al centro de gravedad de la mancha) entre la distancia a la que avanzó el solvente, midiéndose las distancias desde el punto donde se colocó la muestra.

Nosotros logramos un método práctico, para determinar los valores  $R_f$  en una tira de papel, con ayuda de un diagrama de estos valores (Fig. 4), sobre el cual se colocaban los papirogramas determinándose directamente la posición de las manchas ( $R_f$ ) en el papirograma, sin necesidad de medir, y hacer el cálculo.



## CAMARAS DE DESARROLLO

El aparato para efectuar desarrollos monodimensionales por descanso capilar, como finalmente se usó, aparece en la figura 5. Exceptuando al soporte del baño, todas las partes del aparato eran de vidrio. El ajuste de la tapa (cristalizador invertido) con el resto de la cámara estaba esmerilado, lográndose con un poco de grasa para buretas un cierre hermético.

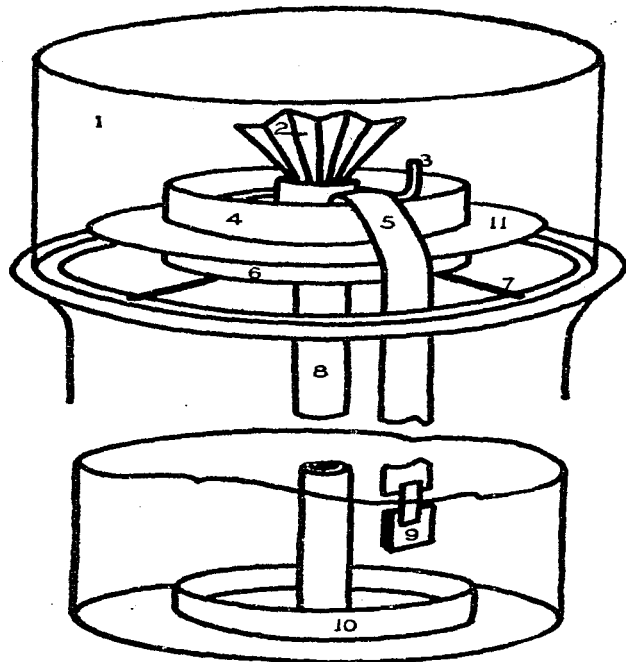


FIGURA 5

APARATO PARA DESARROLLOS MONODIMENSIONALES  
DESCENDENTES

- 1.—Cristalizador de vidrio que sirve de tapa.
- 2.—Papel filtro en forma de abanico colocado dentro de un recipiente que contiene solvente para saturar la atmósfera dentro de la cámara.
- 3.—Arillo hecho de varilla de vidrio que sirve para sostener a las tiras de papel.
- 4.—Tapa de una caja petri, que hace las veces de baño, para contener al solvente que va a efectuar la separación.
- 5.—Lugar donde se coloca la muestra en la tira de papel.
- 6.—Contra.tapa de la caja petri.

- 7.—Alambre que sostiene al baño.
- 8.—Tubo hecho de papel filtro, que llega hasta otro recipiente con solvente, que está colocado en el fondo del aparato, y que sirve para saturar la atmósfera de la cámara.
- 9.—Contrapeso de vidrio, pegado al papel con un trozo de tela de esparatrapo.
- 10.—Depósito con solvente.
- 11.—Vidrio de reloj que impide que las tiras de papel se peguen a las paredes del baño.

El baño se carga del líquido desarrollador, levantando un poco la tapa, e introduciendo por el hueco, una pipeta, cerrando inmediatamente después de añadir el solvente, iniciándose entonces el descenso capilar, por las tiras de papel filtro. Aunque en el esquema, con motivo de hacerlo menos confuso, aparece una sola tira de papel, el aparato podía contener entre 10 y 16 tiras, colocadas una a continuación de otra, alrededor del baño.

Siempre se guardaba el aparato, durante el tiempo de la absorción capilar, en una gaveta cerrada, o en un ropero, para controlar en lo más posible la variación de temperaturas del laboratorio, que a veces oscilaba entre 12 y 21° C.

También se intentó el desarrollo de papirogramas en tiras de papel filtro, de 1 a 2 m. de largo, lográndose esto, empatando tiras de 55 cm. de largo. Tanto la forma de empatar las tiras para lograr una mínima distorsión, como el aparato que se empleó, se pueden ver en la fig. 6. La dificultad de mantener una saturación constante, en todo lo largo de la cámara, así como la deficiencia en el control de la variación de temperatura, nos obligó a abandonar este ensaye, dedicándonos entonces al desarrollo de papirogramas en tiras de 55 cm. de largo en el aparato de la figura 5.

Se estudiaron las mejores condiciones para verificar una ascensión papirográfica, en la forma propuesta por Williams y Kirby, con objeto de ver si era posible, hacer varios desarrollos mono-dimensionales, cortando de ahí tiras para la valoración fotométrica de cada muestra desarrollada.

Para lo cual se puso especial atención en lograr un frente uniforme de avance del líquido ascendente, con objeto de que los solutos separados, quedaran en línea perpendicular al borde del papel en contacto con el solvente. además, se estudió el medio de conseguir un equilibrio entre la atmósfera de la cámara y el papel, antes de iniciar el desarrollo.

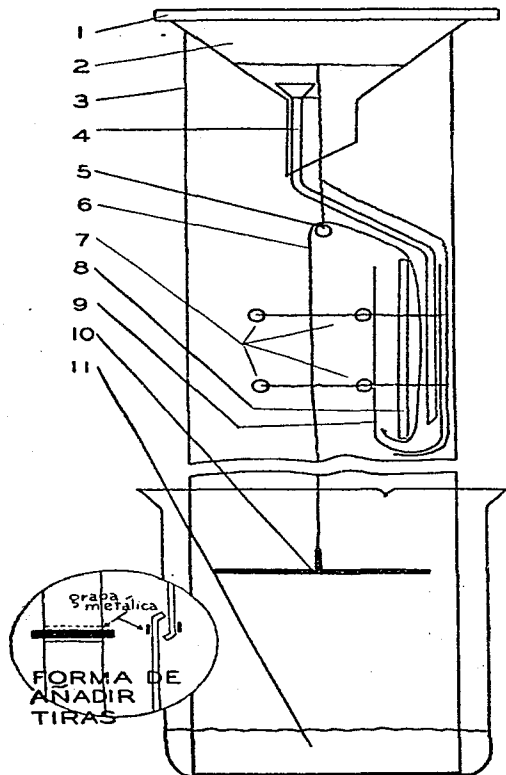


FIGURA 6

- 1.—Tapa de vidrio plano con ajuste al esmeril.
- 2.—Embudo mayor (6 cm. d.) del ajustado al borde del tubo.
- 3.—Tubo cortado de lámparas fluorescentes, añadido con esparatrapo a otro tramo hasta acompletar la distancia deseada ( $1\frac{1}{2}$  a 2 m.).
- 4.—Embudo menor, con conducto de vidrio para alimentar al tubo de ensaye que sirve de baño.

- 5.—Columpio hecho de tubo de vidrio, sostenido por un alambre, que sirve para sostener a la tira de papel.
- 6.—Tira de papel (papirograma).
- 7.—Partes de tubo de vidrio sostenidas con alambre, para impedir que el papel tocara las paredes de la cámara.
- 8.—Placa de vidrio introducida dentro del baño para sostener el papel.
- 9.—Tubo de ensaye (1.5 x 8 cm.), que hace las veces de baño.
- 10.—Contrapeso de alambre para mantener la tira al centro de la cámara.
- 11.—Recipiente de vidrio lleno de solvente.

Entre los medios ensayados para lograr un frente uniforme de avance del solvente en el papel, se probó el colocar el cilindro de papel filtro, sobre un disco del mismo material, metido dentro del baño. También se ensayó colocar en lugar del disco de papel, un disco de vidrio estriado. Estos aditamentos dieron buen resultado, cuando se introducía el cilindro de papel a la cámara saturada, donde ya estaba el baño desarrollador cargado de solvente, no así, como veremos más adelante, cuando había que cargar el baño, sobre el cual ya había sido colocado el papel filtro, con objeto de lograr un equilibrio, previo al desarrollo.

El hacer un doblez, en el borde de papel que estaba en contacto con el baño, distorsionaba el frente de avance considerablemente.

El recipiente que se emplaba como baño, se procuró que tuviera el fondo, completamente plano, nivelándosele, antes de cada desarrollo con un nivel de burbuja.

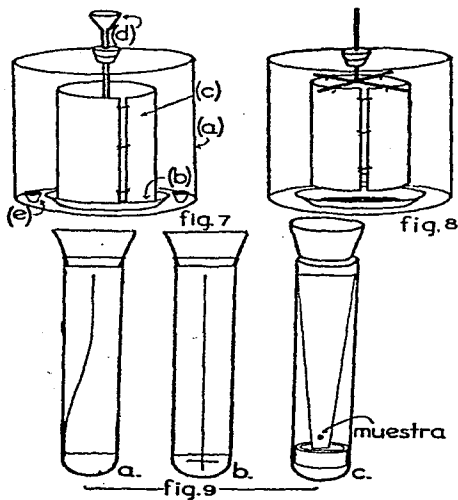
El primer tipo de aparato de ascensión capilar que se utilizó, aparece en la figura 7; dentro de un tubo de vidrio (a), con tapa y base hechas del mismo material (vidrio de ventana), que cierran la cámara mediante ajuste esmerilado, se colocaba un baño (b) sobre el cual se ponía el papel filtro en forma de cilindro. (c).

El solvente se introducía en este aparato, por un embudo cuya cola terminaba en forma de pipeta (d) y que llegaba cerca del baño (fig. 7). Unos recipientes (e), cargados de solvente, proporcionaban el medio de saturación de la atmósfera de la cámara, en equilibrio con el papel, antes de cargar el baño. La introducción del solvente por el embudo, hacía que el líquido no llegara simultáneamente a todo el borde del papel, distorsionándose el frente de avance. El aparato que finalmente se adaptó, para ascensiones capilares, fué el que describimos en la fig. 8.

En una cruceta de aluminio sostenida por una varilla del mismo material, (ambos cubiertos de un baño de parafina) se sujeta el



cilindro de papel, de tal manera que al jalar la varilla, al través del corcho, quede el papel, sin tocar al solvente colocado en el baño; una vez establecido el equilibrio dentro de la cámara hermética, se introduce la varilla, haciendo llegar el papel al solvente, iniciándose entonces la ascensión; en esta forma se lograba, además, un equilibrio entre el papel y la atmósfera antes de iniciarse el desarrollo, un mejor frente de avance del líquido, ya que se podía introducir a un tiempo, todo el borde del papel, dentro del solvente.



No obstante todos los ensayos que se hicieron con el método ascensional, se prefirió, desarrollar en aparato descendente, porque en el ascendente, verificado en hojas de papel, con frecuencia la hilera de manchas del cromopapirograma aparecía desviada de la línea perpendicular a la base, la cual debiera seguir normalmente, mientras que en el descendente en tiras, las manchas aparecían a lo largo de ellas, siempre en líneas paralelas al borde; este

inconveniente, aunque no de gran importancia para la verificación de papirogramas ordinarios, si era un entorpecimiento para preparar tiras para su valoración fotométrica.

La ventaja o desventaja de una innovación, se comprobaba cada vez, desarrollando un papirograma.

También ensayamos un método de saturación de la atmósfera de las cámaras de desarrollo que consistía en introducir una corriente de aire previamente burbujando al través del solvente.

Para tentativas de búsqueda de las mejores proporciones en una mezcla, o para otros ensayos, que implicaran, el efectuar series de papirogramas, variando en todas formas las condiciones en que se llevara a cabo el desarrollo, se hacia necesario el empleo de aparatos más manuales, y de menor consumo de substancias. Para lo cual, se ensayó el método en tubos de ensaye propuesto por Rockland y Dunn; siguiendo las indicaciones expuestas en el reporte de estos autores nos encontramos con la dificultad de que al introducir la tira de papel (13.5 x 1.80 x 1.00 cm.), en el tubo y ponerla en contacto con el solvente que se encontraba en el fondo del tubo, la fuerza capilar hacía que el papel se pegara a las paredes (fig. 9a.); esta dificultad de solucionaba empleando una aguja delgada de vidrio (Fig. 9-b) de 1 cm. de longitud, atravesada perpendicularmente al papel, cerca de la zona más angosta (donde se aplica la muestra), no obstante, resultó ser más práctico el empleo de anillos de vidrio cortados de un tubo de diámetro ligeramente menor al del tubo-cámara, que se colocaban en el fondo de éstos, como se puede apreciar en la figura 9-c.

## METODO

Este trabajo se basó en su mayor parte, en desarrollos monodimensionales, a los cuales nos referiremos en seguida.

Generalmente empleamos tiras de papel Whatman No. 1 de 1.2 x 55 cm., para pruebas exploratorias se emplearon tiras de varios anchos, desde 1 cm. hasta 3 cm.

La colocación de la muestra, se efectuaba mediante la pipeta que hemos descrito, colocando alicuotas de 0.5 microlitros, y si era necesario, se aplicaba o bien de un microlitro, o se hacían varias aplicaciones de 0.05, secando antes de poner una nueva cantidad.

Las muestras se incorporaban al papel, en una zona húmeda de 2 a 4 mm. de diámetro, al centro de la tira, y a una distancia de 6 cm. del borde, o también se aplicaba, con ayuda de una regla, y trazando con la pipeta, una franja de muestra de 1 cm. por 1 a 2 mm. de diámetro.

Ambos sistemas resultaron convenientes. (Las muestras de caballo se aplicaron en la primera forma, y las de pescados en la segunda).

Siempre que se hacían varias aplicaciones en el mismo lugar, se eliminaba cada vez al solvente, antes de agregar una nueva porción.

Para determinar valores Rf, se colocaban en la misma forma, muestras entre 2-10 microgramos de cada amino-ácido, empleando para ello, soluciones en agua conteniendo algo de fenol, como se ha descrito más atrás. Después de eliminar al solvente, y de haber colocado la muestra, a 80° C., se dejaba después el papel al aire libre por algún tiempo, con objeto de equilibrar su humedad con la ambiente.

La aplicación de muestras en las tiras de  $13\frac{1}{2} \times 1.8 \times 1$  cm., se lograba, punteando con la misma pipeta, colocándose porciones aproximadamente entre 0.1 ó 0.05 microlitros, dentro de una zona de cerca de 1 mm. de diámetro; el lugar donde se colocaba la muestra se puede ver en la figura 9-c. (a 7 mm. de la punta).

En los desarrollos de dos dimensiones, se aplicaban muestras hasta de 4 microlitros (generalmente 2 microlitros).

Después de aplicar la mezcla de solutos, en la forma que acabamos de ver, se introducían las tiras en el aparato, que hemos descrito (Fig. 5), teniendo la precaución de que no se tocaran unas con otras; una vez cargados de solvente, los recipientes colocados expresamente para la saturación de la cámara, se dejaba al aparato totalmente cerrado, durante un tiempo razonable ( $\frac{1}{2}$  a 1 hora), con el objeto de equilibrar la atmósfera, levantando la tapa, se vertía el solvente en el baño, con objeto de iniciar el desarrollo, lo más rápidamente posible, para evitar alteraciones muy notables en el equilibrio de la atmósfera dentro del aparato.

Colocado el equipo en un lugar al abrigo de cambios bruscos de temperatura, se dejaba el tiempo necesario hasta que el borde de avance del solvente, llegara a unos 2 cm. del extremo de la tira;

sacándola entonces de la cámara y marcando con una raya de lápiz el límite de avance del solvente, se le colocaba en posición horizontal, hasta que se hubiera eliminado la mayor parte del líquido, completando la operación con un secado en la estufa, entre 80-90° C. durante 5-10 min.

Se ensayó el secado a diferentes temperaturas (60° a 110°), y en diferentes tiempos, encontrándose más conveniente la forma que describimos primero.

Sobre la tira seca y en frío, se rociaba uniformemente (con ayuda de un atomizador), la solución de ninhidrina al 0.1% en n-butanol, para ensayos preliminares, o bien la solución; 0.2 gr. de ninhidrina, 5 gr. de fenol y 45 gr. de n-butanol, para pruebas de valoración fotométrica. Dejando secar el papel en posición horizontal, hasta que desapareciera el aspecto húmedo, luego se le calentaba a la estufa, a 90° 10 min.; si se intentaba obtener máxima coloración, se le sometía a un vaporizado durante 5 min. (Bull y colab.). Esto se lograba en forma un tanto rudimentaria, colgando las tiras sobre una cápsula donde hervía agua. Algunas veces se dejaban las tiras en el refrigerador, hasta el día siguiente en que se hacían las lecturas fotométricas. Desde los primeros ensayos con la reacción de la ninhidrina, se notaba, que después de tener las tiras guardadas por algún tiempo, las manchas aumentaban de intensidad de color; de ahí se deduce el vaporizado aconsejado por Bull, para violentar el completo desarrollo del color.

Para los ensayos comparativos de series de diferentes muestras, con variedad en su contenido de proteínas, se hacía un ensayo, para determinar la cantidad de muestra que era conveniente aplicar, o bien empleando alícuotas de diferentes concentraciones, aplicadas al papel, (sobre el cual se hacía directamente la prueba de la ninhidrina) o más convenientemente, desarrollando una serie de papirogramas con cantidades progresivas de muestra.

Cada uno de los diferentes individuos de la serie que se iba a comparar, se le sometía, desde la extracción, hasta el tratamiento con ninhidrina, a condiciones idénticas, obteniéndose series de papirogramas como las que se pueden observar en las fotografías que se adjuntan.

Para los desarrollos en dos dimensiones, se puso la muestra (1 a 2 microlitros), cerca de una de las esquinas (2 cm. del borde) del

cuadro de papel filtro, que luego se enrollaba en forma de cilindro, colocando unas "grapas" de ixtle, de tal manera, que los bordes que se aproximaban, para completar el cilindro, no se tocaran. El papel, conteniendo la muestra seca, se coloca en el aparato que ya describimos, atado a la cruceta de alambre cubierta de parafina, con la varilla levantada, con objeto de que el borde inferior del cilindro no tocara al líquido que había en el baño; después de un tiempo, en que se había establecido el equilibrio entre la atmósfera de la cámara y el papel, se bajaba la varilla hasta que éste, se pusiera en contacto con el solvente, iniciándose entonces la ascensión; cuando el líquido había llegado cerca del borde superior, se suspendía el desarrollo, se saca el papel, secándolo primero al aire, y luego en estufa, como se hiciera con las tiras.

Se vuelve a formar un cilindro con el papel, de tal forma que el otro borde contiguo al lugar donde se aplicó la muestra, sea ahora el que se va a introducir en el segundo solvente, que caminará en dirección perpendicular a la seguida por el primero. Aquí se tenía la precaución de limpiar perfectamente el aparato, del primer solvente, antes de emplearlo para el segundo. El desarrollo se efectúa en condiciones similares, secando, finalmente, al papel, y sometiéndolo al tratamiento con ninhidrina. El papirograma de cabello humano de color rojo, que presentamos, aun cuando no nos muestra una buena diferenciación de manchas, debido a un exceso de muestra para el tamaño del papel (25 x 25 cm.), sirve para ilustrarnos este proceso. Se le obtuvo en esta forma, para poder observar las dos manchas que aparecen en el centro, que parecen no corresponder a ninguno de los amino-ácidos hasta ahora determinados, pudiendo esto sugerir la presencia de otros aún no reportados; sin embargo, este dato no es posible de confirmar en un ensaye preliminar, como fué éste; además, hay la posibilidad de que estas manchas en posición desusual, sean debidas a péptidos, que no pudieron desintegrarse durante la hidrólisis.

## VALORACION DE LOS PAPIROGRAMAS MONODIMENSIONALES

Los cromo-papirogramas mono-dimensionales obtenidos en la forma que hemos descrito, se les sometió a varias pruebas para tra-

tar de encontrar un procedimiento para su valoración, que pudiera llevarse a cabo con el material de que se disponía en el laboratorio, para lo cual se procuró la forma de adaptar un colorímetro Klett-Summerson, para emplearlo como instrumento de medición del color en las manchas de las tiras.

Siempre se procuró de no hacer ninguna modificación que implicara algún deterioro para la estructura o el funcionamiento del aparato: sino que únicamente se ideó un dispositivo que, adaptado en la forma en que se coloca uno de los filtros ordinarios del aparato, sirviera como aditamento para la valoración de las tiras. El reducido espacio de que se disponía en el aparato, nos obligó a prescindir de emplear un dispositivo en el que se pudiera colocar al papel entre dos tiras largas de vidrio.

El aditamento que en la práctica se utilizó, puede verse en el esquema adjunto (Fig. 10).

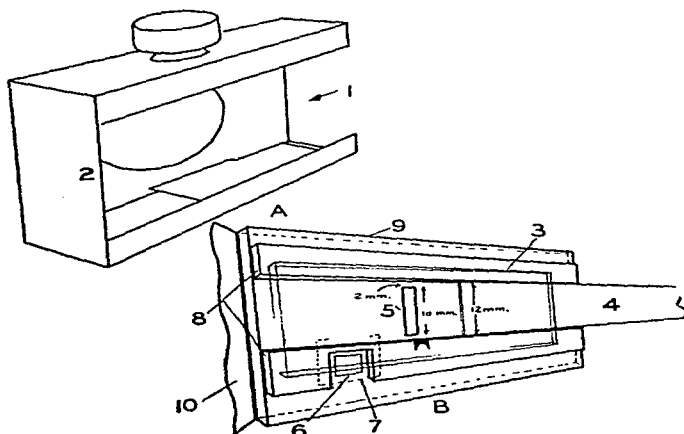


Figura 10

- A. Porta-filtros del colorímetro K. S.  
B. Dispositivo para la valoración de las tiras.

1. y 2. Lugares por donde entra y sale la tira en el portafiltros.
2. Porta objetos de microscopio cortado al tamaño.
4. Cromo-papirograma de una dimensión.
5. Ventana donde se efectúa la lectura.
6. Ventana para la celda compensadora.
7. La línea punteada señala el lugar, en que la parte de atrás del aditamento (B) se pueden colocar filtros (rejilla) para controlar la cantidad de luz que entra a la celda compensadora.
8. Tiras de cartoncillo.
9. Cristal de ventana (Belga).
10. Papel negro, que está cubriendo toda la parte de atrás del cristal, dejando al descubierto, únicamente las ventanas para las celdas, la parte que sobresale, tiene el objeto de que cuando el dispositivo está introducido dentro del porta-filtro, no hay ninguna rendija por donde pueda pasar luz.

(Todas las piezas del ditamento estaba sujetadas unas con otras, con tiras de papel Durex).

Los filtros que se ensayaron, fueron cortados de vidrios de color, encimados unos con otros, para producir diferentes intensidades de color; estos filtros, se colocaban detrás del aditamento. Probablemente, aquí estuvo nuestra falla principal, en lo rudimentario del filtro, haciendo esto, que fuera difícil el control de las lecturas, pues para una misma mancha, se obtenían lecturas, lo suficientemente diferentes, para impedirnos nuestro objeto, de intentar una valoración de las series de cromo-papirogramas, con motivo de hacer un estudio comparativo-cuantitativo de ellos.

En la figura 11 presentamos una curva obtenida con una mezcla en proporciones iguales de 10 de ellos (aprox. 5 microgramos de cada uno), se efectuaron lecturas aproximadamente a cada 2 mm. con un total de 186 lecturas. (Cuando había una serie de lecturas iguales, al trazar la gráfica, y con objeto de que alcanzara el papel milimétrico, se contaba unas dos veces la misma lectura, y se continuaba anotando a los puntos que indicaban una inflexión de la curva). La gráfica, fué realizada, colocando directamente las lecturas obtenidas del colorímetros, en contra de la distancia en la tira, en unidades aproximadamente de 2 mm. Para iniciar las lecturas en un punto determinado, a un mm. antes de donde deseaba la primera lectura, se pintaba una mancha negra, que se apreciaba en el aparato, como una gran absorción luminosa, a partir de la cual se iniciaban las lecturas.

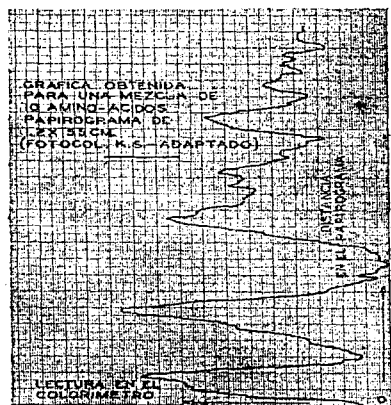


Figura 11

Probablemente, con el empleo de una cubeta de vidrio, que se llene con líquidos de color determinado (long. de onda), y que se coloque en lugar apropiado, pueda proporcionar un sistema de filtros, que junto con un aditamento que permita pasar la tira frente a la ventana de lectura, en forma bien controlada, dé mejores resultados que los que se obtuvieron.

## RESULTADOS

Al encontrarse la forma de resolver las dificultades que se fueron presentando, tales como: la presencia de exceso de sales solubles, aparatos, etc., se intentó la aplicación del proceso para ver si era posible llevar a cabo un estudio comparativo, entre contenidos proteínicos de diferentes materiales.

En los mono-papirogramas de cabellos humanos, que fueron estudiados, se pudo apreciar como se consigna en las fotografías adjuntas, la presencia de zonas coloridas en las regiones donde se



encuentran los amino-ácidos conocidos; no pudiéndose identificar individualmente más que a la prolina (no aparece en las fotografías), ácido glutámico, y ácido aspártico, debido a su color y localización bien distinguibles. Se pudo observar (aun cuando en las fotografías no se le ve muy claro), que comparando una misma zona en todas las muestras que se examinaron, la intensidad de color de una muestra a otra, variaba desproporcionadamente. Además, se comprobó el orden siguiente en el contenido de amino-ácidos de los diferentes cabellos humanos: Rojo, castaño claro, castaño oscuro, negro, pardo, oscuro, güero y cano; no se observó la presencia de una concentración excesiva en las zonas correspondientes a la treonina, indicando con esto, que el contenido de este amino-ácido, no está; (en el cabello humano) en gran desproporción con la concentración individual de los demás amino-ácidos (como se obtiene por el método descrito en (45)). En los pescados aunque se pudo determinar la presencia de los amino-ácidos conocidos, no se pudo hacer una distinción como se hiciera con las muestras de cabello; sin embargo, se pudo observar el contenido mayor de amino-ácidos en la muestra de pescado del Amazonas, del cual se tuvo que aplicar en alícuotas más diluidas.

Los papirogramas de maíz y levadura, se efectuaron como un sondeo; pudiéndose observar (aun cuando los papirogramas que reportamos fueron corridos en diferentes condiciones) la diferencia entre uno y otro contenidos de amino-ácidos.

En papirogramas de dos dimensiones, se pudo constatar, comparando con algunos datos obtenidos por nosotros, y completado con los reportados por Consden (31) (debido a que carecíamos de algunos amino-ácidos), la presencia de 18 de ellos conocidos, así como dos manchas en posición desusual, que pudieran significar la presencia de otros de estos ácidos, todavía no identificados.

Debido a las deficiencias del aditamento para efectuar las determinaciones fotométricas, este trabajo quedó reducido a un primer intento, del estudio papirográfico comparativo y cuantitativo, de los contenidos que dan reacción a la ninhidrina, de los hidrolizados de una variedad de materiales proteínicos.

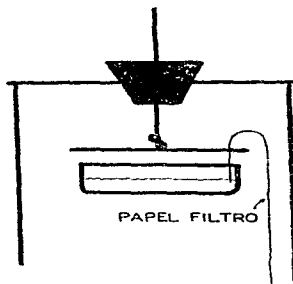
Para finalizar, y como hiciéramos más atrás con el problema relativo a la extracción de amino-ácidos, haremos una breve reseña de las mejores condiciones, para llevar a cabo este método, deduci-

das de las modificaciones que imaginamos y practicamos, y de los que nos proponíamos ensayar, en vista del estudio práctico que llevamos a cabo;

1.—Extracción y proceso en la forma vista, abarcándose la posibilidad del estudio de contenidos de proteínas, a casi cualquier tipo de materiales.

2.—Calibrar en la forma descrita, la micro pipeta, con el solvente en el cual se suspendan las muestras (fenol 80%).

3.—El aparato para descensos mono-dimensionales, debe de adaptársele en forma que se hizo para el aparato para desarrollos descensionales, para poder equilibrar el papel con la atmósfera de la cámara antes del desarrollo, dispositivo que también serviría para introducir simultáneamente a todas las tiras dentro del solvente; ver esquema adjunto.



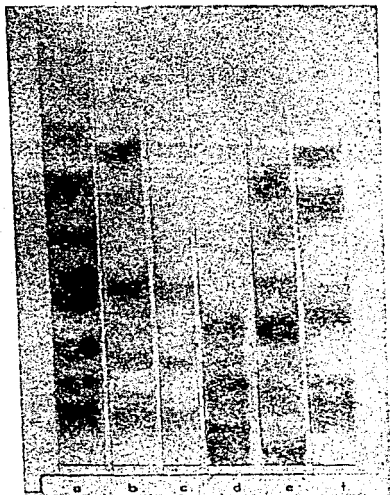
4.—Efectuar el secado con corriente de aire caliente a 85° C. (Kirby y Cain).

5.—Valoración de las tiras:

a. Fotométricamente.

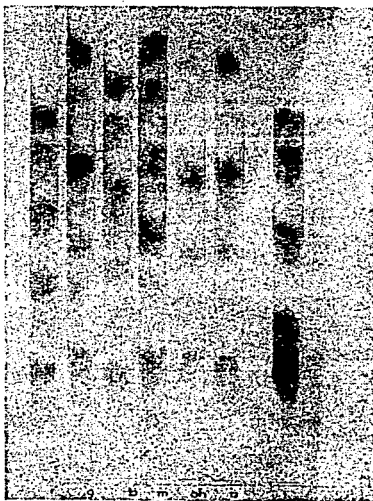
b. Por elución de secciones (entre Rf) de los mono-papirogramas, y hacer lecturas espectrofotométricas de los eluidos de esas secciones en la forma descrita por Landua y Awapara, para poder construir gráficas de concentración contra distancia recorrida.

c. Método muy aproximado, comparando cada sección (Rf) con una escala colorida.

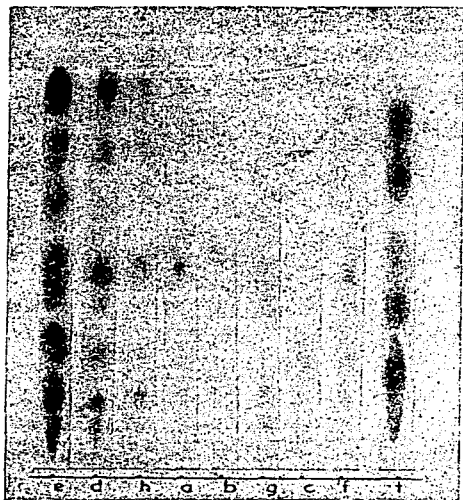


Papirogramas de:

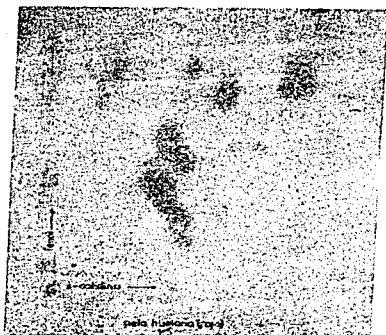
- a.—Hidrolizado de pelo humano.
- b.— " " pescado (carne).
- c.— " " huevo de ahuahutli.
- d.— " " levadura de cerveza (m).
- e.— " " harina de maiz integral.
- f.— " " Mezcla de Cih. de 10 amino-ácidos.



Papirogramas de: hidrolizados de algunos pescados y ahuate.



Papirogramas de hidrolizados de diferentes cabellos humanos.



Papirogramas en dos dimensiones de cabello humano (rojo).

**CAPITULO V**  
**SUMARIO Y CONCLUSIONES**

- 1.—Se describe la clasificación de Meinhard, sobre la Cromatografía en general, para localizar la posición que guarda la Papirografía, dentro de aquélla.
- 2.—Discusión teórica sobre la Papirografía.
- 3.—Estudio de las formas de adsorción, y su aplicación por nosotros a la interpretación de la formación de la "fase líquida inmisible" de que habla Meinhard, y para la interpretación de la fluorescencia de los amino-ácidos frente a la celulosa.
- 4.—Se discute el problema relativo a la presencia de sales solubles, en las muestras papirográficas, y se da método sencillo que ideamos para su eliminación, basado en el reporte de Mc Collum y Rider (114), que permite trabajar con hidrolizados conteniendo una concentración de sales solubles, muy alta.
- 5.—También practicamos otro procedimiento para evitar la presencia de estas sales, hidrolizando con  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  y neutralizando con  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .
- 6.—Introducimos un nuevo sistema de aplicación de muestras papirográficas, conteniendo cantidad suficiente para efectuar buenas separaciones, aplicando alícuotas de 0.5 a 1.00 microlit., en zonas húmedas de 2-4 mm. de diámetro, o bien para papirogramas efectuados en tubos de ensaye, de 0.1 microlit. en una zona húmeda de aprox. 1 mm. de diámetro. Empleando para ello soluciones del 5-10% de material, en fenol al 80% (en agua).
- 7.—Estudiamos la forma de hacer y calibrar, una micropipeta, para aplicar fracciones de  $\frac{1}{2}$  y 1 microlit.
- 8.—Se estudian varias formas de hacer una cámara de desarrollo, e introducimos, entre otras, una modificación de gran utilidad para aparatos de ascensión capilar, que permite equili-



brar al papel, con la atmósfera de la cámara, antes de la ascensión. También ensayamos un aparato para descensos capilares en tiras de papel de 1 a 2 m. de largo; logrando estas tiras, empatando tramos de 55 cm. en tal forma que hubiera una mínima distorsión al pasar el solvente, por las añadiduras. Colocando unos anillos de vidrio al fondo de tubos que servían de cámaras de desarrollo, evitamos que la tira de papel, por efecto de capilaridad, se pegara a las paredes de los tubos de ensaye.

- 9.—Se resolvió la forma de obtener cámaras a temperatura entre 10 y 15° C., introduciendo trozos de hielo dentro de una gaveta (10 Kg. para un volumen de 0.4 m<sup>3</sup> de gaveta). Para obtener temperaturas menores (5°), se utilizó un refrigerador ordinario, dentro del cual se introducía a la cámara para los desarrollos papirográficos.
- 10.—Se hace una descripción de algunas de las aplicaciones que se han dado al método de Consden y colaboradores, y proponemos su aplicación al estudio comparativo de los contenidos proteínicos de diferentes materiales; estudiándose para ello hidrolizados de cabello humano, de carne de diferentes pescados, huevo de ahuahutli, levadura de cerveza, e hidrolizados de harina de maíz integral.
- 11.—Se estudian algunos solventes, y proponemos el sistema alcohol etílico-alcohol bencílico, también reportamos los valores R<sub>f</sub> para algunos amino-ácidos, en fenol al 80%.
- 12.—Estudiamos varios papeles filtro, y encontramos sustituto para el Whatman No. 1 (E.&D. No. 613).
- 13.—Hacemos un comentario sobre las diferentes formas en que se puede aplicar la reacción de la ninhidrina, y se estudia el mecanismo de la misma.
- 14.—Se encuentra que el cabello rojo tiene mayor abundancia de amino-ácidos (conocidos) que los cabellos de otros colores. Se sospecha la presencia en el cabello humano, de otros de estos ácidos, aún no identificados.
- 15.—Proponemos un aditamento para el colorímetro Klett-Summerson, para la valoración de papirogramas mono-dimensionales, también se reporta el tipo de gráfica obtenida.

CAPITULO VI  
BIBLIOGRAFIA

- (1) Agren, G., *Acta. Chem. Scand.*, **3**, 301 (1949), en C. A., **43**, 7066 (1949).
- (2) Agren, G. y Nilson, T., *Acta. Chem. Scand.*, **3**, 525 (1949), en C. A., **43**, 8429 (1949).
- (3) Albanese, A. A. y Lein, M., *Science*, **110**, 163 (1949).
- (4) Ames, S. R. y Risley, H. A., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **69**, 267 (1948), en C. A., —, 1451 (1949).
- (5) Arden, T. V., Burstall, F. H., Davies, G. R., Lewis, J. A. y Linstead, R. P., *Nature (Lond.)*, **162**, 691 (1948).
- (6) Auclair, J. L. y Jamieson, C. A., *Science*, **108**, (1948).
- (7) Awapara, J., *Arch. Biochem.*, **19**, 172, (1948).
- (8) Idem., *J. Biol. Chem.*, **178**, 113 (1949), en C. A., **43**, 8427, (1949).
- (9) Bate-Smith, E. C., *Biochem. J.*, **43**, XLIX (1948).
- (10) Idem., *Nature (Lond.)*, **161**, 835, (1948).
- (11) Beilstein, "Handb. des Organische Chemie", IX, 620 (1926); VII, 375, 475, 476, 694, (1931); XII, 191 (1933); XIII, 425 (1933); VIII, 431 (1934); V, 376 (1943); XV, 44 (1944).
- (12) Bentley, H. R., McDermott, E. E., Pace J., Whitehead, J. K., y Moran, T., *Nature*, **163**, 675 (1949).
- (13) Bentley, H. R., y Whitehead, J. K., *Nature (Lond.)* **164**, 182 (1949).
- (14) Bergstrom, S., y Paabo, K., *Acta. Chem. Scand.*, **3**, 202 (1949). *Loc. cit.* en (28a).
- (15) Blass, J. y Macheboeuf, M., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **29**, 903 (1947).
- (16) Block, R. J., *Science*, **108**, 608 (1948).
- (17) Idem., y Bolling, D., "The Amino-acid Composition of Proteins and Foods".
- (18) Boscott, *Nature (Lond.)*, **159**, 342 (1947), *Loc. cit.*, en (28a).
- (19) Brannte, G., *Nature (Lond.)*, **163**, 651 (1949).
- (20) Brown, Hirst, Hough, Jones y Wadman., *Nature (Lond.)*, **161**, 720 (1948).
- (21) Bull, H. G., Hahn, J. W. y Baptist, V. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 550 (1949).
- (22) Burstall, F. H., Davies, G. R., Linstead, R. P., y Wells, R. A., *Nature (Lond.)*, **163**, 64 (1949).
- (23) Burton, B. R., Zaffaroni, A., y Keutmann, E. H., *Science*, **110**, 442 (1949).

- (24) Cavallini, D., Frontalli, N. y Toschi, G., *Nature (Lond.)*, **163**, 568, (1949).
- (25) Chaikoff, I. L., Taurong, A. y Tong, W., *Nature (Lond.)*, **164**, 181, (1949), en *C. A.*, **43**, 8417 (1949).
- (26) Chargaff, E., Levine, C. y Green, C., *J. Biol. Chem.*, **175**, 67, (1948).
- (27) Cherbuliez, T. y Herzenstein, A., *Helv. Chim. Acta*, **17**, 1440 (1934), *Loc. Cit.* en (41).
- (28) Christ, C. L., Burton, C. J. y Botty, M. G., *Science*, **108**, 91.
- (28a) Clegg, D. L., *Anal. Chem.*, **22**, 49 (1950).
- (29) Coekburn, R., Ducker, B., y Lindley, H., *Biochem. J.*, **43**, 438, (1938).
- (30) Conden, R. y Gordon, A. H., *Nature (Lond.)*, **162**, 180 (1948).
- (31) *Idem.* y Martin, A. J. P., *Biochem. J.*, **38**, 224 (1944).
- (32) *Idem.* **39**, 251 (1945), *Loc. Cit.* en (28a).
- (33) *Idem.* **41**, 590 (1947).
- (34) *Idem.*, **44**, 548 (1949).
- (35) Conden, R., Gordon, A. H., y Syngé, R. L. M., *Biochem. J.*, **41**, 596 (1947).
- (36) Copley, G. N., *Analyst*, **66**, 492 (1941), *Loc. Cit.*, en (41).
- (37) Crumpler, H. R., y Dent, C. E., *Nature (Lond.)*, **164**, 441 (1949).
- (38) De Ment, J., "Fluorescent Chemicals and Their Applications". N. Y. (1942).
- (39) Dent, C. E., *Biochem. J.*, **41**, 240 (1947).
- (40) Dent, C. E., "Conference on Metabolic Aspects of Convalescence" *Transactions of the 14th. Meeting. N. Y.* (pág. 126). (1946).
- (41) *Idem.*, *Lancet (Lond.)*, **CCLL**, 637 (1946).
- (42) *Idem.*, **160**, 801 (1947).
- (43) Dent, C. E., Stepka, W. y Steward, F. C., *Nature (Lond.)*, **160**, 682 (1947).
- (44) Draper, O. J. y Pollard, A. L., *Science*, **109**, 448 (1949).
- (45) Echevoyen, G. M. B., Tesis, U.N.A.M.-E.C.Q. (1949).
- (46) Edman, P., *Arkiv. Kemi, Mineral. Geol.*, **22**, 1 (1945), *Loc. Cit.* en (121).
- (47) Ekman, B., *Acta, Chem. Scand.*, **2**, 383 (1948), en *C. A.*, **43**, 2263 (1949).
- (48) Fernández, O. y Giral, J., "Tratado de Química Orgánica Pura y Aplicada a las Ciencias Médicas". Toledo, I, 230 (1926).
- (49) Fieser, F. y Fieser, M. (Trad. Giral F.) "Química Orgánica" Ed. Atlante, México, (1948).
- (50) Fink, R. M., Dent, C. E. y Fink, K., *Nature (Lond.)*, **160**, 801 (1947).
- (51) Fink, R. M. y Fink, K., *Science*, **107**, 253 (1948).
- (52) Fischer, R. B. Parsons, S. y Morrison, G. A., *Nature (Lond.)*, **161**, 764 (1948), en *C. A.*, **42**, 5792 (1948).
- (53) Fitzpatrick, W. H., *Science*, **109**, 469 (1949).
- (54) Floor, A. E., Hirst, E. L. y Jones, J. K. N., *Nature (Lond.)*, **160**, 86 (1947).
- (55) Fontaine, T. D. y Ma., R. M., *Science*, **110**, 232 (1949).
- (56) Forysth, W. G. C., *Nature (Lond.)*, **161**, 239 (1948), en *C. A.*, **42**, 4087 (1948).

- (57) Fosdick, L. S. y Blackwell, R. J., *Science*, **109**, 314, (1909).
- (58) Franklin, A. E., y Quastel, J. H., *Science*, **110**, 447 (1949).
- (59) Franklin, A. E., J. Biol. Chem., **169**, 427 (1947).
- (60) Gal, E. M., y Greenberg, D. M., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **71**, 88 (1949), en C. A., **43**, 6269 (1949).
- (61) García Junco, M., "Tratado de Química Orgánica" I, 4a. Ed. Porrúa y Hnos. (1943).
- (62) Giral, J., Trabajo en preparación.
- (63) Gluekauf, S., J., *Chem. Soc.*, —, 1302 (1947), en C. A., **42**, 2490 (1948).
- (64) Goldberg, H. J. V., Gilda, J. E. y Tishkoff, J., *Dental Research*, **27**, 493, (1948), en C. A. **43**, 1076 (1948).
- (65) Goodall, R. R. y Levy, A. A., *Nature (Lond.)*, **158**, 675 (1946).
- (66) Idem., *Analyst*, **72**, 287 (1947), Loc. cit. en (86).
- (67) Good, P. M. y Johnson, A. W., *Nature (Lond.)*, **163**, 31 (1949).
- (68) Gordon, A. H., Martin, A. J. P. y Synge, R. L. M., *Biochem. J.*, **37**, Proc. xiii (1943).
- (69) Idem., **38**, 65 (1944).
- (70) Hais, I. M. y Pecáková, L., *Nature (Lond.)*, **163**, 768 (1949), en C. A., **43**, 7073 (1949).
- (71) Hamer, D. y Woodhouse, D. L., *Nature (Lond.)*, **163**, 689 (1949), en C. A. **43**, 7524 (1949).
- (72) Harding y McLean., *J. Biol. Chem.*, **20**, 217, (1915).
- (73) Idem., **25**, 337 (1916).
- (74) Harding y Warneford., Idem., **25**, 319 (1916).
- (75) Hawthorne, J. R., *Nature (Lond.)*, **160**, 714 (1947), en C. A. **42**, 2209. (1948).
- (76) Hesse, G. "Adsorptionsmethoden im Chemischen Laboratorium" Walter de Gruyter & Co., Berlin (pág. 129). (1943).
- (77) Howitt, Jones, y Williams., *Nature (Lond.)*, **163**, 681 (1949).
- (78) Hill, A. G. y Kolley, L., "Organic Chemistry" 1a. Ed. The Blakiston Co. (Phila.), (1945).
- (79) Hird, F. J. R. y Trikojus, V. M., *Aust. J. Sci.*, **10**, 185 (1948), Loc. cit. en (165).
- (80) Idem., **11**, 170 (1949), Loc. Cit. en (28a).
- (81) Horne, R. E., y Pollard, A. L., *J. Bact.*, **55**, 231 (1948), Loc. Cit. en (44).
- (82) Horrocks, R. H. y Manning, G. B., *Lancet*, (Lond.), **256**, 1042 (1949), en C. A., **43**, 8426 (1949).
- Horrocks, R. H., *Nature (Lond)*, **164**, 444 (1949) en C. A., **44**, 185, (1950).
- (83) Hotchkiss, R. D., *J. Biol. Chem.*, **175**, 315 (1948).
- (84) Houg, Jones y Wadman., *Nature (Lond.)*, **162**, 448 (1948).
- (85) Isherwood, F. A., *Biochem. J.*, **40**, 688 (1946).
- (86) Karnovsky, M. L. y Johnson, M. J., *Anal. Chem.*, **21**, 1125 (1949).
- (87) Keston, A. S., Udenfriend, S. y Levy, M. J., *Amer. Chem. Soc.*, **69**, 3151 (1947).

- (88) Kirby, H. B. y Cain, L., Arch. of Biochem., 24, 179 (1949).
- (89) Kluener, R. G., J. Bact., 57, 101 (1949), en C. A., 43, 4322 (1949).
- (90) La Cour, L. P. y Drew, R., Nature, 159, 307 (1947), en C. A., 4525 (1949).
- (91) Lacourt, Sommereyns, de Geyndt, Baruh, y Gillard., Nature (Lond.), 163, 999 (1949), Loc. Cit., en (28a).
- (92) Landua, A. J. y Avapara, J., Science, 109, 385 (1949).
- (93) Lederer, M., Analitica Chim. Acta., 2, 261 (1948), Loc. Cit. en (28a).
- (94) Idem., Nature (Lond.), 162, 776 (1948).
- (95) Idem., Science, 110, 115 (1949).
- (96) Le Quesne y Young, Nature (Lond.), 163, 604 (1949).
- (97) Li, C., y Roberts, E., Science, 110, 425 (1949).
- (98) Idem., 110, 559 (1949).
- (99) Linggood, F. V. y Woiwod, A. J., Brit. J. Exptl. Path., 29, 283 (1948), en C. A., 4325 (1949).
- (100) Longenecker, W. H., Science, 107, 23 (1948).
- (101) Idem., Anal. Chem., 21, 1042 (1949).
- (102) Lugg, J. W. III y Overell, B. T., Nature (Lond.), 160, 87, (1947).
- (103) Lugg, J. W. H. y Weller, R. A., Biochem., J., 38, 408 (1948).
- (104) Idem., 42., 408 (1948).
- (105) Markham, P. y Smith., J. D., Nature (Lond.), 163, 250 (1949).
- (106) Marshall, L. M., Orten, J. M. y Smith, A. H., Science, 108, 92, (1948).
- (107) Martin, A. J. P., Endeavour, VI, 21 (1947).
- (108) Idem., y Syngé, R. L. M., Biochem. J., 35, 1358 (1941).
- (109) Idem., 35, 91 (1941).
- (110a) Idem., Adv. in Prot. Chem., II, 1 (1945).
- (111) Maubasher, R., J. Biol. Chem., 175, 187 (1948).
- (112) Maw, G. A., Nature (Lond.), 160, 261 (1947).
- (113) Idem., Biochem. J. 43, 139 (1948), en C. A., 43, 2268 (1949).
- (114) McCollum, E. V. y Rider, A. A. Science, 108, 111 (1948).
- (115) Meinhard, J. E., Science., 110, 387 (1949).
- (116) Meunier, P. y Vinet A., "Chromatographie et Mésomérie". Masson et Cie. Ed. (France) (1948).
- (117) Mitchell, H. K. y Haskins, F. A., Science, 110, 278 (1949).
- (118) Moore, S. y Stein, W. H., J. Biol. Chem., 176, 367 (1948).
- (119) Müller, R. H. y Glegg., D. L., Anal. Chem., 21, 192 (1949).
- (120) Idem., 21, 1123 (1949).
- (121) Nachod, F. C., "Ion Exchange Theory and Application" Academic Press Inc., N. Y. (pág. 307). (1949).
- (122) Naftalin, L., Nature (Lond.), 161, 763 (1948).
- (123) Nicholson, D. E., Nature (Lond.), 163, 954 (1949).
- (124) Pacsu, E. Mora, T. P. y Kent, P. W., Science, 110, 446 (1949).
- (125) Partridge, S. M., Nature (Lond.), 158, 270 (1946).
- (126) Idem., Biochem. J., 42, 238 (1948).
- (127) Idem., 44, 521 (1949).

- (128) Patton, A. R. y Foreman, E. M., *Science*, **109**, 339 (1949).
- (129) Idem., y Wilson, P. C., *Science*, **110**, 593 (1949).
- (130) Pauling, L., "The Nature of the Chemical Bond" 2a. Ed. Cornell University Press. (pág. 4). (1949).
- (131) Peterson, D. H., y Reineke, L. M., *J. Biol. Chem.*, **181**, 95 (1949).
- (132) Phillips, D. M. P., *Biochem. J.* **42**, xxxviii (1948).
- (133) Idem., *Nature (Lond.)*, **161**, 53 (1948).
- (134) Idem., y Stephen, J. M. L., *Nature (Lond.)*, **162**, 152, (1948).
- (135) Picard, R. G., y Reisner, J. H., *Rev. Sci. Instr.*, **17**, 484, (1946).  
Loc. Cit. en (141).
- (136) Plattner, A. y Nager, U., *Helv. Chim. Acta.*, **31**, 2203 (1948), Loc. Cit. en (155a).
- (173) Polonovski, M. y Lespagnol, A., "Chimie Organique Biologique", 2a. Ed (pág. 490). (1944).
- (138) Polson, A., *Science*, **108**, 501 (1948).
- (139) Idem., *Biochem. et Biophys. Acta* **2**, 575 (1948), en *C. A.* **43**, 3875 (1949).
- (140) Idem., *Acta* **3**, 205 (1949), en *C. A.*, **43**, 7996 (1949).
- (141) Polson, A., Mosley, V. M. y Wyckoff, W. G., *Science*, **105**, 603 (1947).
- (142) Pope, C. G., y Stevens, M. F., *Biochem. J.*, **33**, 1070 (1939), Loc. Cit. en (28a).
- (143) Pratt, J. J. Jr. y Auclair, J. L., *Science*, **108**, 213 (1948).
- (144) Prat, J. J. Jr. y House, L. H., *Science*, **110**, 9 (1949).
- (145) Romick, A. E., "Electric Interpretations of Organic Chemistry", 2a. Ed. John Wiley & Sons, Inc. (1949).
- (146) Roberts, E. y Tishkoff, G. H., *Science*, **109** 14 (1949).
- (147) Rockland, L. B. y Dunn, M. S., *Science*, **109**, 539 (1949).
- (148) Rutter, L., *Nature (Lond.)*, **161**, 435 (1948).
- (149) Seaborg, Stanley, Thompson, G. y Ghierse, A., *Chemistry*, **23**, 7 (1950).
- (150) Smith, E. C. B., *Nature (Lond.)*, **161**, 835 (1948), en *C. A.*, **42**, 6893 (1948).
- (151) Stein, W. H. y Moore, S., *J. BIOL. Chem.*, **176**, 337 (1948).
- (152) Spaeth, E. C. y Rosenblatt, D. H., *Science*, **110**, 258 (1949).
- (153) Stepka, W., Benson, A. A. y Calvin, M., *Science*, **108**, 304 (1948).
- (154) Steward, F. C., Stepka, W. y Thompson, J. F., *Science*, **107**, 451 (1948).
- (155) Strain, H. H., "Chromatographic Adsorption Analysis". Interscience Publishers, Inc., N. Y., (1945).
- (155a) Strein, H. H., *Anal. Chem.* **22**, 41 (1950).
- (156) Swanson, A. M., Symposium of Flavor in Dairy Products, Division of Agricultural and Food Chemistry, 116th. Meeting of Am. Chem. Soc., Atlantic City, N. Y.), Loc. Cit. en (28a).
- (157) Syge, R. L. M., *Biochem. J.*, **44** 542 (1949).
- (158) Idem., y Tiselius, A., *Acta. Chem. Scand.*, **3**, 231 (1949).
- (159) Tabone, J., Robert, D. y Troestler, J., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **30**, 547 (1948) en *C. A.*, **43**, 4315 (1949).
- (160) Teeters, W. O. y Schreiner, R. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **55**, 3026 (1933).

- (161) Terrill, P. M., Master's Thesis, Northwestern Univ. (1948), Loc. Cit. en (57).
- (162) Thomas, L. E. y Mayer, D. T., *Science*, **110**, 393 (1949).
- (163) Tiselius, A., *Chem. and Eng. News*, **27**, 1041 (1949).
- (164) Idem., Drake, B. y Hagdahl, L., *Experientia*, **3**, 21 (1947) en *C. A.*, **41**, 4407 (1947).
- (165) Tishkoff, G. H., Bennett, R., Bennett, V. y Miller, L. L., *Science*, **110**, 452 (1949).
- (166) Tomarelli, R. M., y Florey, K., *Science*, **107**, 630 (1948).
- (167) Tomish, E. G., *Nature (Lond.)*, **160**, 164 (1947).
- (168) Urbach, K. F., *Science*, **109**, 259 (1949).
- (169) Idem., y Giscafré, L., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **68**, 430 (1948), en *C. A.*, —, 264 (1949).
- (170) Verdier de C. H. y Agren G., *Acta. Chem. Scand.*, **2**, 783 (1948), en *C. A.*, **43**, 4314 (1949).
- (171) Vischer, E., y Chargaff, E., *J. Biol. Chem.*, **168**, 781 (1947).
- (172) Idem., **176**, 703 (1948).
- (173) Wachtell, J. L., y Cassidy, H. G., *J. Am. Chem. Soc.* **65**, 665 (1943).
- (174) Wender, S. H. y Gage, T. B., *Science*, **109**, 287 (1949).
- (175) Westall, R. G., *Biochem. J.*, **42**, 248 (1948).
- (176) Wheland, G. W., "The Theory of Resonance and its Application to Organic Chemistry", John Wiley and Sons, Inc. (N. Y.).
- (177) Wieland, T., *Angew. Chem. A* **60**, 313 (1948), en *C. A.*, **43**, 5441 (1949).
- (178) Williams, T. I., *Research (Lond.)*, **1**, 400 (1948), en *C. A.*, **42**, 5792 (1948).
- (179) Williams, R. J., y Kirby, H., *Science*, **107**, 481 (1948).
- (180) Winegard, H. M., Teonies, G. y Block, R. J., *Science*, **108**, (1948).
- (181) Winsten, W. A., *Science*, **107**, 605 (1948).
- (182) Winsten, W. A. y Spark, A. H., *Science*, **106**, 192 (1947).
- (183) Woiwod, A. J., *Biochem. J.*, **42**, xxviii (1948); *Nature Lond.*, **161**, 169 (1948).
- (184) Woiwod, H. J. y Linggood, F. V., *Nature*, **163**, 218 (1949).
- (185) Wolfson, W. Q., Cohn, C. y Devaney, W. A., *Science*, **109**, 541 (1949).
- (186) Work, E., *Lancet (Lond.)*, **256**, 652 (1949).
- (187) Wynn, V., *Nature (Lond.)*, **164**, 445 (1949), en *C. A.*, **44**, 185 (1950).
- (188) Yacowitz, H., Norris, L. C. y Heuser, G. F., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **71**, 372 (1949), en *C. A.*, **43**, 8447 (1949).
- (189) Yagoda, H., *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.* **9**, 79 (1937).
- (190) Yanofsky, C., Wasserman, E. Bonner, D. M., *Science*, **111**, 61 (1950).
- (191) Zaffaroni, A., Burton, R. B. y Keutmann, E. H., *J. Biol. Chem.* **177**, 109 (1949).
- (192) Zechmeister, L. y Cholnoky, L., "Principles and Practice of Chromatography" 2a. Ed. John Wiley & Sons Inc, N. Y.