

Tesis de Posgrado

Análisis cromatográfico en papel de proteínas aisladas de la larva de *Tenia equinococcus*

Pozzi, Guelfo

1952

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

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

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

Cita tipo APA:

Pozzi, Guelfo. (1952). Análisis cromatográfico en papel de proteínas aisladas de la larva de *Tenia equinococcus*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0699_Pozzi.pdf

Cita tipo Chicago:

Pozzi, Guelfo. "Análisis cromatográfico en papel de proteínas aisladas de la larva de *Tenia equinococcus*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1952. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0699_Pozzi.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas Físicas
y Naturales
Escuela de Química

Análisis cromatográfico en papel de proteínas aisladas
de la larva de *Tenia equinococcus*

TESIS
presentada para optar al título de Doctor en Química
por
Guelfo Pozzi

Buenos Aires, Abril de 1952

Tesis: 699

Padrino de Tesis

Profesor Doctor Jorge R. Mendive

Este trabajo ha sido realizado en el Instituto Malbrán del Ministerio de Salud Pública de la Nación.

Quienes lo han hecho factible,

Doctor Ignacio Pirotsky, Jefe de la Sección Sueros, en cuyo laboratorio se realizó la parte experimental que se llevó a cabo contando con su constante interés y valiosas indicaciones sobre el tema que él nos sugiriera,

Doctor Jorge R. Mendive, padrino de tesis, que nos asistió con sus consejos,

Doctor Enrique Savino, Director del Instituto, reciban todos ellos mi más profundo agradecimiento.

El estudio de la proteína aislada de la hidátide de *Tenia equinococcus* (') tiene un interés particular por representar esta substancia la fracción antigénica especie específica de esta parasitosis. Recordaremos que la especificidad de grupo corresponde al conjunto de substancias, lípidos en general, extraídos de este parásito, solubles en alcohol y otros solventes orgánicos.

En este trabajo se examinan algunas de las características generales de esta proteína y se aplica en particular el método de la cromatografía en papel para la identificación de los amino-ácidos que la constituyen.

(') La *Tenia equinococcus* (*Echinococcus granulosus*) es un parásito heteróxico, esto es, que necesita de más de un huésped para completar su ciclo evolutivo.

Este ciclo comprende el estado adulto y el de larva. El estado adulto se desarrolla en el huésped definitivo, en este caso el perro, en cuyo intestino se aloja. El estado de larva, una hidátide, evoluciona en los órganos de un huésped intermedio que puede ser el hombre, el bovino, el ovino, etc.

El conjunto de la hidátide más la reacción propia del órgano parasitado, membrana perihidática o adventicia, constituye lo que en patología humana y patología comparada se conoce con el nombre de equinococosis hidatídica o quiste hidatídico.

La hidátide de *Tenia equinococcus* tiene el aspecto de una esfera de tamaño variable, de pared blanda, con un contenido líquido de aspecto cristalino.

Dicha pared se halla compuesta por una doble capa: una capa interna, la membrana germinativa y otra externa, la cuticular.

La membrana germinativa tiene de diez a veinticinco micrones de espesor, se halla íntimamente adherida a la capa externa y está constituida por elementos celulares netamente diferenciados. La capa externa, la cuticular, tiene un aspecto lechoso y se halla compuesta por laminillas concéntricas.

En capítulos sucesivos se estudia:

- 1 - Aislamiento de proteína de la hidátide de T.equino-
coccus.
 - a. Proteína de líquido.
 - b. Proteína de membrana.
- 2 - Propiedades generales y significado biológico de esta
proteína.
- 3 - El método cromatográfico en papel.
 - a. Antecedentes.
 - b. Estudio experimental de la técnica.
- 4 - Aplicación de la cromatografía en papel al análisis
de las proteínas aisladas.
 - a. Cromatografía del hidrolizado de la proteína sepa-
rada del líquido hidático.
 - b. Cromatografía del hidrolizado de la proteína sepa-
rada de la membrana hidática.

Con respecto al líquido hidático su composición es la si-
guiente: para 100 mililitros: (líquido de quiste de bovino)

Densidad.....	1008
Agua.....	98,70
Extracto.....	1,30
Cenizas.....	0,83
Cloruro de sodio.....	0,65
Glucosa.....	0,06
Proteína.....	0,02
Grasas.....	0,04
Urea.....	0,014
Calcio.....	0,008

Estas cifras corresponden a promedios obtenidos por varios
autores, entre otros WERNICKE y SAVINO (1), LEMAIRE y RIBERE (2).

Capítulo I

Aislamiento de la proteína de la hidátide de T. equinococcus

Se han estudiado por separado las proteínas aisladas de líquido hidático y de membrana. Para la obtención de las mismas se ha seguido la técnica descrita por PIROSKY y colab. (3)

a.-Proteína de líquido.

Se operó sobre un total de 9,3 litros de líquido hidático. Este se obtuvo de quistes localizados en el hígado y pulmones de bovinos faenados en el día. La punción de los quistes se realizaba con la mayor asepsia y el material recolectado en una sesión se centrifugaba unos minutos o se pasaba por papel de filtro estéril a fin de separar los escólices y materia en suspensión. El líquido cristalino así obtenido era colocado en frascos estériles y conservado sobre nieve carbónica hasta conseguir el volumen conveniente. Se tuvo el cuidado de desechar todo líquido que no tuviese el aspecto clásico de cristal de roca.

Separación de la proteína - El volumen ya citado se descongela a temperatura ambiente, se pasa por papilla de papel de filtro y se agrega la cantidad de cloruro de sodio sólido necesario para saturar a 10°C, ajustando el pH a 3,2 potenciometricamente con ClH concentrado. Se deja en la heladera durante la noche. El precipitado que se forma es separado por filtración con papel simple y redissuelto a continuación en

agua destilada mediante el agregado de Na(OH) al 10 por ciento hasta un pH 7,6 - 7,8 al rojo de fenol. La solución obtenida (960 mililitros), de color ligeramente amarillento se dializa en agua corriente durante 24 horas en cámara fría.

Terminada la diálisis, la solución presenta una opalescencia que desaparece por agregado de cloruro de sodio sólido hasta una concentración de 0,8 por ciento y ajustando el pH a 7,8.- Se filtra por papel plegado.

De esta solución se reprecipita la proteína con cloruro de sodio sólido a 2/3 de saturación a 10°C y a pH 3,2.- Se deja durante la noche en cámara fría, se centrifuga durante 45 minutos y el precipitado se redisuelve en 500 mililitros de una solución de cloruro de sodio al 0,8 por ciento y de pH 7,8.- El sobrenadante, biuret negativo, se descarta.

Se efectúa una segunda reprecipitación por agregado de igual volumen de una solución de cloruro de sodio saturada a 10°C ajustando el pH a 3,9.- Como anteriormente, se deja durante la noche en la heladera, el precipitado es separado por centrifugación, suspendido en 100 mililitros de agua destilada y redisuelto a pH 7,4.- El sobrenadante, biuret negativo, se descarta.

Las dos soluciones de proteínas obtenidas, a pH 3,9 y 3,3, se dializan en sacos de celofán en agua destilada hasta reacción negativa de cloruros.- Estas soluciones se llevan a sequedad por liofilización.

Se obtuvieron, a partir de los 9,3 litros iniciales de líquido hidático, un total de 2,773 gramos de proteína, correspondiendo 1,593 grs. a la precipitada a pH 3,9 y 1,180 grs. a la precipitada a pH 3,3. (Estas cifras han sido obtenidas mediante determinaciones realizadas por el método de KJELDAHL).

b. - Proteína de membrana.

Las membranas fueron obtenidas abriendo los quistes con la mayor asepsia luego de haber eliminado el líquido por aspiración, desechando todas aquellas que no tuviesen el aspecto característico lechoso, de clara de huevo coagulada. Se lavaban rápidamente en solución fisiológica con objeto de eliminar el pequeño volumen de líquido hidático residual y los escólices. Las membranas obtenidas en cada sesión eran conservadas en recipientes estériles sobre nieve carbónica hasta obtener la cantidad considerada necesaria.

Reunidos 460 gramos de membrana, peso húmedo, se trituraron en el Waring blender durante un minuto. Para ello se descongelaban a temperatura ambiente, se las pasaba al triturador previamente enfriado con nieve carbónica agregandose un volumen de solución fisiológica igual al peso de membranas.

Se ha comprobado que es importante enfriar previamente y mantener enfriado el recipiente del triturador durante la operación que debe ser lo más breve posible.

A la papilla así obtenida se le agregó solución fisiológica hasta un volumen de 800 ml y se dejó durante la noche en la heladera para efectuar la primera extracción. Filtrada la papilla por gasa, se la extrae por segunda vez en las mismas condiciones,

Reunidas ambas soluciones se agregó cloruro de sodio sólido a saturación a 10°C y se ajustó el pH a 3,7 repitiéndose desde aquí el procedimiento ya descrito para la separación de la proteína de líquido. La solución final obtenida fué conservada sobre nieve carbónica.

Capítulo II

Propiedades generales y significado biológico de la proteína de hidátide de T. equinococcus

Dadas las características de precipitabilidad, solubilidad, coagulación térmica, ya señaladas por PIROSKY (4), nos pareció de interés precisar las características generales de esta proteína y señalar nuevamente su significado biológico.

Propiedades generales.

Utilizamos una solución al dos por ciento de proteína en agua destilada llevada a pH 7,4 - 7,6 por agregado de Na(OH) al 10 por ciento, umbral de la zona donde la proteína comienza a ser perfectamente soluble. En estas condiciones verificamos lo siguiente: reacción del biuret intensamente positiva, de un orden igual o mayor a la de una solución de suero-proteínas a la misma concentración, reacción de Molisch negativa (lectura inmediata y a las 24 horas); en cuanto a la coagulación térmica, debemos señalar que la solución permanece límpida en ausencia de electrolitos después de un calentamiento prolongado en el medio alcalino de pH ya señalado y aún a pH 3,8 - 4. El agregado de algunos cristales de cloruro de sodio a la solución a pH 3,8 anteriormente calentada provoca una coagulación instantánea, a diferencia de la solución alcalina, a la cual además de agregar cloruro de sodio es necesario volverla a calentar para obte-

ner la coagulación.

Precipitabilidad por sales.

Se estudió la sensibilidad de esta proteína al cloruro de sodio y sulfato de amonio a diferentes pH.

Por agregado de mezclas buffer (mezclas de Clark y Lubs o de Mc Ilvaine, según el caso) se obtuvieron soluciones de proteína a pH que variaban de 1 hasta 7,6. Por adición de volúmenes adecuados de solución saturada de cloruro de sodio o de sulfato de amonio, se examinó el efecto de estas sales al tercio a media saturación y a dos tercios de saturación para cada uno de los pH elegidos. - Cuadro nº1 -

Cuadro nº1 - Efecto del cloruro de sodio y del sulfato de amonio a pH comprendidos entre 1 y 7,6, sobre la proteína de líquido hidático de *Tenia equinococcus*.

tubo	sol.de prot. 1%	pH	ClNa sol.sat.	% sat.	SO ₄ (NH ₄) ₂ sol.sat.	% sat.	opalesc.	sobrenad. r.biuret
	ml		ml		ml			
1	1	1	-	-	-	-	0	p
2	1	1	1	50	-	-	+++	0
3	1	1	2	66	-	-	+++	0
4	1	1	-	-	0,5	33	+++	d
5	1	1	-	-	1	50	+++	d
6	1	1	-	-	2	66	+++	d
7	1	1,6	-	-	-	-	0	p
8	1	1,6	1	50	-	-	+++	tr
9	1	1,6	2	66	-	-	+++	tr
10	1	1,6	-	-	0,5	33	+++	d
11	1	1,6	-	-	1	50	+++	d
12	1	1,6	-	-	2	66	+++	d
13	1	2,3	-	-	-	-	0	p
14	1	2,3	1	50	-	-	+++	0
15	1	2,3	2	66	-	-	+++	0
16	1	2,3	-	-	0,5	33	+++	d
17	1	2,3	-	-	1	50	+++	d
18	1	2,3	-	-	2	66	+++	d
19	1	3,1	-	-	-	-	0	p
20	1	3,1	1	50	-	-	+++	0

tubo	sol.de prot.1%	pH	ClNa sol.sat.	% sat.	SO ₄ (NH ₄) ₂ sol.sat.	% sat.	opalesc.	sobrenad. r.biuret
	ml		ml		ml			
21	1	3,1	2	66	-	-	+++	0
22	1	3,1	-	-	0,5	33	+++	d
23	1	3,1	-	-	1	50	+++	d
24	1	3,1	-	-	2	66	+++	d
25	1	3,4	-	-	-	-	±	p
26	1	3,4	1	50	-	-	+++	0
27	1	3,4	2	66	-	-	+++	0
28	1	3,4	-	-	0,5	33	+++	d
29	1	3,4	-	-	1	50	+++	d
30	1	3,4	-	-	2	66	+++	d
31	1	4	-	-	-	-	+	p
32	1	4	1	50	-	-	+++	0
33	1	4	2	66	-	-	+++	0
34	1	4	-	-	0,5	33	+++	d
35	1	4	-	-	1	50	+++	d
36	1	4	-	-	2	66	+++	d
37	1	4,6	-	-	-	-	+±	p
38	1	4,6	1	50	-	-	+	d
39	1	4,6	2	66	-	-	+	p
40	1	4,6	-	-	0,5	33	++	d
41	1	4,6	-	-	1	50	++	d
42	1	4,6	-	-	2	66	++	d
43	1	5,4	-	-	-	-	0	p
44	1	5,4	1	50	-	-	0	p
45	1	5,4	2	66	-	-	±	p
46	1	5,4	-	-	0,5	33	++	d
47	1	5,4	-	-	1	50	++	d
48	L	5,4	-	-	2	66	+++	d
49	1	7,6	-	-	-	-	0	p
50	1	7,6	1	50	-	-	0	p
51	1	7,6	2	66	-	-	0	p
52	1	7,6	-	-	0,5	33	+	d
53	1	7,6	-	-	1	50	+++	d
54	1	7,6	-	-	2	66	+++	d

La lectura se realiza a la hora y a las 24 horas. Al cabo de este último término se procedió a la centrifugación de cada una de las soluciones, verificándose en el líquido sobrenadante la presencia de proteína mediante la reacción del biuret.

Se comprueba que entre pH 1 y 4 la proteína precipita totalmente con cloruro de sodio a media saturación, mientras que aún

a los dos tercios de saturación con sulfato de amonio queda proteína en solución. A pH superiores a 4,6 la precipitación es incompleta con ambas sales. (*)

Punto isoeléctrico - Se determinó el punto isoeléctrico de la proteína separada a pH 3,9 y 3,3.- Se utilizaron soluciones de proteína al 1 por mil y dos por mil en series que iban desde pH 2,2 a 6 mediante los buffers de Mc.Ilvaine y los de acetato. - Se mezclaban volúmenes iguales de solución de proteína y del buffer.- El sistema se encontraba a temperatura ambiente.- En algunas determinaciones se facilitó la lectura por el agregado de alcohol en la cantidad de un tercio sobre el volumen total de la mezcla buffer-proteína. - Cuadro nº 2.

Cuadro nº2.- Determinación del punto isoeléctrico de las proteínas aisladas a pH 3,9 y 3,3 del líquido hidático.

tubo	pH	Proteína preparada a pH 3,3				Proteína preparada a pH 3,9			
		opalescencia		floculación		opalescencia		floculación	
		10 min.	60 min.	10min.	60min.	10min.	60min.	10min.	60min.
1	3,2	0	0	0	0	0	+	0	0
2	3,5	0	0	0	0	0	+	0	0
3	3,7	0	0	0	0	0	+	0	0
4	3,9	0	±	0	0	0	+	0	0
5	4,1	0	+	0	0	±	+	0	0
6	4,3	±		0	+	+	++	0	0
7	4,5	+		0	+	+		0	±
8	4,7	++		0	++	++		0	++
9	4,9	+		0	+	++		0	±
10	5,1	±	++	0	0	+		0	+
11	5,3	0	+	0	0	+	++	0	0
12	5,5	0	+	0	0	+	++	0	0

(*) Señalamos el hecho de que si bien en soluciones puras esta proteína precipita totalmente a media saturación con cloruro de sodio en medio ácido; para separarla del líquido hidático es necesario operar con dicha sal a saturación.

Para la lectura del punto isoeléctrico se tomó en consideración el primer tubo de la serie en el que aparecía opalescencia.- En estas condiciones el punto isoeléctrico de la proteína separada a pH 3,3 se halla entre 4,5 - 4,7 y el de la proteína separada a pH 3,9 entre 4,7 y 4,9.- Estos puntos fueron confirmados mediante la técnica de Michaelis. - Esta consiste en agregar una serie de soluciones buffers de diferentes pH, diluídas al límite de su capacidad buffer, un mililitro de la solución de proteína en estudio, lo cual determina un cambio del pH de todas las soluciones menos el de aquella que coincida con el punto isoeléctrico de la proteína.

Estas determinaciones fueron hechas potenciométricamente.

Significado biológico - Las dos fracciones de proteína separadas del líquido hidático así como la obtenida a partir de membranas, se han comportado de igual modo en cuanto a la propiedad de revelar el estado de alergia en los sujetos infestados por la hidátide de *Tenia equinococcus*. - Tampoco hemos podido apreciar diferencias antigénicas entre las mismas.

Capítulo III

Cromatografía en papel

La pequeña cantidad de proteína disponible nos obligó a buscar un método de análisis fidedigno en el cual solo se utilizaran mínimas cantidades del material problema. - Esto hizo que nuestra atención se sintiese atraída por un procedimiento relativamente reciente en el cual esa condición es una de sus características más sobresalientes y que une a ella su sencillez, elegancia y certidumbre/ - Decidimos así utilizar para el análisis cualitativo de las proteínas aisladas de hidátide de *T. equinococcus* el método de partición cromatográfica en papel descrito por primera vez por CONSDEN, GORDON y MARTIN. (5)

a.- Antecedentes sobre el método cromatográfico.

Originado incidentalmente hace aproximadamente 90 años el análisis cromatográfico no llegó a conocerse y aplicarse universalmente hasta las dos últimas décadas.- Es curioso notar que en las primeras experiencias se utilizaron tiras de papel como soporte, material que ultimamente ha vuelto a ser empleado con mucha eficacia en una de las más recientes modificaciones del método.

SCHONBEIN investigando las condiciones de formación del ozono bajo la influencia de las descargas eléctricas, utilizaba tiras de papel impregnadas con ioduro de potasio y almidón para detectarlo. Observó que cuando sumergía un extremo de la tira en las soluciones las sustancias disueltas en las mismas ascendían por el papel hasta diferentes alturas. - SCHOENBEIN

publicó sus observaciones en las Verhandlungen d. Naturforschers Gesellschaft en Basilea, 1861, bajo el título: "Über einige die Haarröhrchen-anziehung des Papiere hervorgebrachte Trennungswirkungen" ("Sobre algunas separaciones realizadas utilizando la capilaridad del papel") subrayando su utilidad para resolver e identificar los componentes de mezclas sobre todo orgánicas.

GOPPELSROEDER prosiguió los estudios de su maestro sobre ese tema publicando varios artículos, en especial una monografía en el Fresenius Zeitschrift für analytische Chemie (6): "Zur Anwendung der Adsorption zu analytische Trennungen" ("Sobre la aplicación de la adsorción a las separaciones analíticas").

El método combinaba el ascenso por capilaridad con la adsorbibilidad de los componentes de la mezcla por el soporte (algodón, lino, lana, seda y principalmente papel de filtro), según que ésta fuera mayor o menor, menos o más ascenderían las diversas sustancias respectivamente.

El método recibió el nombre de Análisis Capilar y bajo este título lo revista RHEINBOLDT H., en "Die Methoden der organischen Chemie", ed. J.Houben. Tomo 1 pag. 302 (1925).

Es al botánico ruso M.TSWETT a quién debemos la nomenclatura que damos actualmente a este método analítico, creando una modificación que tendría vastas posibilidades.

Es sabido que si una solución es agitada con una sustancia adsorbente, tiene lugar entre las 2 fases una partición determinada por una relación de masa y un coeficiente denominado de adsorción. Pero el adsorbato así obtenido es una mezcla y no hay manera sencilla de separarla. La situación es diferente si se deja percolar la solución por el adsorbente en una dirección definida.

TSWETT en sus experiencias fundamentales extrajo hojas verdes con éter de petróleo y luego hizo pasar el extracto por una columna de CO_3Ca finamente pulverizado comprimido en un tubo de vidrio vertical.- El pigmento, que era aparentemente homogéneo en solución,

al percolar lentamente, se descomponía en una serie de fracciones apareciendo en la parte superior de la columna un anillo debilmente amarillo, inmediatamente debajo, dos zonas verdes y más abajo tres otros componentes amarillos que estaban fijados en las partes más inferiores del carbonato.

Al tratar dicha columna con solvente puro se "desarrollaba el cromatograma" apareciendo interzonas blancas que se ensanchaban mientras los componentes individuales anteriormente citados se desplazaban hacía abajo con diferentes velocidades.

En 1910 aparecen los resultados de los trabajos de TSWETT en el libro: "Cromofilos en el mundo vegetal y animal" publicado en ruso en Varsovia, en el cual explica el origen del nombre "cromatografía". "Como las radiaciones luminosas en el espectro, así se separa sistemáticamente una mezcla en sus constituyentes en la columna de CO_3Ca , los cuales pueden ser cuali y cuantitativamente determinados."

El trabajo de TSWETT tuvo poca difusión entre sus contemporaneos. Esporádicamente aparecían algunos trabajos que utilizaban el método en Francia, Estados Unidos, Inglaterra y Holanda, hasta que WILSTATTER con motivo de sus trabajos de separación de enzimas, basados en la utilización sistemática de medios adsorbentes y eluyentes, aunque sin emplear la cromatografía, se refirió enfáticamente a la significación de dicho trabajo. Sus palabras tuvieron pronto eco y a principios de 1931 KUHN y LEDE-
RER (7) y KUHN, WINTERSTEIN y LEDERER (8) introdujeron exitosamente la cromatografía en la química preparativa de los pigmentos poliénicos.

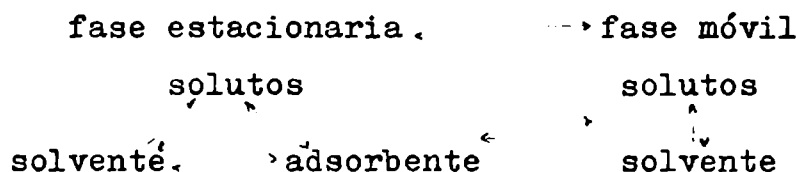
Desde entonces su uso se fué haciendo universal al mismo tiempo que se mejoraban las técnicas, recibiendo así tanto, la química de los hidratos de carbono como la de los lípidos y de las proteínas un valioso aporte mediante el cual se pudieron resolver los más diversos problemas asociados a la separación de

los componentes de un sistema complejo que difícilmente hubieran podido ser resueltos con otros métodos de trabajo.

En la práctica el análisis cromatográfico comprende un procedimiento particular discontinuo.- Esta técnica depende de una partición o distribución dinámica de sustancias disueltas o dispersas entre dos fases inmiscibles una de las cuales se mueve con respecto a la otra.

La mezcla a resolver es adsorbida en una columna de material adsorbente (o en el extremo de una tira de papel, como se verá luego) donde es lavada con solvente fresco o con mezclas de solventes de manera que los solutos migren a través de la fase porosa no móvil a diferentes velocidades y se separen unos de otros.

La partición dinámica de los solutos entre las dos fases en separaciones cromatográficas puede estar representada por las ecuaciones de equilibrio:



Estos equilibrios pueden comprender la disolución o dispersión del soluto, su ionización, solvatación o asociación.- Pueden formarse complejos con la misma fase o con sustancias añadidas y producirse variadas reacciones químicas reversibles.- En la fase estacionaria pueden tener lugar fenómenos de adsorción superficiales.

Para la separación cromatográfica de amino-ácidos podemos distinguir según el material usado tres procedimientos: 1º de adsorción, 2º de intercambio iónico, 3º de partición.

Cromatografía de partición - La técnica de partición fué introducida por MARTIN y SYNGE (9), después de estudios preliminares sobre la separación de acetilamino-ácidos basada en la diferencia de sus coeficientes de partición entre cloroformo y agua.

En lugar de un adsorbente sólido normal usan un polvo inerte

(sílica ppda) que sirve como soporte mecánico para una fase líquida. La columna así preparada es recorrida por una segunda fase líquida que es inmisible en la primera.- En esta técnica, la propiedad física de la cual depende la separación está determinada por la partición entre dos fases líquidas, reemplazando a la adsorción en un adsorbente.

GORDON, MARTIN y SYNGE (10) lo desarrollaron como un procedimiento de rutina para análisis de hidrolizados de proteínas.

Pero el procedimiento presentaba varios inconvenientes, entre otros la acetilación de los amino-ácidos que lo hacían engoroso y que era además fuente de errores.

Los mismos intentaron la separación de amino-ácidos por el gel de sílice que resultó impracticable debido a la adsorción de los amino-ácidos sobre el mismo.

Se obtuvo en cambio buena separación usando celulosa en forma de tiras de papel de filtro.

Finalmente CONSDEN, GORDON y MARTIN (5) desarrollaron el método que se denominó "cromatografía sobre papel".

Cromatografía sobre papel - El método recuerda el "análisis capilar" pero aquí la separación depende de la diferencia de los coeficientes de partición entre la fase móvil y la fase líquida fija (agua) inmovilizada sobre la celulosa.

Que la adsorción por la celulosa no tiene un papel significativo se ve por la comparación de los coeficientes de partición calculables en base a la velocidad relativa de desplazamiento de los amino-ácidos en el cromatograma con los obtenidos directamente por ENGLAND y COHN (11) en butanol-agua.

El dispositivo consiste en una banda rectangular de papel de filtro de porosidad conveniente, de tal modo que el borde de uno de sus extremos quede sumergido en el solvente contenido en una cubeta situada a cierta altura de la mesa o suelo.- Previamente se deposita en el extremo del papel que será sumergido en el solvente, una microgota de la solución a analizar (5 - 10 μ l).

La gota se coloca a una distancia del extremo del papel de tal modo que una vez sumergida éste, el nivel del solvente en la cubeta quede por debajo de la gota.

El papel queda colgado de la cubeta cuidando empero, mediante unas varillas horizontales paralelas, de que no toque los bordes de la misma.- Todo el sistema se encuentra en una cámara de tamaño adecuado que asegure un buen cierre.- Dentro de esta última se incluye un recipiente que contiene una solución saturada de S en S' si en la cubeta se ha colocado un solvente formado por una solución saturada de S' en S (siendo S' agua y S solvente orgánico parcialmente miscible en S').- Esto tiene por objeto obtener una atmósfera saturada de ambos solventes.

Colocado el extremo del papel en la cubeta se inicia el desarrollo del cromatograma.

En este método el solvente se desplaza sobre el papel esencialmente en el sentido de la gravedad.-El cromatograma se desarrolla durante un lapso de tiempo variable que oscila entre 20 y 72 horas.

Al cabo de este tiempo se retira el papel de la cámara, se lo seca al aire o en estufa a 80° y se procede a su revelación. Para ello se humedece el papel pulverizándolo con una solución de un reactivo apropiado. (que para amino-ácidos es en general ninhidrina)

Estos reactivos darán con los amino-ácidos compuestos coloreados determinando la aparición de manchas sobre el papel que nos indicarán la posición de los diferentes amino-ácidos.

Del solvente - Los solventes más satisfactorios son los parcialmente miscibles con agua.- En una serie homóloga de solventes la correspondiente velocidad de movimiento de los amino-ácidos cambia en el mismo sentido que la solubilidad en agua del solvente.

Aquellos completamente miscibles pueden usarse siempre que el contenido acuoso no sea muy elevado.-En este caso la celulosa, presumiblemente por un efecto de "salting-out", permite que el sistema funcione como un cromatograma de partición.

Del revelador - Como ya señalamos el reactivo principalmente

usado para revelar los amino-ácidos es la ninhidrina (hidrato de tricetohidrindeno).- Este reactivo produce con los am.ac. por calentamiento una coloración que varía desde el azul al púrpura.

Sobre la reacción que produce el compuesto coloreado hay varias interpretaciones.- Citaremos las tres principales:

Según RUHEMAN (12) el amino-ácido es desaminado oxidativamente por la ninhidrina la cual se reduce a dicetohidrindol, éste y la ninhidrina se condensan para formar hidrindantina la cual se combina con NH_3 para dar dicetohidrnilideno-dicetohidrindamina.-Esta es la más conocida.

Según RETINGER (13) dos moles de am-ác. se combinan con la hidrindantina y el compuesto se separa en dos radicales idénticos de color púrpura análogos a los presuntos compuestos formados por cationes inorgánicos e hidrindantina en solución fuertemente alcalina.

Según HARDING y colab. (14) los am.ác. se distinguen de las aminas y NH_3 puesto que reaccionan cromogénicamente con ninhidrina.

Los am.-ác. se descomponen independientemente de la ninhidrina en glioxal y NH_3 , el glioxal reduce la ninhidrina a dicetohidrindol y es oxidado al α -cetoácido correspondiente, el NH_3 se combina con el dicetohidrindol para formar dicetohidrindamina y esta se condensa con ninhidrina para formar la púrpura de Ruhemann.

Mac FADYEN y colab.(15) han realizado un estudio experimental sobre las tres interpretaciones y la reacción, cuyos resultados nos son conocidos solo en su primera parte.- Según éstos el color púrpúreo es independiente de la naturaleza del catión y debe atribuirse al anión, que denomina púrpura de Ruhemann y es indandiona-2-N-2' indanona enolato.- Además indica que la formación del compuesto coloreado no se produce por el camino de la formación intermedia de NH_3 y que el color rojo se debe al anión monovalente del indanona-enediol y el color azul al anión divalente.

Constante de desplazamiento de los amino-ácidos o Rf.- La coloración que da un amino-ácido con la ninhidrina no siempre permite reconocerlo, pero hay una magnitud que es característica del mismo y que se designa con el símbolo Rf.

Sabemos de la teoría de Martin y Synge (9) que para cromatografía en papel, siendo:

A = área de la sección transversal del papel+agua+solvente

A_1 = " " " " " " de la fase

α = coeficiente de partición = $\frac{\text{conc. en la fase acuosa}}{\text{conc. en la fase solvente}}$

$$\text{es: } R = \frac{A}{A_1 + \alpha A_s}$$

pero este R no es fácilmente medible en papel como lo es en columna y por lo tanto se introduce Rf que se define:

$$R_f = \frac{\text{desplazamiento del soluto}}{\text{desplazamiento del frente del solvente}} = \frac{x_{\text{solute}}}{x_{\text{solvente}}}$$

se tendrá ahora: $x_{\text{solvente}} = \frac{V}{A_1}$ y por lo tanto $R_f = \frac{hV/W}{V/A_1}$

donde: V, volumen de solvente utilizado para desarrollar el cromatograma

h, es la menor altura dentro de la cual hay equilibrio de partición

$$W = h (A_1 + \alpha A_s)$$

resulta:

$$R_f = \frac{hA_1}{W} = \frac{A_1}{A_1 + \alpha A_s} = \frac{RA_1}{A} = \frac{A_1}{A_1 + \alpha A_s}$$

Luego:

$$\alpha = \frac{A_1}{R_f A_s} - \frac{A_1}{A_s} = \frac{A_1}{A_s} \left(\frac{1}{R_f} - 1 \right)$$

$\frac{A_1}{A_s}$ es igual a la relación de los volúmenes de la fase solvente y de la fase acuosa en el cromatograma.- Asumiendo un dado contenido acuoso del papel, $\frac{A_1}{A_s}$ puede deducirse de la relación de los pesos del papel seco al del cromatograma desarrollado.

Cromatogramas bidimensionales - La cromatografía en papel ofrece además la posibilidad de mejorar las separaciones obtenidas en primera instancia en los procesos monodimensionales, efectuando cromatogramas llamados bidimensionales.- Estos consisten en desarrollar con un solvente dado un cromatograma en una dirección y luego, el mismo papel, sin revelarlo, es sometido a otro desarrollo con un solvente distinto, de tal manera que las direcciones de avance de ambos solventes formen entre sí un ángulo de 90° .- Se obtiene así separaciones imposibles de conseguir con un solo solvente.

Una simplificación del método original es la aportada por WOLFSON, COHN y DEVANEY (16) en la cual el papel, en vez de colgar de la cubeta, es arrollado en forma de cilindro, sumergiéndose uno de los extremos en el solvente que se encuentra directamente sobre el fondo del recipiente que se utiliza como cámara.- Arrollando papeles en cilindros concéntricos de diferentes diámetros se pueden realizar simultáneamente en una misma cámara numerosos cromatogramas.- En este caso el desplazamiento del solvente se efectúa en sentido contrario a la gravedad.

La cromatografía en papel ha obtenido por sus características tan satisfactorias una enorme difusión, apareciendo continuamente modificaciones que han permitido aplicarla a una gran variedad de problemas.

Se usa ya en todos los campos de la química, donde ha resuelto numerosos casos, tanto teóricos como prácticos y hasta económicos, dada la pequeñísima cantidad de material que se emplea en los análisis.

Originado como método eminentemente cualitativo todavía no ha podido ser transformado satisfactoriamente en cuantitativo.- Se han ideado sin embargo varias aproximaciones que ofrecen buenas perspectivas.

b.- Estudio experimental de la técnica.

Durante las experiencias que pasamos a describir se utilizó el método ascendente.- En las primeras series empleamos el método tal como lo indican Wolfson, Cohn y Devaney (16) es decir arrollando el papel en forma de cilindro.- Cuando el número de mezclas a comparar por el método monodimensional no pasaban de 4, necesitándose por lo tanto una tira de papel de ancho más reducido, se prefirió sostener el papel por un extremo o por la parte media, por intermedio de una varilla de vidrio colocada horizontalmente a una altura adecuada de la cámara en lugar de arrollarlo como se indicó anteriormente.- Así el solvente ascendía y luego descendía consiguiéndose de esta manera un aumento en la velocidad del frente del mismo, manteniéndose al mismo tiempo la sencillez y comodidad característica del método por ascenso.- Pero la mayor ventaja residía en el aumento de longitud de las tiras de papel, aún utilizando recipientes de escasa altura.

Los bidimensionales desde luego, fueron siempre arrollados en cilindros.

Materiales utilizados:

Papel - El papel usado fué exclusivamente Whatman n°1, el más conveniente por su rigidez dada la concentración acuosa de los solventes utilizados en la cromatografía de amino-ácidos.- Se cuidó de cortar siempre las tiras perpendicularmente a la dirección de la máquina (calandrado) del papel para asegurar resultados mejores y reproducibles.- Es de suma importancia no tocar el papel con las manos donde va a tener lugar el desarrollo cromatográfico, para evitar que al tratar con ninhidrina aparezcan manchas debidas al sudor que podrían falsear la interpretación.

Solventes - De los disponibles se utilizaron fenol, butanol y para ciertos casos alcohol amílico.

Fenol - Este solvente, uno de los más usados ya por Consden, Gordon y Martin (5), tenía el inconveniente de dar frentes coloreados de rojo, sumamente molestos para desarrollos de pequeña longitud; esto era atribuído por los autores a la presencia de Cu^{++} en el papel ya que el mismo desaparecía agregando, en la cámara o en el solvente, compuestos que le complejaban o lo eliminaban: Cupron, SH_2 , CNH , NH_3 , gas de hulla o tratamiento previo del papel con $\text{Fe}(\text{CN})_6\text{K}_4$, o lavando cromatográficamente en forma completa el papel con agua destilada.

Por otra parte algunos de los elementos utilizados para eliminar el frente rosado presentaban a su vez otros inconvenientes.- Así, por ejemplo, en el caso del gas de hulla resulta difícil mantenerlo a una concentración adecuada debido a la imperfección del cierre de las cámaras.- Además el gas de hulla a bajas concentraciones en presencia de amoníaco determina un frente negro sobre el papel.- Todos estos inconvenientes, tanto el frente rosado como el manejo de gases tóxicos, se obviaron destilando el fenol, como lo indican DRAPER y POLLARD. (17)

Los cristales de fenol se licúan con 12% de agua y el líquido, previo agregado de 0,1% de virutas de Al o de Zn y 0,05% CO_3HNa , se destila primero a presión atmosférica, hasta eliminar el aceótropo y luego al vacío hecho por una trompa de agua; la operación se continúa hasta dejar un residuo aproximado de 20 ml.

Se utilizó como condensador un tubo Pyrex de 70 cm. de largo por 14 mm. de diámetro, refrigerado a aire.

Al destilado se le agrega el 25% de agua triple destilada ensayada para metales pesados.

El solvente así preparado fué usado sin otro agregado ni en el líquido ni en la atmósfera de la cámara (no se encontró necesario agregar NH_3) obteniéndose cromatogramas satisfacto-

rios y limpios.

El solvente, mientras no se utilizaba, se guardó en heladera manteniéndose durante largo tiempo eficaz. Cuando los cromatogramas empezaban a señalar en el frente del solvente un ligero tinte rosado se redestilaba el fenol como se indicó.

Butanol - Se preparó el solvente destilando el butanol comercial, recogiendo únicamente la fracción superior que destila constante a 117°C y desechando el residuo. Esta fracción, ciertamente n-butanol, se mezclaba con agua y ácido-acético en las siguientes proporciones:

BuOH: 40ml

AcOH: 10ml

H₂O_{dst}: 50 ml

La mezcla se separaba en dos capas de las cuales la superior era usada directamente como solvente para el cromatograma y la inferior se incluía en la cámara en cubeta aparte para saturar la atmósfera.

Así preparado dió resultados excelentes, pues, si bien su poder separador para longitudes hasta 20 cm. de papel es inferior al fenol, dándole mayor recorrido es muy superior por la nitidez con que se delinean las manchas. La falta de nitidez de las manchas indica que el solvente ya no está en condiciones de ser usado.

Alcohol amílico - Empleamos la misma fórmula que para el butanol.

Los amino-ácidos tienen con este solvente R_f muy bajos y por lo tanto solo es utilizable en algunas separaciones difíciles con largos períodos de desarrollo.

Otros solventes - Se ensayó etanol al 77% en volumen. ($\rho = 0,87 \frac{60^{\circ}\text{F}}{60^{\circ}\text{F}}$)

Es este el caso de un solvente completamente miscible con el agua; se presume que la celulosa por un efecto de "salting-out" permite al sistema funcionar como un cromatograma de partición. Pero las manchas son mucho más anchas y difusas que en el caso de solventes parcialmente miscibles. Consideramos que

si bien puede ser un solvente útil para identificar en una mezcla unos pocos am.ács. no es ventajoso para un análisis completo. Mayor utilidad parece dar aplicando la técnica de RUTTER (18), como se verá más adelante.

También ensayamos una mezcla formada por:

n-BuOH:40%; EtOH:10%; H₂O:50%

y otra que preparábamos mezclando 20 partes de n-BuOH saturado con agua con 7 partes de fenol saturado con agua. Producida la separación en dos capas se usó la superior para el desarrollo. Los R_f de los amino-ácidos en este último solvente son muy bajos, pero se consiguen separaciones en grupos semejantes a las que se obtienen con alcohol amílico y consideramos que la mezcla en cuestión es eficiente en los mismos casos en los cuales es necesario usar a aquél y con cierta ventaja.

Cámaras - Se utilizaron brocales de vidrio o terracota vidriada y frascos de 4 ls. con boca ancha y cierre esmerilado. Los brocales se utilizaban en general a modo de campana apoyándolos invertidos sobre un vidrio plano. Cuando, por el diámetro del cilindro de papel formado era necesario usar el brocal como cubeta, colocando el solvente directamente sobre el fondo del mismo, se lo cubría con el vidrio plano tratando que el sistema fuese lo más hermético posible mediante un parafinado cuidadoso. Habitualmente, el solvente necesario para desarrollar el cromatograma se colocaba en placas de Petri, cristalizadores o cubetas de distinto diámetro y volumen según la superficie del papel. En ellos se vertía un volumen de líquido suficiente como para que el papel quedase sumergido de 1 a 2 cm.

Cuando usábamos tiras de papel sin arrollar, que se sostenían mediante varillas de vidrio colocadas horizontalmente en la cámara a una altura conveniente, lastrábamos el extremo sumergido con un trozo de varilla colocado en dos perforaciones de papel.

Con los solventes que al prepararlos se separan en dos capas de las cuales sólo una, la superior, se utiliza en la corrida, es

necesario saturar la atmósfera con ambas, colocándose en la cámara una segunda cubeta o bien un trozo de algodón embebido en la capa inferior.

Microbureta - Para medir los pequeños volúmenes de solución que se debían depositar en cada gota sobre los papeles se utilizó una pipeta de Kahn, graduada al milésimo de mililitro, adicionada de una fina goma de vacío cerrada en el extremo libre. Oprimiendo la goma con una pinza de Hoffman, se formaba en la punta de la bureta una gota del volumen requerido, que luego se absorbía en el lugar marcado del papel. Para obtener manchas compactas no deben colocarse más de 0,005 ml. por vez, sobre el papel. En estas condiciones el diámetro de la superficie de absorción de la gota en el papel es aproximadamente de 0,5 cm.. La superficie húmeda resultante debe ser secada al aire o al calor de una lámpara. De ser necesario se agregarán nuevamente 0,005 ml. volviéndose a secar y así sucesivamente hasta haber colocado en ese punto la cantidad de sustancia que la experiencia indique como la más conveniente para el caso.

Mezclas-testigo - Para la identificación de las manchas de los cromatogramas preparamos soluciones testigos constituídas por un solo o por una mezcla de amino-ácidos puros conocidos. La solución contenía un solo amino-ácido era preparada a la concentración de 0,050 milimoles por mililitro en isopropanol al 10 %. Para la preparación de mezclas testigos se tomaba un volumen conveniente (0,5 ml.) de las soluciones cuyo amino-ácido se deseaba incluir y se tenía en cuenta la dilución sufrida por cada uno de ellos. En la mezcla final se llevaba a una concentración óptima, indicada por la experiencia, agregando agua destilada. Cuando se trataba de determinar el R_f de un amino-ácido, se procedía al agregado de agua destilada a una fracción de la solución madre hasta la concentración óptima. Las mezclas tenían diferente composición según el solvente usa-

do y en general no más de siete amino-ácidos.

Ordenados según Rf decrecientes los am.-ács.incluídos en cada mezcla-testigo según los diversos solventes eran:

Para fenol-agua: leucina, valina, tirosina, treonina, glicina, serina, ácido glutámico.

Para butanol-ácido acético-agua: leucina, alanina, treonina, serina, arginina, ácido glutámico, cistina.

Para alcohol-agua: leucina, valina, prolina, tirosina, glicina, arginina, cistina.

Para alcohol amílico-ácido acético-agua: Leucina, isoleucina, valina, treonina;
y otra de: isoleucina, metionina, valina, serina.

Las mezclas así elegidas cubrían todo el ámbito de Rf y a la concentración elegida presentaban buena separación después de un desarrollo de 20 horas de duración. En general puede decirse que se obtendrá una buena separación en cromatogramas normales de 24 horas de duración si los Rf de los am.-ács. presentes difieren entre sí en un 10% o más.

Hay que tener presente que la velocidad de los am.ács.es algo mayor en el desarrollo de una solución individual que la que presenta al desarrollar una solución que contiene varios am.-ács. Es por eso que aún cuando sólo haya interés en la identificación de un am.-ács. en un hidrolizado no conviene colocar a éste en el papel como testigo en solución individual, sino preparar una mezcla con, por lo menos, tres am.ács. elegidos de tal manera que la posición que ocupen en el cromatograma desarrollado no interfiera con la del que nos interesa.

Cuando se trate de analizar sucesivamente varios hidrolizados consideramos ventajoso, una vez individualizados todos los componentes de uno de ellos, utilizarlo como uno de los testigos para la resolución de los demás.

Además de las mezclas ya citadas se utilizaron en el trabajo

previo al análisis cromatográfico de los hidrolizados, varias combinaciones de am.-ács. necesarias para determinar la secuencia de las manchas en el papel, su separación, color, determinación de concentración óptima.

Hidrolizados- El hidrolizado seco se disolvió en una solución al 10% de propanol. En todos los casos se hicieron inicialmente soluciones que cromatográficamente eran muy concentradas y luego se fueron diluyendo gradualmente para alcanzar una concentración que presentaba una buena separación en 24 horas y que nos aseguraba que no se había sobrepasado el límite de sensibilidad de la reacción reveladora de los am.-ács. presentes. Esto nos obligó en el principio a realizar cromatogramas de considerable duración dado que el área de las manchas de los am.-ács. que se encontraban en mayor proporción encubrían las de los am.ács. de Rf próximo.

Como ejemplo: 195 mgs. de hidrolizado seco se disolvieron en 3 ml de alcohol isopropílico al 10%. Con 1 ml de esta solución se llega a cromatogramas convenientes una vez diluido con dos y media veces su volumen de isopropanol al 10%.

Duración - La duración que debe darse a un cromatograma no es naturalmente constante. Para bidimensionales puede decirse que son suficientes para los solventes usados por nosotros 20 horas para cada uno.

En los monodimensionales debe tenerse en cuenta, además de los amino-ácidos que se quieran separar, el solvente que se está usando, dado que según él varían las velocidades. Así fenol-agua y alcohol-agua necesitan menor duración que butanol-acético-agua.

En general puede decirse que para los primeros se obtiene buena separación a las 24 horas mientras que para el segundo es cada vez más satisfactorio a medida que nos aproximamos a las 40 horas, tiempo que consideramos como el más conveniente para este solvente. En ciertos casos y para determinaciones de amino-ácidos

de Rf muy bajo, hemos llegado hasta 4, 5 y 7 días.

Dado el uso que le hemos dado al alcohol amílico, la duración del cromatograma con este solvente no debe bajar de 5 días y en general más.

Revelador - Para conocer la posición ocupada por los amino-ácidos durante la corrida, se humedece con una solución de ninhidrina mediante un pulverizador, el papel previamente secado en estufa hasta eliminar todo el solvente. Debe cuidarse que la solución se distribuya uniformemente sin empapar el papel y además la operación debe realizarse lo más rápidamente posible para evitar que se distorsionen las manchas.

La ninhidrina la hemos usado en dos soluciones: al 0,1% en n-butanol saturado con agua y al 0,2% en propanol al 90% con 1% de ácido acético. Preferimos la segunda.

Dejamos secar el papel al aire y luego lo calentamos en estufa de agua en ambiente con vapor de agua a 80°C durante 5 minutos.

La coloración que presentan las manchas después de revelado el cromatograma se desvanece con el tiempo; es por eso que debe marcarse la posición de las manchas con lápiz inmediatamente después de reveladas.

Para conocer la ubicación de los amino-ácidos sin modificarlos, como sucede cuando se usa ninhidrina, es conveniente pulverizar sobre el papel I₂ en solución alcohólica o mejor aún sublimar una pequeña cantidad de I. El amino-ácido toma durante un cierto tiempo un color característico, pardo amarillento, que permite marcarlo; luego con un ligero calentamiento se elimina el yodo y se puede recortar la mancha, disolverla y volver a desarrollar cromatográficamente con otros solventes en mono o bidimensional.

Determinación de Rf - Para la cromatografía en papel ha sido introducido en lugar del R, constante que no es medible como en

columna, otra denominada Rf que se define:

$$R_f = \frac{\text{movimiento de la mancha}}{\text{movimiento del frente líquido}}$$

o sea practicamente si: A es el centro del área mojada con la solución a desarrollar

B centro de la mancha final

y C límite a que llegó el solvente

$$R_f = \frac{AB}{AC}$$

Previo al análisis de los hidrolizados determinamos los Rf de los amino-ácidos puros en los solventes que pensábamos usar.

Volvemos a repetir aquí algunos reparos respecto del valor que posee los Rf como dato absoluto para la determinación de incógnitas.

Los factores que intervienen en la distribución de los amino-ácidos sobre el papel no son todavía bien conocidos y sólo se han podido seguir las variaciones que provocan algunos de ellos y aún esos son por ahora nada más que datos no generalizados por ninguna regla. Es por eso que quien trabaje en cromatografía en papel deberá determinar su propia tabla de valores de Rf, poniéndose en las condiciones más aproximadas a las del análisis. No se puede por lo tanto tomar como dato aplicable directamente el dado por los autores, puesto que en general no se aclara en que condiciones fué obtenido y de todos modos difícilmente se ajustarían a las nuestras. Pero no hay que olvidar que si bien su valor puede variar a veces considerablemente, el orden, la distribución relativa de los amino-ácidos se mantiene y puede por lo tanto servirnos como guía.

Pero de su determinación es casi imposible prescindir pues es la única manera de saber como se distribuirán los amino-ácidos de una mezcla en el papel.

Nosotros hemos procedido a determinar primero los Rf de cada amino-ácido por separado y luego los de varios amino-áci-

dos mezclados elegidos convenientemente.

Factores que influyen sobre la constancia del Rf .- De todos los factores que afectan la reproducibilidad de los Rf el más difícil de controlar ajustadamente ha sido la temperatura. Utilizamos un termostato que nos aseguraba dentro de cierto margen la temperatura requerida. La temperatura en las cámaras la leíamos varias veces con un termómetro al grado. Así debimos determinar los Rf a varias temperaturas, aprovechando las condiciones ambientales para estar dentro del margen cuando se procediera con las incógnitas.

Debemos hacer notar que cuando se analizaron los hidrolizados acompañados de mezclas de comportamiento bien conocido que nos servían de referencia, dejamos de controlar la temperatura, puesto que ya no nos interesaba conocer su valor, pero siempre se trató de mantener las cámaras al reparo de bruscas variaciones del ambiente para disminuir su influencia sobre la saturación de la atmósfera por los solventes dentro de la cámara.

Como han observado CONSDEN y colab.(5) cuanto mayor sea la diferencia entre la temperatura de trabajo y la temperatura crítica de solución solvente-agua, tanto menos sensibles serán las velocidades a los cambios de temperatura. En el sistema fenol-agua el aumento de temperatura aumenta la miscibilidad y la velocidad de movimiento de las bandas. Sin embargo aunque los coeficientes absolutos de partición pueden ser grandemente cambiados, la relación de coeficientes de partición de los respectivos amino-ácidos permanece casi inalterada.

Cuanto más poroso sea el papel mayores serán las velocidades. Durante todo el trabajo no sólo debe usarse el mismo tipo de papel sino también cuidar que las tiras (caso de monodimensionales) se corten teniendo en cuenta la dirección de máquina, fibra del papel, etc. como ya lo hemos señalado.

La homogeneidad del papel se verificará observando la línea

del frente del solvente.

El punto de partida de los amino-ácidos no debe estar demasiado lejos de la fuente del solvente,

La razón del solvente a fase estacionaria varía a diferentes niveles de papel y aumenta progresivamente cuanto más corta sea la distancia a la cubeta. Esta distribución es perturbada tanto por interrupción del flujo del líquido como por la acumulación al final de la tira.

Como resultado de la distribución del solvente mientras mayor sea la distancia entre la cubeta y el punto de partida del amino-ácido, más pequeño será el R_f . Nuestro punto de partida se encontró siempre entre 1 y 3 cm. de la superficie del líquido y para esta distancia que llamaremos normal, la variación es inapreciable.

El papel puede estar sobre o infra-saturado de acuerdo al estado de la atmósfera; es necesario asegurarse que esta se encuentre saturada al iniciar el cromatograma. La evaporación del solvente absorbido en el papel, por estar en comunicación con el ambiente, determina un aumento del valor del R_f . Por eso debe asegurarse que las cámaras tengan un buen cierre.

La cantidad de amino-ácido presente en la mezcla no tiene efecto apreciable sobre el R_f puesto que, si bien el tamaño de la mancha que se obtiene depende de esa cantidad, la distancia para calcular el R_f se mide siempre desde el centro de "gravidad" de la mancha.

Según indican los autores sólo la presencia de sustancias extrañas alterará el orden de las manchas en la tira.

Nosotros no realizamos experiencias al respecto limitándonos a algunas para observar la influencia de las sales y de estas en especial el $ClNa$. Esta sal podía estar presente en el hidrolizado si, por insuficiente eliminación del ácido usado en la hidrólisis, nos veríamos obligados a neutralizar.

Así observamos que a partir de una concentración del 2% de ClNa en la solución mezcla, las manchas se presentan con formas irregulares, más estiradas en la dirección del avance del frente, su color más tenue y la mancha es borrosa. Además el papel se "moja" más de lo usual durante el cromatograma.

Todos estos efectos se hacen más evidentes con ClNa 5%.

Se ha indicado que para obviar esos inconvenientes debe impregnarse el papel con ClNa, lavándolo con solución saturada y usando el solvente equilibrado con solución saturada de sal en vez de agua.

Esta modificación mejora el cromatograma cuando la concentración salina inorgánica es elevada en relación a los amino-ácidos pero no elimina, naturalmente, el inconveniente de la débil coloración de las manchas y en general quita nitidez al cromatograma. De manera que si la concentración salina no sobrepasa el 3% no consideramos conveniente emplear esta modificación. En nuestro trabajo no fué necesario utilizarla.

Dado el tipo de sustancias ionizables a las cuales pertenecen los amino-ácidos deberá tenerse en cuenta el pH de la solución en estudio ya que éste puede afectar tanto la separación como la secuencia de los componentes.

Las formas ionizadas de los amino-ácidos dicarboxílicos o básicos son más solubles en la fase acuosa que en la fracción orgánica. Por lo tanto en medio ácido los R_f de ácidos como el aspártico y glutámico aumentarán y los de las bases: arginina, lisina e histidina disminuirán.

Los ácidos monoamino-monoarboxílicos son poco influenciados por los ácidos diluídos.

Nuestras experiencias se realizaron en medio de ligera acidez clorhídrica como la que podía quedar en los hidrolizados,

Para eliminar la influencia de ácido libre procedimos a neutralizar las soluciones una vez aplicada la gota al papel,

con vapor de HONH_4 2N durante 2 minutos. No conviene neutralizar directamente la solución puesto que algunos amino-ácidos (cistina, tirosina, triptofano) son insolubles o poco solubles en soluciones neutras. El papel se deja al aire un cierto tiempo, después de neutralizado, antes de iniciar la corrida.

Procediendo de esta manera se obtuvieron siempre resultados comparables puesto que la presencia de otros iones en pequeña proporción respecto de los amino-ácidos no altera apreciablemente a los R_f de estos. Hay que notar empero que la velocidad de un dado amino-ácido es algo menor en presencia de otros amino-ácidos que cuando está solo.

Variación del valor de los R_f con la temperatura.- Realizamos primeramente la determinación de los R_f y observamos su variación con la temperatura con el fin de verificar si había alteración en el orden de los amino-ácidos sobre el papel.

Con cada amino-ácido puro preparamos una solución 0,0003 Molar en agua destilada, poniendo sobre el papel una gota de 5 μl y dejando correr el solvente durante 11 horas solamente, puesto que no habiendo separación sólo nos interesaba que el amino-ácido recorriera una cierta distancia; un tiempo mayor hubiese sido inconveniente dada la necesidad que teníamos de controlar asiduamente la temperatura y mantenerla constante en el interior de la cámara. Cada determinación se hizo por duplicado, cuidando que el papel fuese más largo que la distancia que recorrería el solvente y que la duración de la cromatografía fuese siempre la misma.

Los papeles arrollados en cilindro eran idénticos y el volumen del solvente en la cubeta siempre el mismo con la línea de partida a la misma altura. (Cuadro n°3), (Cuadro n°4)

Cuadro n°3 - Tabla de los valores del Rf de los amino-ácidos con fenol-agua como solvente, a diferentes temperaturas.

Duración de cada cromatografía: 11 horas 15 minutos.

Distancias recorridas por el solvente durante dicho tiempo desde la línea de partida, para t :

13-16°C = 12,6 cm.

18-20°C = 13,5 "

22°C = 14,3

24-25°C = 15 cm.

amino-ácidos	temperatura en la cámara			
	13-16°	18-20°	22°	24-25°
prolina	0,89	0,88	0,88	0,90
fenilalanina	0,87	0,87	0,88	0,89
isoleucina	0,87	0,84	0,86	0,88
leucina	0,85	0,83	0,85	0,87
metionina	0,80	0,79	0,80	0,79
valina	0,79	0,77	0,77	0,79
ClH-Triptofano	0,77	0,75	0,76	0,78
ClH-histidina	0,68	0,65	0,68	0,68
β-alanina	0,64	0,62	0,65	0,65
ClH-tirosina	0,61	0,60	0,61	0,63
alanina	0,61	0,61	0,62	0,62
ClH-arginina	0,59	0,56	0,57	0,60
treonina	0,50	0,48	0,49	0,52
ClH-lisina	0,46	0,45	0,44	0,47
glicina	0,42	0,37	0,40	0,44
serina	0,35	0,31	0,32	0,34
ácido glutámico	0,30	0,26	0,29	0,29
ClH-cistina	0,26	0,25	0,26	0,26
ácido aspártico	0,23	0,22	0,21	0,20

Cuadro n° 4 - Tabla de los valores del Rf de los amino-ácidos con BuOH-AcOH-H₂O como solvente, a diferentes temperaturas.

Duración de cada cromatografía: 12 horas.

Distancias recorridas por el solvente durante dicho tiempo desde la línea de partida, para t:

18-20°C = 14,2 cm.

22-23°C = 15,6 cm.

23-25°C = 16,4 cm.

amino-ácidos	temperatura en la cámara		
	18-20°	22-23°	23-25°
leucina	0,75	0,76	0,77
isoleucina	0,71	0,73	0,77
triptófano	0,58	0,60	0,63
metionina	0,54	0,56	0,57
valina	0,52	0,56	0,56
tirosina	0,44	0,46	0,46
prolina	0,36	0,39	0,40
alanina	0,30	0,32	0,34
treonina	0,24	0,25	0,25
serina	0,20	0,20	0,22
glicina	0,15	0,18	0,20
arginina	0,12	0,16	0,17
histidina	0,06	0,08	0,09
ácido glutámico	0,06	0,09	0,11
ácido aspártico	0,04	0,08	0,09
lisina	0,03	0,05	0,06
cistina	0,02	0,03	0,05
fenilalanina	0,73	0,74	0,76

Debe notarse que la velocidad no es constante a lo largo del espacio recorrido sino que va disminuyendo a medida que el frente se aleja de la fuente del solvente.

Determinación del límite de sensibilidad de los amino-ácidos para la reacción de coloración con ninhidrina.- A fin de conocer el límite de sensibilidad de los diversos amino-ácidos para con la ninhidrina en las condiciones de la cromatografía, realizamos los siguientes ensayos.

Partiendo de soluciones que contenían 0,025 milimoles por ml de amino-ácido cada una, fuimos diluyendo sucesivamente y de cada dilución colocamos, sobre el papel, una gota cuidadosamente medida. Esta se desarrolló durante algunas horas ya sea en fenol ya sea en butanol. La temperatura de la cámara se mantuvo entre 22° y 24°C. La solución de ninhidrina empleada en el revelado era al 0,1% en n-BuOH saturado con agua a esa temperatura. El cromatograma de algunas horas se secaba al aire y luego se calentaba en estufa a 90° durante 5 minutos, Las manchas se observaron con fuerte luz artificial reflejada.

Una vez orientados por experiencias preliminares entre que límites se debía operar, realizamos por duplicado cromatogramas definitivos en hojas de papel por separado con series de diluciones con intervalos próximos.

El resultado se expresa en gammas de amino-ácido puro existente en la gota de solución y corresponde a la última dilución que desarrollada dió una mancha de coloración perceptible. (Cuadro n°5)

Agregamos a la tabla el color de la mancha que puede servir como elemento concomitante de identificación, pero que salvo en muy contados casos, (prolina, por ejemplo) nunca debe ser el único.

Hemos observado a través de todas las experiencias que la imperfecta eliminación del solvente durante el secado, comunica a las manchas una tonalidad característica del mismo.

También verificamos que como lo indican PRATT y AUCLAIR cuando se revela la gota absorbida sobre el papel previamente al corrimiento con el solvente, la sensibilidad es algo mayor que cuando se procede al revelado después de desarrollado el cromatograma. Este es un valor límite para la ninhidrina pero no es aplicable a la cromatografía.

Cuadro nº5 - Mínima cantidad de aminoácido que reacciona con la ninhidrina en la cromatografía en papel.

amino-ácido	gammas	color de la mancha
prolina	1,5	amarillo
fenilalanina	6,2	pardo claro
isoleucina	1,2	púrpura
leucina	1,2	púrpura
metionina	1,5	púrpura
valina	0,6	púrpura
triptofano	3,2	pardo amarillento
ClH-histidina	25,0	pardo
is- alanina	0,6	rojo azulado
tirosina	4,5	pardo rojizo
alanina	0,6	púrpura
ClH - arginina	4,0	azul purpúreo
treonina	3,2	púrpura claro
ClH-lisina	4,4	rojo
glicina	0,3	rosado
serina	0,9	rojo pardo
ácido glutámico	0,3	rojo purpúreo
ClH-cistina	12,0	rojo cereza
ácido aspártico	0,8	rojo azulado

Ensayos de separación de mezclas artificiales - Cromatografía monodimensional- Conocidos los valores de Rf de am.-ác. y basándonos en ellos preparamos una serie de soluciones conteniendo de 5 a 7 am.-ác. con el fin de observar las posibilidades de resolución en cada caso, controlar los Rf en mezclas y elegir la composición de la solución que nos habría de servir de testigo en el estudio de los hidrolizados.

La concentración de las soluciones era de 0,004 milimoles por ml. para cada amino-ácido. Elegimos esta concentración como la óptima para el caso, de acuerdo a lo observado en los ensayos para obtener el límite de sensibilidad. (Cuadro nº6) (Cuadro nº7)

Cuadro nº6 - Resolución de mezclas artificiales mediante cromatogramas monodimensionales con fenol-agua como solvente.

<u>Experiencia nº1</u>		Observaciones
amino-ácidos	Rf	
<u>mezcla nº1</u>		duración de la corrida: 24 hs. recorrido del solvente: 26,4 cm.
Prolina	0,88	Se distinguen netamente las 6 manchas. La separación es muy buena. (como era previsible dada la diferencia entre los Rf de los amino-ácidos elegidos)
triptofano	0,73	
alanina	0,58	
treonina	0,48	
serina	0,30	
cistina	0,23	
<u>mezcla nº2</u>		
leucina	0,84	leucina y valina están uno a continuación de otro, el resto bien separado.
valina	0,78	
tirosina	0,60	
lisina	0,41	
ácido aspártico	0,21	
<u>mezcla nº3</u>		
isoleucina	0,86	buena separación
metionina	0,78	
alanina	0,58	
glicina	0,39	
cistina	0,24	
<u>Experiencia nº2</u>		duración: 28 hs. recorrido: 27,5 cm.
<u>mezcla nº4</u>		
leucina	0,85	muy buena separación
valina	0,78	
tirosina	0,62	

./.

amino-ácidos	Rf	Observaciones
treonina	0,49	
glicina	0,42	
serina	0,33	
ácido glutámico	0,25	
<u>Experiencia nº3</u>		duración: 21 hs
mezcla nº5		recorrido: 22,6 cm.
leucina	0,81	leucina y triptofano que se encuentran uno a continuación de otro se pueden distinguir por la diferencia de color; más difícil es diferenciar por el color aspártico y cistina la misma mezcla durante 48 hs (con mecha) se consigue aumentar la separación, sobre todo en los inferiores.
triptofano	0,81	
alanina	0,60	
treonina	0,47	
glutámico	0,26	
ác. aspártico	0,22	
cistina	0,22	
<u>Experiencia nº4</u>		duración: 30 hs
mezcla nº6		recorrido: 28,7 cm.
prolina	0,88	diferenciables por el color
leucina	0,88	
valina	0,77	
histidina	0,65	
tirosina	0,59	
lisina	0,42	
ácido glutámico	0,25	
mezcla nº7		
fenilalanina	0,83	
metionina	0,83	
arginina	0,55	
lisina	0,43	
glicina	0,40	
cistina	0,23	

Cuadro n° 7 - Resolución de mezclas artificiales mediante cromatogramas monodimensionales con butanol-ácido acético-agua como solvente.

<u>Experiencia n°5</u>		Observaciones
amino-ácidos	Rf	duración: 20 hs.40 min. recorrido: 27,5 cm.
mezcla n°8		
leucina	0,76	buena separación
trptofano	0,59	
valina	0,53	
alanina	0,31	
glicina	0,18	
mezcla n°9		
isoleucina	0,75	buena separación
metionina	0,54	
prolina	0,39	
arginina	0.16	
cistina	0.06	
mezcla n°10		
leucina	0,75	buena separación
metionina	0,52	
alanina	0,32	
glicina	0,20	
cistina	0,05	
<u>Experiencia n°6</u>		duración: 41 hs. 30 min. recorrido: 36,8 cm.
mezcla n°11		
isoleucina	0,70	buena separación
alanina	0,32	
treonina	0,25	
serina	0,20	
arginina	0,15	
ácido glutámico	0,10	
cistina	0,03	

<u>Experiencia nº7</u>		Observaciones
amino-ácidos	Rf	duración: 21 hs. 30 min. recorrido: 22,7 cm.
mezcla nº12		
leucina	0,76	
valina	0,54	
tirosina	0,45	buena separación
serina	0,21	
ácido aspártico	0,06	
cistina	0,04	
mezcla nº13		
fenilalanina	0,71	
triptofano	0,58	
tirosina	0,43	
prolina	0,36	
histidina	0,08	
lisina	0,05	

De entre estas mezclas que se resolvían netamente en todos sus componentes se eligieron las composiciones de aquellas que habían de servirnos como testigos para el análisis de los hidrolizados ya citados anteriormente.

Numerosas mezclas, que no transcribimos, fueron experimentadas juntamente con las arriba tabuladas, para darnos cuenta de las posibilidades de resolución e identificación de los componentes que según el caso se presentaban. Podemos indicar que todas las que con un desarrollo monodimensional de 24 hs. de duración no se lograban separar lo suficientemente para identificarlos (este es el caso de los am.ács. de bajo Rf que se presentan agrupados en una mancha única alargada), pudieron serlo en cromatogramas monodimensionales con mecha de más de 48 hs. o bien en cromatogramas bidimensionales de 48 hs. totales de duración

Hemos encontrado únicamente dos casos que no han podido ser resueltos con el par de solventes fenol-agua y butanol-etanoico

-agua, se trata de los grupos formados por valina-metionina y por leucina-isoleucina. Los componentes de ambos grupos pudieron ser separados uno de otro mediante un desarrollo monodimensional con alcohol amílico-etanoico-agua de siete días de duración.

Se realizaron también análisis cromatográficos de hidrolizados de caseína con resultados satisfactorios.

Ensayos de separación de mezclas artificiales-Cromatografía bidimensional- Este tipo de cromatografía en papel es la más conveniente para analizar una mezcla de muchos componentes.

Para ello se deposita una gota de solución de los am.-ács. en uno de los ángulos de una hoja de papel de filtro cuadrada o rectangular, de 30 a 40 cm. de lado, a distancia conveniente de los bordes. Una vez seca el área mojada por la gota de solución, se efectúa el desarrollo con un solvente en una dirección hasta que aquél cubra toda la hoja. Se retira la hoja de la cámara y, luego de eliminado todo el solvente por secado al aire o en estufa, se vuelve a arrollar el papel en cilindro, pero de tal manera que al colocarlo de nuevo en la cubeta un segundo solvente distinto del anterior, recorra el papel en una dirección que forme un ángulo de 90° con la recorrida por el primer solvente. Es decir que cada uno de los solventes recorre uno de los lados del ángulo en cuya bisectriz fué depositada la gota. Luego que el segundo solvente ha ascendido por el papel hasta una altura juzgada suficiente, se lo extrae de la cámara, se lo seca y revela con ninhidrina como es habitual. Aparecerán así distribuidas por toda la hoja las manchas correspondientes a los amino-ácidos.

La mejoría introducida por este procedimiento reside en que la separación efectuada por el primer solvente entre los am.-ács. es aumentada por el segundo. En efecto, mientras que la utilización de ambos solventes individualmente en forma monodimensional, durante el mismo tiempo empleado en el desarrollo bidimensional, dejaría siempre grupos sin resolver en componentes, la

combinación de ambos consigue, cuando han sido bien elegidos, una separación completa. Para elegir un par de solventes para un caso general, se compararán los R_f de los amino-ácidos en ambos solventes. Se tendrá un par de solventes de buena capacidad separadora cuando, construyendo una tabla donde a cada amino-ácido se le asigne uno de los valores posibles, estos difieran entre sí en más del 10 % de su valor. También se puede determinar gráficamente. Para ello los valores de los R_f de los amino-ácidos en un solvente son colocados como ordenadas contra los R_f con el otro solvente como abscisas. Se tendrá así una serie de puntos que nos señalarán la posición de las manchas en el cromatograma desarrollado, si ambos solventes recorren la misma longitud de papel. Observando entonces en el gráfico la distribución de los puntos sabremos así de antemano cuales amino-ácidos aislará y cuales no, el par en cuestión.

Para identificar los amino-ácidos en un bidimensional podemos recurrir al mismo gráfico y por las posiciones relativas de las manchas comparadas en el gráfico y en el cromatograma y medición de los R_f de cada mancha en este último, reconocerlos.

Esto se puede confirmar haciendo una mezcla artificial de los amino-ácidos hallados, resolverla bidimensionalmente en las mismas condiciones y comparar con el original.

También es interesante seguir los desarrollos parciales monodimensionales simultáneamente al desarrollo bidimensional.

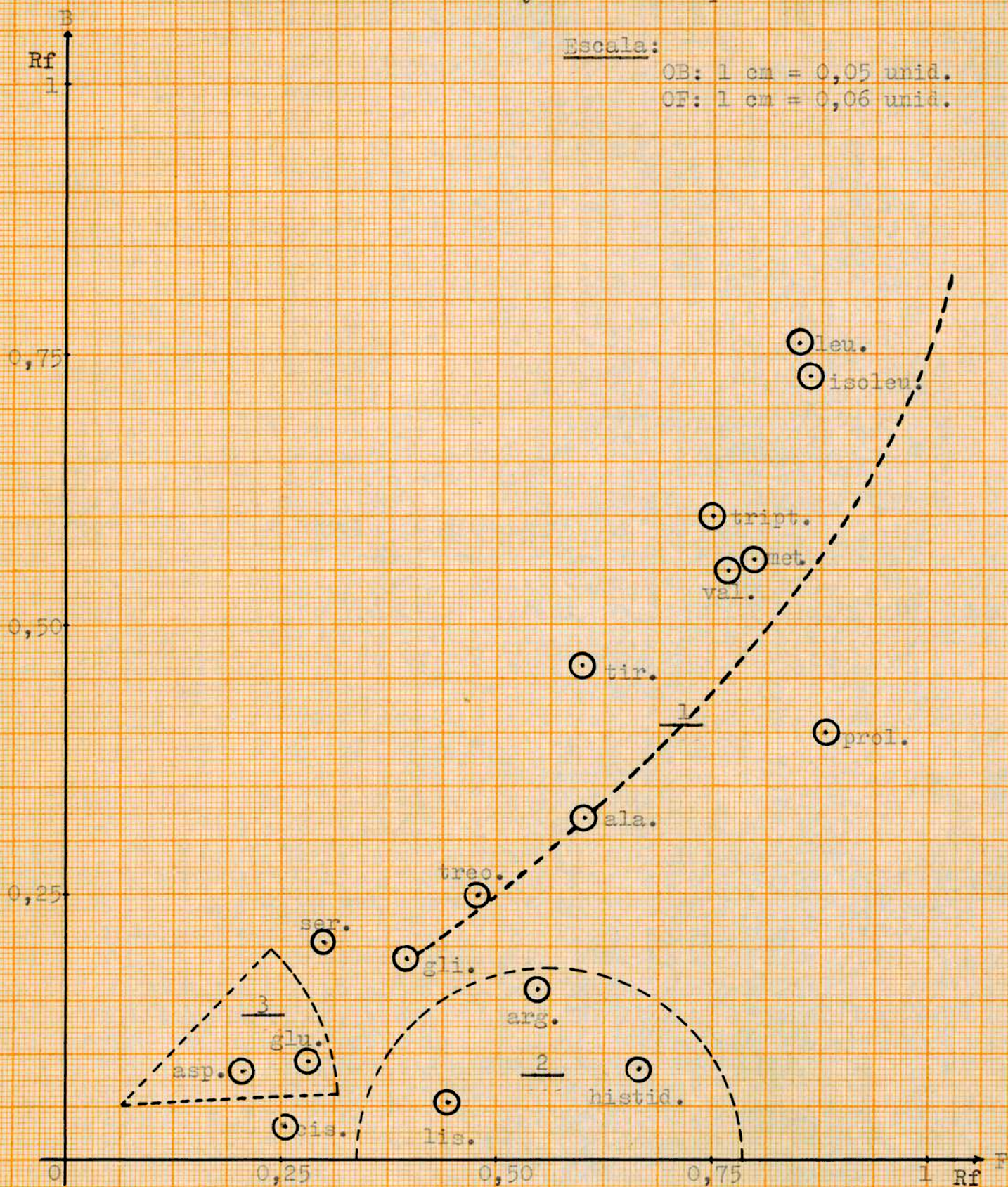
Para esto colocamos una gota en cada uno de los dos ángulos inferiores del papel; las desarrollamos con el mismo solvente y una vez seco el papel, cortamos la tira donde se ha desarrollado una gota, prosiguiendo el bidimensional con la otra.

Además se puede colocar una gota que contenga una solución control para certificar la identidad de ciertos amino-ácidos.

La ubicación de los amino-ácidos en el papel dependerá de los solventes usados. Así en el par fenol-butanol, glicina y sus homólogos de cadena lineal se encuentra sobre una curva

Gráfico de las posiciones ocupadas en el papel por los amino-ácidos usando como solventes el par fenol-agua y butanol-etandico-agua.-Cromatograma bidimensional.

El butanol ha recorrido mayr distancia que el fenol.



Nota: 1 : Curva según la cual se disponen los homólogos de cadena li-
 real de glicina
2 : Zona de los am.-ács. básicos
3 : Zona de los am.-ács. ácidos

regular. Un homólogo de cadena ramificada provoca una ligera desviación de esta curva y una disminución de velocidad.

Esta disposición parece conservarse cualesquiera sean los solventes usados. La presencia de un grupo hidroxilo disminuye mucho los Rf en fenol y menos en butanol. Así serina, tirosina e hidroxiprolina se encuentran más a la izquierda de la vertical y un poco por debajo de la horizontal que pasa por el correspondiente amino-ácido no substituído.

Las bases, en cambio, son mucho más lentas en butanol que en fenol y por lo tanto se encuentran en la base del diagrama. (butanol es el primer solvente) - Los ácidos que tienen baja velocidad tanto en fenol como en butanol, siendo menor en este último, se encuentran en el ángulo inferior, no muy lejos del punto de partida.

Cromatografía en papeles de filtro circulares - Entre las maneras de realizar un cromatograma ensayadas por nosotros, se encuentra la técnica propuesta por RUTTER (20) que, si bien no utilizada por nosotros para el análisis de los hidrolizados, la creemos merecedora de una breve descripción por su utilidad en ciertos casos y extremada sencillez.

Se usa, en lugar de hojas o tiras de papel, un disco de papel de filtro de los que se utilizan habitualmente en química analítica. En este disco se corta un radio de 2 mm de ancho dejando la tirita así obtenida unida al centro y doblándola hasta dejarla perpendicular al disco; luego se la corta a unos 2 cm. del punto de unión.

En el centro del disco se absorbe la gota de la solución a analizar. Una vez seco se coloca el papel sobre uno de los platos de una caja de Petri en la cual previamente se ha vertido el solvente, de tal manera que el papel se apoye en los bordes sosteniéndose, mientras la "colita" se sumerge en el líquido. Se cubre con otro plato de Petri del mismo diámetro que el

que contiene el solvente. Este, ascendiendo por la "colita" que sirve de mecha, se distribuye radialmente por el papel partiendo desde donde ha sido absorbida la solución. Cuando el solvente ha cubierto todo el disco de papel se lo seca y se revela.

El desarrollo tarda de 2 a 4 horas según el papel y el solvente usados.

Al revelar se observaron una serie de circunferencias concéntricas que corresponden a la distribución de los amino-ácidos según sus velocidades. La identificación se hace mediante R_f o por comparación con una mezcla conocida.

Dada la corta duración y el poco material necesario, esta modificación presenta indudables ventajas sobre todo para mezclas de no muy numerosos componentes, puesto que aquí, a la separación por diferencia de velocidades, se une el hecho de que a medida que la circunferencia formada por el amino-ácido aumenta de radio, se afina su trazo aumentando la nitidez.

Nosotros empleamos esta técnica para seguir las hidrólisis con bastantes buenos resultados, sobre todo tomando discos de mayor diámetro que los usuales.

También la utilizamos para estudiar rápidamente la posible utilización de nuevos solventes. Es indudable que la calidad de la separación de la cromatografía bidimensional no ha sido superada.

Capítulo IV

Aplicación de la cromatografía en papel al análisis de las proteínas aisladas de T. equinococcus

Con las experiencias preliminares expuestas en el capítulo anterior nos dispusimos a realizar el análisis cromatográfico de las diferentes proteínas aisladas de hidátide de *Tenia equinococcus*. Los cromatogramas se efectuaron sobre muestras obtenidas de hidrólisis ácidas y alcalinas, que se efectuaron según la técnica que se describe a continuación.

Hidrólisis ácida - Entre 200 y 240 mgs. de cada fracción proteica fueron hidrolizados con 5 ml. de ClH 5,5 N durante 48 horas ininterrumpidas. El ácido se eliminó evaporando repetidas veces a presión reducida, agregandose 5 ml de agua destilada luego de cada evaporación, interrumpiendo cuando el destilado no dió más reacción ácida apreciable.

El residuo, luego de agregarle 4 ml de agua destilada, se filtró para retener la humina formada.

El líquido filtrado fué decolorado con carbón adsorbente Kodak. Este se trató previamente de la siguiente manera: 0,5 gr. de C se agitaron durante una hora con 10 ml AcOH 5% (v/v); una vez filtrado y lavado bien con agua destilada, el C en torta húmeda se pasó a la solución del hidrolizado que se agitó continuamente durante 1 hora.

Filtrada la suspensión se obtuvo una solución incolora a

la cual se le incorporaron los sucesivos lavados.

La solución así obtenida se evaporó a presión reducida en baño de agua caliente hasta casi sequedad, llevándose a sequedad en desecador al vacío con Cl_2Ca .

Una vez seca se pesa y se disuelve en 4 ml de solución de alcohol isopropílico al 10%. Utilizamos el alcohol isopropílico porque es un eficaz conservador y no causa esterificación en estas condiciones.

La decoloración con C en las condiciones indicadas adsorbe fenilalanina y tirosina. (PARTRIDGE.-21) De acuerdo a las indicaciones de este autor, tratamos el C utilizado en la decoloración con una solución al 20%(v/v) de AcOH conteniendo 5%(p/v) de fenol, agitando suavemente durante 30 minutos. Se filtra y al filtrado se le extrae el fenol en un separador con eter etílico. (2veces)

La solución ligerísimamente coloreada se concentra a presión reducida hasta sequedad. El residuo se trata con pequeñas porciones de agua destilada helada para separar la fenilalanina disolviéndose el nuevo residuo en agua tibia. (tirosina)

A las soluciones de fenilalanina y tirosina se les agregó el 10% de su volumen de isopropanol.

Las tres soluciones del hidrolizado así obtenidas se usaron como soluciones madre de cada fracción proteica conservándose en heladera.

Hidrólisis alcalina - 270 mgs de cada fracción proteica fueron hervidos con refrigerante a reflujo con 20 ml de $(\text{HO})_2\text{Ba}$ al 14% a 125°C en un baño de aceite durante 24 horas. El Ba^{++} se eliminó con un ligero exceso SO_4H_2 1N. El precipitado de SO_4Ba es lavado varias veces con pequeñas porciones de agua caliente conteniendo unas gotas de ácido acético. Todos los filtrados reunidos, son concentrados hasta pequeño volumen al vacío y luego evaporados a sequedad en un desecador sobre Cl_2Ca también al vacío.

La película seca una vez pesada se trata idénticamente a la obtenida por la hidrólisis ácida.

a, - Cromatografía del hidrolizado de las proteínas separadas del líquido hidático.

Se realizó por separado el análisis de las proteínas obtenidas a pH 3,3 y 3,9 efectuándose cromatogramas mono y bidimensionales.

Cromatogramas monodimensionales del hidrolizado de la proteína separada a pH 3,3 - Amino-ácidos identificados en el hidrolizado ácido. Realizamos una primera observación haciendo un desarrollo cromatográfico monodimensional de 4 gotas cada una de las cuales correspondía a: 1) solución de la mezcla testigo; (leucina, metionina, alanina, glicina, cistina); 2) solución del hidrolizado; 3) solución obtenida tratando con agua fría el residuo obtenido eluyendo el C decolorante con AcOH y fenol; 4) solución obtenida disolviendo después del tratamiento anterior el residuo en agua tibia.- El corrimiento duró 23,30 horas, con el solvente: BuOH-HcOH-H₂O.

Revelado el papel, se observó en el recorrido correspondiente a la gota n°2 una serie de manchas que ordenadas según R_f decrecientes presentaban las siguientes características: una mancha de color intenso y de contorno mayor que las del testigo, correspondiendo exactamente a la de leucina del testigo; otra correspondiendo a metionina y luego desde una posición superior a alanina hasta la correspondiente a cistina una serie de manchas seguidas, de variados colores y tonalidades que en partes se superponían unas a otras. (esquema n°1)

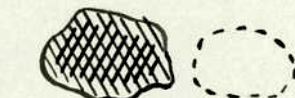
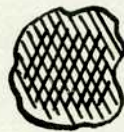
Las otras dos soluciones (gotas 3 y 4) que contenían lo eluido del C adsorbente, presentaban una sola mancha intensa cada una. En el recorrido correspondiente a la gota n°3 apare-

ESQUEMA N°1

frente del solvente
22,9 cm



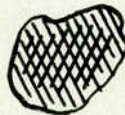
leucina



fenilalanina



metionina



prolina



tirosina



alanina



glicina



cistina



trazas

1

2

3

4

Esquema de un
cromatograma
monodimensional
en BuOH-AcOH-
-H₂O
del hidroliza-
do de proteína
separada a
pH 3,3

Fig N°1

cía una mancha en la parte superior del cromatograma un poco inferior a la posición de la leucina y en el de la gota nº4 se encontraba una mancha hacia la mitad de la distancia recorrida por el frente del solvente. El cromatograma de la primera solución (gota nº3) presentaba también una debilísima coloración en correspondencia con algunas manchas del hidrolizado (gota nº2) y con la de la solución de la gota nº4. La tonalidad de estas últimas manchas presentan la característica de trazas.

Evidentemente el C además de adsorber fenilalanina y tirosina también adsorbe trazas de otros amino-ácidos.

Como primer resultado tenemos por lo tanto lo siguiente: la proteína en cuestión está compuesta con un número bastante elevado de amino-ácidos con predominio de los de bajo Rf.

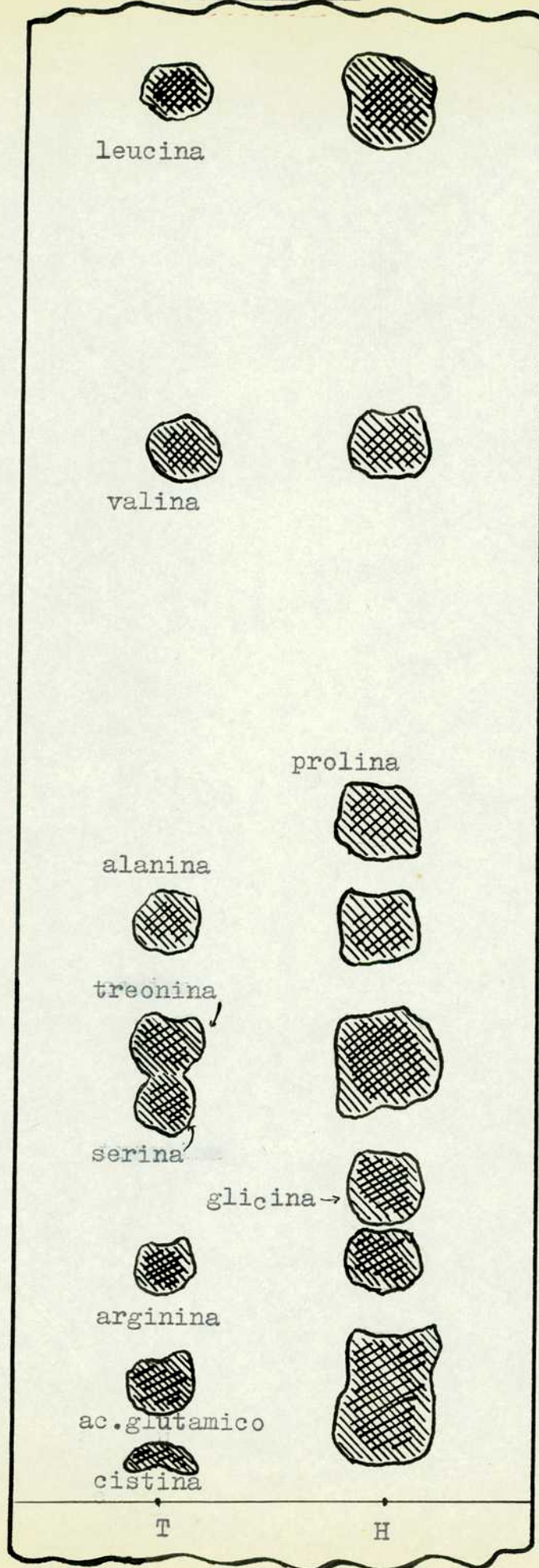
En cuanto a la individualización de amino-ácidos podemos ya contar con las leucinas y valina o metionina o ambas. La proximidad de sus Rf es tal dentro de esos grupos que no nos permite decidir cual o cuales se encuentran presentes en un monodimensional de esa duración, ya que si en el testigo hubiésemos puesto isoleucina y valina en vez de leucina y metionina la posición de las manchas no habría sido perceptiblemente diferente. Además, dada la capacidad de adsorción selectiva del C decolorante indicada por PARTRIDGE (21) y la medición de los Rf, podemos indicar la presencia de fenilalanina y tirosina.

Esto se confirmó separadamente comparando ambas manchas con soluciones testigo de cada uno de estos amino-ácidos.

Igualmente el color característico de la mancha y su posición nos indica la existencia de prolina. Sobre los otros amino-ácidos presentes no podemos hacer por el momento nada más que suposiciones.

Un cromatograma similar pero de 44 horas de duración presenta una mayor separación en la parte inferior. La comparación con los testigos más que los Rf, nos indicaría la presencia de

ESQUEMA N°2



Esquema de un cromatograma
monodimensional de 44 hs
en BuOH-AcOH-H₂O del hi-
drolizado de proteína
separada a pH 3,3.
-frente del solvente 32,5 c

Esq. N° 2. Cromat. desc. de 44 hs en BuOH-AcOH-H₂O del hidrolizado de proteína, a pH 3,3. Frente del solvente 32,5 c.

alanina y glicina.

Con el fin de agotar las posibilidades del BuOH en cromatogramas de menos de 48 horas ensayamos nuevas mezclas testigo (leucina, valina, alanina, serina, treonina, arginina, ácido glutámico, cistina). Los cromatogramas muestran ahora, aparte de los amino-ácidos ya indicados, dos grupos de manchas que corresponderían a serina y o treonina y arginina. Pero entre ácido glutámico y cistina hay una mancha única que no permite diferenciación. (esquema nº2)

Queda entonces por certificar sobre la identidad de los amino-ácidos de Rf medio mediante una separación más neta y resolverlos inferiores.

Para lo primero usamos como solvente el fenol-agua en el cual los amino-ácidos tienen mayores velocidades y donde se presentan algunas alteraciones en la secuencia de los amino-ácidos con respecto a la en BuOH. Las observaciones en cromatograma de 24,36,48 horas nos mostraron una serie de manchas que se encontraban espaciadas a distancias más o menos regulares todo a lo largo del camino recorrido por el frente del solvente.

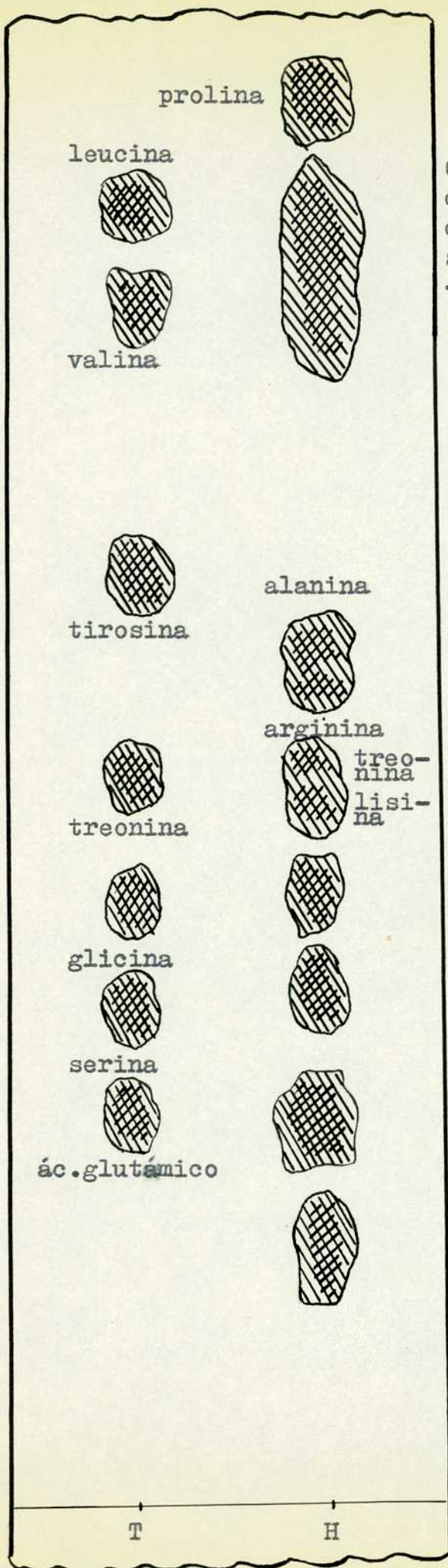
Se identificaron así por comparación con los testigos y de un cromatograma con otro, junto con las mediciones de los Rf, los siguientes amino-ácidos: prolina, leucinas, valina y/o metionina, un grupo formado por alanina y arginina, treonina, glicina, serina, ácido glutámico. Además notamos que la mancha de treonina, más alargada que la del testigo, incluye posiblemente otro amino-ácido de velocidad un poco inferior que por la situación relativa y por el Rf aproximado supusimos podría ser lisina. (esquema nº3)

Otra mancha alargada de Rf más bajo que el del ácido glutámico sugiere la existencia de ácido aspártico y cistina.

La ausencia de fenilalanina y tirosina en esta fracción de hidrolizado y su total adsorción por el C decolorante, como

ESQUEMA N°3

Cromatograma monodimensional
de 24 hs 15 m. en fenol-agua
del hidrolizado de proteína
separada a pH 3,3.
-frente del solv.27,5 cm-



Esq. n°3

lo demuestra su presencia en el líquido de elución del mismo, verificada desarrollando tanto en fenol como en butanol, quedó bien asentada.

Los cromatogramas en fenol dejaban ya pocas dudas sobre la identidad de la mayoría de las manchas obtenidas y, si bien estas dudas podían ser resueltas por la cromatografía bidimensional, gracias a los puntos de referencia conocidos, a fin de aprovechar al máximo las ventajas de la comparación directa con amino-ácidos testigos, decidimos realizar un largo desarrollo para separar en forma completa los amino-ácidos más lentos.

Efectuamos así cromatogramas de 5 a 7 días de duración con mecha que permitiría el continuo ascenso del solvente y eliminaría los amino-ácidos más veloces que momentaneamente no nos interesaban. El solvente elegido fué el BuOH en el cual los amino-ácidos en cuestión tienen una velocidad apropiada, inferior a la que tienen en fenol y superior a la que tienen en alcohol amílico. Si usáramos fenol se provocaría la acumulación de amino-ácidos en la mecha y si usáramos alcohol amílico sólo se conseguiría correrlos en bloque compacto a poca distancia del punto de partida.

Las experiencias así realizadas nos presentaron una serie de manchas perfectamente definidas. Para un papel de 35 cm. de longitud los amino-ácidos testigos que se encontraban en el mismo, después de un desarrollo de 7 días, iban desde prolina, el superior, hasta cistina, el inferior.

Mediante los testigos se reconocieron prolina, alanina, serina, treonina, arginina, ácido glutámico, ácido aspártico, lisina y cistina. (Esquema nº4)

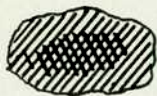
Para estos desarrollos se colocaron 10 μ l de solución en vez de 5 μ l.

Amino-ácidos identificados en el hidrolizado alcalino - El principal objeto de estas experiencias era la búsqueda de triptofano.

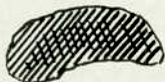
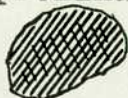
ESQUEMA N°4

mecha de papel
de filtro grueso

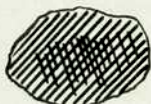
am. ács. de Rf alto



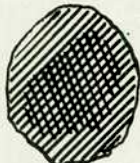
prolina



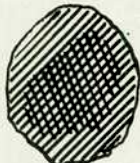
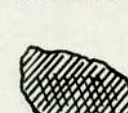
alanina



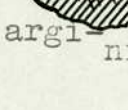
treonina



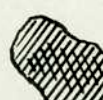
serina



argi- nina



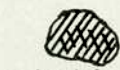
ac. glutámi-
co



ac. aspartico



lisina



cistina

H

T

Esquema reducido de un cromato-
grama de 7 días en BuOH-AcOH-
H₂O del hidrolizado de proteí-
na separada a pH 3,3.
-longitud del papel 35 cm-

Esq. N°4 - Esq. reducido de un crom. de 7 días en BuOH-AcOH-H₂O del hidrol. de P.L. 3,3, low salt paper

Desde el primer cromatograma monodimensional de 23 horas en butanol apareció una mancha de poca intensidad pero de color característico pardo amarillo entre leucina y valina; la perfecta correspondencia con el testigo no nos dejó duda sobre la existencia de triptofano.

Para reconocer el triptofano en cromatogramas usando el fenol como solvente, el tiempo de desarrollo debió ser mayor dado que el Rf de este amino-ácido es próximo a valina y a metionina. La diferente coloración facilita el reconocimiento.

Si comparamos las cromatografías obtenidas con hidrolizados ácidos y básicos puede decirse que a excepción hecha del triptofano los resultados eran concordantes.

En los hidrolizados básicos las manchas de treonina y sobre todo la arginina estaban muy disminuídas. Cistina sólo presentaba una mancha ligera muy esfumada. (Esquema n. 5)

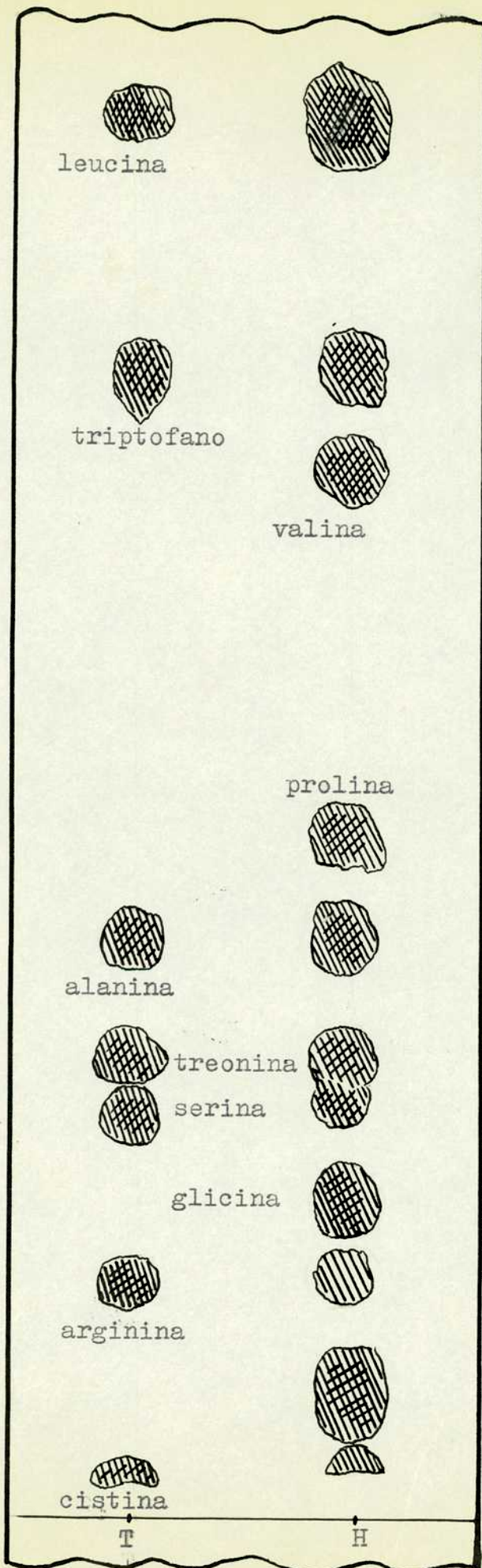
Cromatograma bidimensional de hidrolizados ácidos y básicos.

Poseyendo ya la certeza sobre la identidad de algunos de los amino-ácidos presentes, nos fué fácil sirviéndonos de la ubicación que estos tendrían en el bidimensional, identificar sin lugar a dudas todos los demás. Además con la separación más perfecta obtenida se vería si aparecería alguno aún no reconocido.

Realizamos los cromatogramas como ya se ha indicado. También hicimos correr en la misma hoja y para cada solvente un control monodimensional de una gota del hidrolizado y una de mezcla testigo, cortando la tira antes de pasar la hoja al otro solvente.

En esta forma y mediante la comparación con bidimensionales de mezclas artificiales hechos anteriormente, con los gráficos en papel milimetrado trazados con los valores de los Rf obtenidos en experiencias preliminares y la medición de las distancias, así como la observación de la posición relativa en el mismo papel, identificamos los siguientes amino-ácidos:

Exp. N° 5 - Cromatografía monodimensional del hidrolizado básico de la proteína de la piel. Solv. BuOH-AcOH-H₂O pH 3,3. Frente del solv. 32 cm.



leucina

triptofano

valina

prolina

alanina

treonina

serina

glicina

arginina

cistina

T

H

ESQUEMA N°5

Esquema de un cromatograma monodimensional en BuOH-AcOH-H₂O del hidrolizado básico de la proteína separada a pH 3,3. -frente del solv. 32 cm-

Leucinas, valina y/o metionina, arginina, alanina, prolina, treonina, glicina, serina, lisina, ácido glutámico, ácido aspártico y cistina (Esquema nº6) además de triptofano que aparecía en los cromatogramas de los hidrolizados básicos. A estos deben sumarse tirosina y fenilalanina que habían sido separados de los demás por adsorción con C.

Resolución de las manchas de leucinas y de valina-metionina. Quedaba todavía por resolver cual o cuales de las leucinas y si era valina o metionina o ambas las que constituían las manchas que hasta ese momento se habían desplazado como un todo compacto ya que el bidimensional con fenol y butanol como 1º y 2º solvente no conseguía separar estos componentes.

Para resolverlo utilizamos como solvente AmOH-AcOH-H₂O en las proporciones ya indicadas desarrollando en cromatograma monodimensional. En este solvente los amino-ácidos tienen Rf muy bajos y mediante largos desarrollos se consigue que los que tienen los valores mayores se distancien de los demás y entre sí.

En una tira de papel con mecha absorbimos una gota de la solución del hidrolizado ácido y como testigo una gota de una solución de leucina, isoleucina, valina y treonina. Se desarrolló durante 4 días.

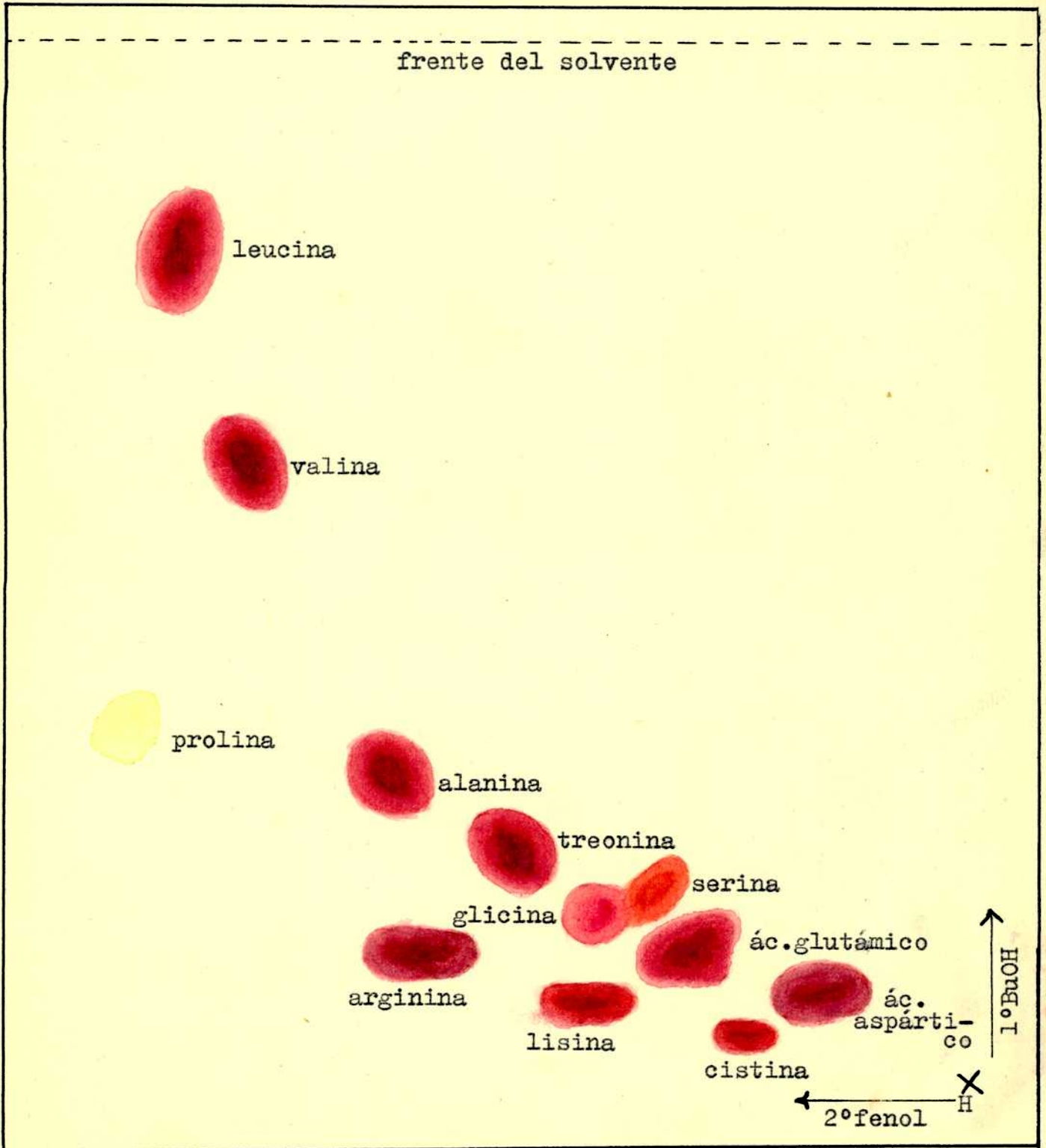
Al revelar se notaron en la línea del hidrolizado 2 manchas superiores netamente diferenciables que se tocaban en un punto de sus bordes. Su contorno y posición coincidía exactamente con la leucina e isoleucina del testigo.

Más abajo se encontraba una mancha a la altura de la valina del testigo y otra alargada compuesta por el resto de los amino-ácidos, cuyo extremo inferior toca la línea de partida.

En otro cromatograma también de 4 días colocamos, además de la gota de la solución del hidrolizado, dos gotas separadas correspondientes a otras tantas soluciones testigo; la primera contenía: leucina, isoleucina, valina, treonina; la segunda: isoleucina, valina, metionina, serina.

ESQUEMA N°6

Cromatograma bidimensional con el par de solventes butanol-etanoico-agua y fenol-agua del hidrolizado ácido de la proteína separada a pH 3,3. (Esquema reducido)



Comprobamos así fehacientemente la posición de isoleucina en las dos manchas superiores y tuvimos la seguridad de que se trataba de dos amino-ácidos distintos debiendo ser, la superior, leucina.

Para tratar de resolver valina-metionina realizamos cromatogramas de 7 días con los mismos testigos del caso anterior.

Leucina e isoleucina aparecen ahora completamente separadas.

La comparación de la mancha correspondiente al hidrolizado con las de los testigos que contienen valina y de los que contienen valina junto con metionina, nos lleva a la conclusión de que el hidrolizado contiene solamente valina. (Esquema nº7)

Verificaciones generales.- Cromatogramas de control. Como comprobación de los resultados obtenidos realizamos una mezcla de todos los amino-ácidos encontrados en el cromatograma bidimensional y efectuamos uno tratando de ajustarnos a condiciones generales de los anteriores. Obtenido el diagrama la comparación fué plenamente satisfactoria.

También realizamos un bidimensional absorbiendo sobre la hoja una gota de 5 μ l de la solución del hidrolizado y luego de haberla secado colocamos otra gota, también de 5 μ l, de la solución de la mezcla de amino-ácidos anterior, sobre la primera.

El cromatograma no presentó variaciones en cuanto al número y ubicación de las manchas. Naturalmente la intensidad de la coloración de las mismas estaba notablemente aumentada.

También ensayamos para controlar nuestros resultados, la técnica indicada por CRUMPLER y DENT (22): la formación de complejos de cobre con los amino-ácidos, complejos que no corren con el solvente y que son característicos de los α -amino-ácidos.

Para ello el papel es espolvoreado con carbonato básico de cobre en una zona a lo largo del futuro paso del primer solvente, en este caso el fenol.

mecha de papel
de filtro grueso

ESQUEMA N°7

leucina
isoleucina isoleucina

metionina
valina valina

treoni-
na
am. r-acs.
restantes
serina
VILT H VIMS

Cromatograma monodimensional
con mecha del hidrolizado de
proteína separada a pH 3,3
-7 días de duración con pen-
tanol-etanoico-agua-

Fig. 107

El carbonato básico de cobre lo preparamos haciendo actuar sobre una solución de SO_4Cu una de CO_3Na_2 en exceso. Dejando reposar se formó el precipitado cristalino de color azul verdoso que utilizamos.

La solución del hidrolizado se colocó en el papel como de costumbre y en otro papel se corrió simultaneamente un cromatograma de la misma solución sin el compuesto de cobre.

Desarrollamos conjuntamente ambos papeles y comparamos.

Los complejos de Cu de los α -amino-ácidos tienen Rf cero y por lo tanto no se desplazan mientras que los que tienen el amino grupo en otra posición se desplazan con el solvente.

La comparación de ambos papeles permite distinguir unos de otros.

Esta experiencia no nos señaló nada nuevo.

Resumiendo, el método cromatográfico en papel, así como lo hemos seguido nosotros, nos señala en los hidrolizados de la proteína separada del líquido hidático por saturación con cloruro de sodio a pH 3,3, la presencia de los siguientes amino-ácidos:

leucina	arginina	serina	fenilalanina
isoleucina	lisina	ácido glutámico	tirosina
valina	treonina	ácido aspártico	prolina
alanina	glicina	cistina	triptofano

Debemos señalar la ausencia de metionina. La resolución de la mancha que pudiera corresponder a valina-metionina no permite afirmar la presencia de metionina.

Creemos poder excluir que la ausencia de dicho amino-ácido sea debida a la oxidación del mismo (BLOCK - 23) por efecto de temperatura, puesto que en los cromatogramas de control, toda vez que se colocó metionina apareció su mancha correspondiente.

Cromatografía bidimensional del hidrolizado de la proteína separada a pH 3,9 - Resuelta así la composición de una de las fracciones separadas pasamos a determinar la de la fracción separada del líquido hidático a saturación completa de ClNa y pH 3,9.

Para ello utilizamos como testigo el hidrolizado de la proteína separada a pH 3,3.

En este caso realizamos únicamente cromatogramas bidimensionales.

La comparación con el testigo nos demostró que ambas fracciones tienen la misma composición cualitativa.

El tamaño y la intensidad de la coloración de las manchas nos hacen creer que es posible que cuantitativamente también tengan la misma composición.

b. - Cromatografía del hidrolizado de la proteína separada de la membrana hidática.

El análisis cromatográfico del hidrolizado de la proteína separada de membrana nos presenta constantemente una mancha anómala sobre cuyo significado nada podemos decir todavía en forma definitiva.

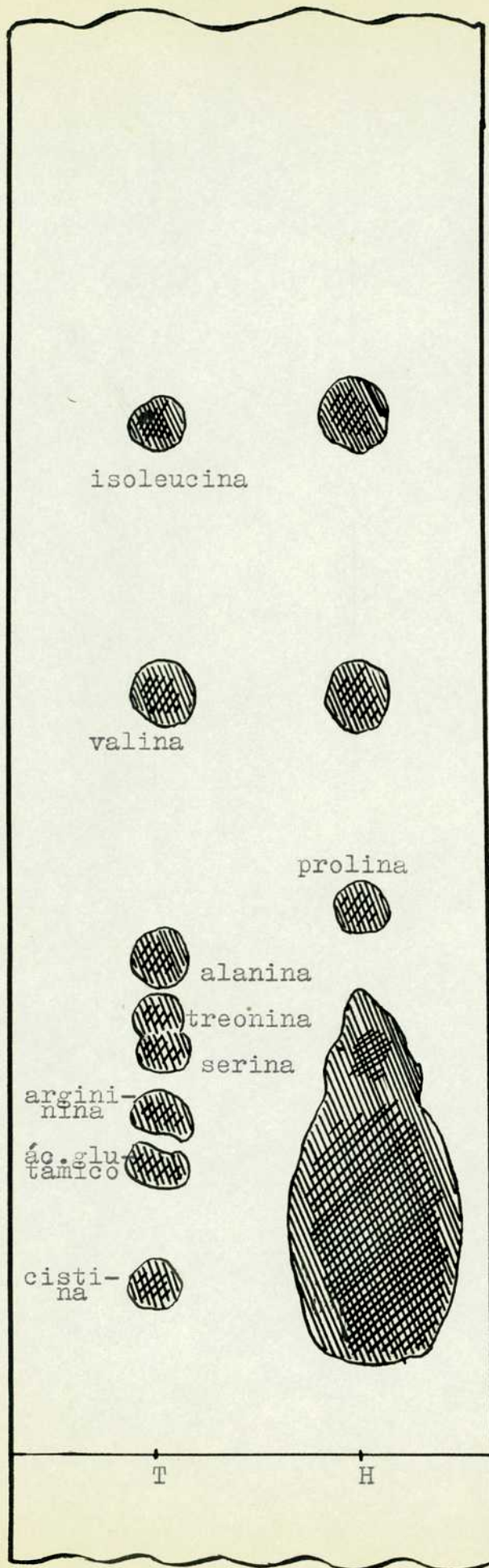
Los cromatogramas presentan las manchas de amino-ácidos identificados como leucinas, valina, prolina, fénilalanina, tirosina, arginina, treonina y probablemente ácido glutámico. Además aparece la anomalía ya señalada en forma de una gran mancha de color liláceo, de baja velocidad, que ocupa, en los monodimensionales en BuOH, una posición que va desde la que ocuparía serina hasta algo más abajo que la de cistina. Su intensidad es uniforme. (Esquema nº8)

Esta mancha aparece también en los cromatogramas en fenol desde aproximadamente la posición del ácido glutámico hasta más abajo que cistina, siendo mucho más intensa en su parte

ESQUEMA N°8

Grmatograma monodimensional
en BuOH-AcOH-H₂O del hidroliz-
ado de proteína separada de
membrana hidática.

Duración 26 hs.



Esq n°8. Crom. monod. en BuOH-AcOH-H₂O. Hidrol. prot. def. membr. híd.

media e inferior. La parte superior presenta sólo una ligera tonalidad. (Esquema nº9) -Esta mancha tiene por lo tanto en relación una velocidad más baja en fenol que en butanol. Es por eso que en los monodimensionales en fenol se distinguen un mayor número de manchas de amino-ácidos que en butanol donde sólo se han separado netamente leucina, valina y prolina.

Sobre la identidad de esta mancha anómala no podemos afirmar nada con certeza. Descartamos que se pueda tratar de un polipéptido puesto que repetidas y prolongadas hidrólisis no hicieron variar estos resultados. Es posible que su coloración o parte de ella, se deba a los amino-ácidos que tienen en promedio, su misma velocidad y que ella cubre. Esto podría ser el caso con el BuOH como solvente. Con el fenol es, en cambio, mucho menos probable ya que la mayor intensidad de la mancha se encuentra por debajo del amino-ácido menor R_f . Debemos deducir entonces que la sustancia en cuestión posee la capacidad de reaccionar con la ninhidrina dando una coloración similar a la de algunos amino-ácidos. Los cromatogramas bidimensionales no agregaron ningún resultado nuevo. Empero, observando los cromatogramas durante su desarrollo notamos que en la posición de la mancha el papel presenta una transparencia distinta a la del mismo mojado con el solvente. Es una zona más opaca que, mirada con luz reflejada, presenta cierta brillantez. Al revelar se nota que dicha zona no ocupa toda la mancha sino sólo la parte central de la misma.

Dado que se trata de un problema que no se puede abordar únicamente desde el punto de vista del análisis de amino-ácidos lo hemos dejado momentáneamente en suspenso hasta reunir los elementos necesarios para develar la incógnita.

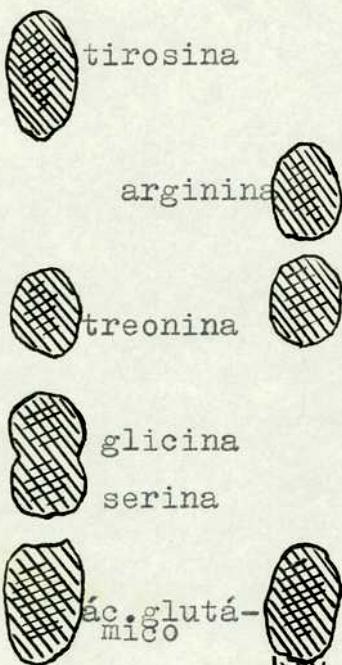
frente del solvente

ESQUEMA N°9



Cromatograma monodimensional
 en fenol-agua del hidrolizado
 de la proteína separada de
 membrana.

Duración 22 hs 30 m.



T

H

Esq. n°9 - cron. monodim. en fenol-agua del hidrolizado de la proteína separada de membrana

Resumen y Conclusiones.

Se ha procedido al análisis cromatográfico de los hidrolizados de las fracciones proteicas aisladas de la hidátide de *Tenia equinococcus*.

A partir del líquido hidático se ha separado mediante ClNa a saturación una fracción a pH 3,9 y otra a pH 3,3.

Del triturado de la membrana se obtuvo solamente un precipitado a pH 3,3.

Estas proteínas que representan el antígeno especie específico son solubles en agua destilada a pH 7,6-7,8; coagulan por calentamiento en presencia de electrolitos y su punto isoeléctrico se halla entre 4,7-4,9.

El análisis cromatográfico en papel de los hidrolizados ácidos y básicos de estas fracciones proteicas ha permitido poner en evidencia que:

1) la proteína separada del líquido hidático a pH 3,3 contiene los amino-ácidos siguientes:

leucina	arginina	serina	fenilalanina
isoleucina	lisina	ácido glutámico	tirosina
valina	treonina	ácido aspártico	prolina
alanina	glicina	cistina	trptofano

2) la proteína separada del líquido hidático a pH 3,9 no se diferencia de la anterior en cuanto a su contenido cualitativo de amino-ácidos;

3) en los cromatogramas de los hidrolizados de la proteína separada de membrana sólo se han identificado:

leucina	valina	fenilalanina	arginina
isoleucina	prolina	tirosina	treonina

dado que, sistemáticamente aparece una mancha anómala no resoluble que cubre la zona donde se hallarían los amino-ácidos de bajo Rf.

Yuelo 40%

M. Mendive

Bibliografía

- (1) WERNICKE y SAVINO - Compt. rend. Soc. biol. 88: 343 (1923)
- (2) LEMAIRE y RIBERE - Compt. rend. Soc. biol. 118:1578 (1935)
- (3) PIROSKY, I; PIROSKY, R. de; CASIRAGHI, J.C. - Revista del Instituto Bacteriológico Malbrán 11:94 (1942)
- (4) PIROSKY, I; PIROSKY, R. de; YALOV, S. de - Revista del Instituto Bacteriológico Malbrán 14:287 (1949)
- (5) CONSDEN, GORDON y MARTIN - Biochem. J. 38: 224 (1944)
- (6) GOPPELSROEDER - Fr. 38: 291 (1899)
- (7) KUHN y LEDERER - Ber. 64: 1349 (1931); Z. physiol. Chem. 200:108,246 (1931)
- (8) KUHN, WINTERSTEIN y LEDERER - Z. physiol. Chem. 197:141 (1931)
- (9) MARTIN y SYNGE - Biochem. J. 35:1358 (1941)
- (10) GORDON, MARTIN y SYNGE - Biochem. J. 37:79,86,92,313 (1943)
- (11) ENGLAND y COHN - J. Am. Chem. Soc. 57:634 (1935)
- (12) RUHEMANN - J. Am. Chem. Soc. 97:1440,2025 (1910)
- (13) RETINGER - J. Am. Chem. Soc. 39:1059 (1917)
- (14) HARDING y colab. - J. Biol. Chem. 25:330,337 (1916)
- (15) Mac FADYEN y colab. - J. Biol. Chem. 186:13 (1950)
- (16) WOLFSON, COHN y DEVANEY - Science. 109:541 (1949)
- (17) DRAPER y POLLARD - Science. 109:448 (1949)
- (18) RUTTER - Nature. 161:435 (1948)
- (19) PRATT y AUCLAIR - Science. 108:213 (1948)
- (20) RUTTER - Nature. 161:435 (1948)
- (21) PARTRIDGE - Biochem. J. 44:520 (1949)
- (22) CRUMPLER y DENT - Nature. 164:441 (1949)
- (23) BLOCK - An. Chem. 22:1327 (1950)

Se han consultado principalmente además:

ZECHMEISTER y CHOLNOKY - Principles and practice of chromatography (1943)

ANSON y EDSALL eds.- Advances in protein chemistry; vol 2°
(1945)

- MAZZOCCO - Composition du liquide hydatique - Compt.rend.Soc.
Biol. 88:342 (1922)
- GRAÑA y OEHNINGER - Chemical constitution and biological properties of hydatid membrane - Arch.urug.de med. cir. y especialid. 24:231 (1944)
- MACHEBOEUF y BLASS - Quelques details d'application micromatographique des amino-acs. de Consden et alia-
Annales de l'Institut Pasteur 73:1053 (1947)
- WILLIAMS y KIRBY - Paper chromatography using capillary ascent-
Science 107:481 (1948)
- PATTON y FOREMAN - Glycine reagent for paper chromatogram -
Science 109:339 (1949)
- BRANTE - Iodine as a mean of development in paper chromatography-
Nature 163:651 (1949)
- LANDUA y AWAPARA - Use of modified ninhidrin reagent in determination of amino-acids by paper chromatography-
Science 109:385 (1949)
- MA y FONTAINE - A one and two-dimensional paper partition chromatographic apparatus - Science 110:232 (1949)
- MULLER y CLEGG - Automatic paper chromatography - An.Chem.21:1123 (1949)
- HORROCKS y MANNING - Partition chromatography on paper: Identification of reducing substances in urine -
Lancet 256:1042 (1949)
- CONSDEN, GORDON y MARTIN - A study of the acidic peptides formed on the partial acid hydrolysis of wool-
Biochem.J. 44:548 (1949)
- WOIWOOD y LINGOOD - Amino-acid constitution of diphtheria toxin and toxoid - Nature 163:218 (1949)
- COOK - Chromatographic separation of natural compounds -
Nature 164:300 (1949)

- LUNDGREN y WARD - Chemistry of amino-acids and protein - Chromatography - Ann.Rev.Biochem. 18:140 (1949)
- MITTELMAN - Cromatografía de adsorción y partición - Chemia 15 (103):73 (1949)
- Chromatography - Annals of the New York Academy of Sciences 49:141 (1948)
- BOWES y KENTEN - Observations on the amino-acids distribution of elastin - Biochem.J. 45;281 (1949)
- MARTIN - Partition chromatography - Ann.Rev.of Biochem.19:1 (1949)
- STRAIN - Chromatography - An.Chem.22:41 (1950)
- CLEGG - Paper chromatography - An.Chem. 22:48 (1950)

I N D I C E

=====

<u>Introducción</u>	pag.	1
<u>Cap. I - Aislamiento de la proteína de la hidátide de Tenia equinococcus</u>	"	3
a.- Proteína de líquido.....	"	3
b.- Proteína de membrana.....	"	5
<u>Cap. II - Propiedades generales y significado biológico de la proteína de hidátide de T. equinococcus</u>	"	6
Propiedades generales.....	"	6
Precipitabilidad por sales.....	"	7
Punto isoelectrico.....	"	9
Significado biológico.....	"	10
<u>Cap. III - Cromatografía en papel</u>	"	11
a.- Antecedentes sobre el método cromatográfico.....	"	11
Cromatografía de partición.....	"	14
Cromatografía sobre papel.....	"	15
Del solvente.....	"	16
Del revelador.....	"	16
Constante desplazamiento de los amino-ácidos o Rf.....	"	18
Cromatogramas bidimensionales.....	"	19
b.- Estudio experimental de la técnica....	"	20
Materiales utilizados:Papel.....	"	20
Solventes.....	"	21
Cámaras.....	"	23
Microbureta.....	"	24
Mezclas testigos.....	"	24
Hidrolizados.....	"	26

Duración.....	pag. 26
Revelador.....	" 27
Determinación de Rf.....	27
Factores que influyen sobre la constancia del Rf.....	29
Variación del valor de los Rf con la temperatura.....	32
Determinación del límite de sensi- bilidad de los amino-ácidos para la ninhidrina.....	35
Ensayo de separación de mezclas artificiales.....	36
Cromatografía en papeles de filtro circulares.....	43
<u>Cap. IV - Aplicación de la cromatografía en papel al análisis de las proteí- nas aisladas de T.equinococcus.....</u>	45
Hidrólisis ácida.....	45
Hidrólisis alcalina.....	46
a.- Cromatografía del hidrolizado de las proteínas separadas del líquido hi- dático.....	47
Cromatogramas bidimensionales del hidrolizado de la proteína separada a pH 3,3-Amino-ácidos identificados en el hidrolizado ácido.....	47
Amino-ácidos identificados en el hi- drolizado alcalino.....	50
Cromatogramas bidimensionales de hi- drolizados ácidos y básicos.....	51

Resolución de las manchas de leu- cinas y de valina-metionina.....	pag.	52
Verificaciones generales.....	"	53
Cromatografía bidimensional del hidrolizado de la proteína sepa- rada a pH 3,9.....		55
b.- Cromatografía del hidrolizado de la proteína separada de la mem- brana hidática.....		55
Resumen y conclusiones.....	"	57
Bibliografía.....	"	58
