

Tesis de Posgrado

Aplicación de la cromatografía sobre papel a la separación de Firiaporfirina III y Uroporfirina I de porfiria congénita y de la Porfirina de Waldestrom

Barrionuevo, Martha Elvira

1956

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

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

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

Cita tipo APA:

Barrionuevo, Martha Elvira. (1956). Aplicación de la cromatografía sobre papel a la separación de Firiaporfirina III y Uroporfirina I de porfiria congénita y de la Porfirina de Waldestrom. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0904_Barrionuevo.pdf

Cita tipo Chicago:

Barrionuevo, Martha Elvira. "Aplicación de la cromatografía sobre papel a la separación de Firiaporfirina III y Uroporfirina I de porfiria congénita y de la Porfirina de Waldestrom". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1956.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0904_Barrionuevo.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Tesis presentada para optar al título de Doctor en
Química, por la S.ta. Martha Elvira Barrionuevo.

"APLICACION DE LA CROMATOGRAFIA SOBRE PAPEL A LA SE-
PARACION DE FIRIAPORFIRINA III Y UROPORFIRINA I, DE PORFI-
RIA CONGENITA Y DE LA PORFIRINA DE WALDESTROM".

RESUMEN

El análisis de los resultados obtenidos, permite con-
cluir lo siguiente:

1.- La aplicación del método de la 2-6 lutidina de Erik-
sen demuestra que la Firiaporfirina III da una mancha única en
posición distinta a la correspondiente a la de la Uroporfirina
I. Al igual que en la columna de CO_3Ca su posición es muy veci-
na a la de la Uroporfirina I.

2.- a) Confirmando ensayos aislados del laboratorio de
Watson se demuestra mediante el método de Falk y Benson, que
la Firiaporfirina III se separa perfectamente de la Uroporfi-
rina I; igual que en el método de Eriksen la Firiaporfirina III
da una mancha única. Dicha separación ocurre con mezclas de
Firiaporfirina III y de Uroporfirina I en proporciones que va-
rían de 10% de Firiaporfirina y 90 % de Uroporfirina III a 90%
de Firiaporfirina III y 10% de Uroporfirina I.

b) La Uroporfirina I aislada de la Porfirina de Wal-
deström de orina de porfiria cutánea tarda, se comporta de la
misma manera que la Uroporfirina I aislada de porfiria congé-
nita, siendo esta última la considerada como la Uroporfirina I
típica.

Debemos recordar que Watson utilizando el mismo mé-
todo encuentra que la Uroporfirina I aislada de Porfirina de
Waldeström de orina de porfiria aguda, se comporta ^{igual} que la Uro-
porfirina I congénita. Esto constituye una prueba mas que per-

//mite concluir que la Uroporfirina I de la Porfirina de Waldestöm aislada de orina de porfiria cutánea tarda y de porfiria aguda es igual que la Uroporfirina I de Porfiria congénita.

c) Se observa que la Uroporfirina I, tanto congénita como de Waldeström y sus mezclas con la Firiaporfirina III da estelas y manchas que por su posición podrían confundirse con la Uroporfirina III de la turacina, habiéndose observado esto también en el laboratorio de Watson; esas manchas harían pensar que existe una tendencia a formar una mezcla o combinación molecular que se comporta en este método cromatográfico como una entidad química.

d) El método de Falk y Benson también permite separar la Firiaporfirina III de la Uroporfirina I de mezclas de porfirinas impuras, separadas directamente de la orina y sometidas a la esterificación.

FCENBA

Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

D.° Quilstein.

APLICACION DE LA CROMATOGRAFIA SOBRE PAPEL A LA
SEPARACION DE FURFURAL, FURFURINA I Y FURFURINA II, DE FOR-
FURINA CUERDITA Y DE LA FURFURINA DE MALDESTON.

Tesis presentada para optar
al título de
Doctor en química
por la
Lic. MARTHA E. BARRIGUEVO

TESIS : 904

Buenos Aires
1956.



A mi padrino de tesis, Dr. Moisés Grinstein expreso mi sincera gratitud, por haberme dirigido en la realización del presente trabajo.

Esto se realizó en la cátedra de Química Biológica del profesor Jorge R. Mandive.

Al mismo tiempo deseo manifestar igual sentimiento a los jefes de la Fundación Campomar, Obras Sanitarias de la Nación, Instituto de Biología Animal del Ministerio de Agricultura de la Nación, como así también a los Dres. Venancio Deulofeu y Arturo L. Cairo y a los señores D. Vlaho, M. Danker y A. López .

INTRODUCCION

En 1935 Waldeström aisló una porfirina de orina de enfermos de porfiria aguda, que por sus características la identifica con la uroporfirina III.

En 1945, Grinstein y colaboradores demuestran que la uroporfirina III de Waldeström es una mezcla o combinación molecular de uro I y una porfirina nueva de siete carboxilos de estructura isomérica III que distinguen como porfirina 208.

Como consecuencia de estos resultados los autores deciden distinguir dicho uro III como Porfirina de Waldeström.

La presencia de la 208 en la Porfirina de Waldeström no ha podido ser confirmada en el laboratorio del profesor Rimington, mediante la técnica de la lutidina de Nicholas y Rimington, ni con el método de Falk y Hansen (Studies on the Waldeström Porphyrin of Acute Porphyria Urines, Bioch. J. 55 N° 1 pp. 109-114 1953). Muestras de porfirinas 208 aisladas en el laboratorio de Watson sometidas a la cromatografía sobre papel en el laboratorio de Rimington, han sido identificadas como una porfirina de 6 carboxilos e incluso consideradas como una impureza.

En base a estos resultados que han traído un poco de confusión en lo que respecta a la porfirina de Waldeström, hemos considerado oportuno estudiar el comportamiento de la porfirina 208 en los distintos métodos cromatográficos sobre papel, que para porfirinas existen actualmente.

QUIMICA DE LAS PORFIRINAS

Las porfirinas son pigmentos formados por cuatro núcleos pirrólicos, unidos entre sí por carbonos metínicos. Los restantes carbonos de los pirroles tienen cadenas carbonadas de distinta naturaleza, que permite diferenciar las porfirinas entre sí.

Ya en 1867 Thudichum (1) describió un pigmento que llamó "erantina", el cual había logrado aislar de la mezcla obtenida por acción de un ácido fuerte sobre la sangre. Años después, Hoppe Seyler (2) cambió este nombre por el de "hematoporfirina", con el cual indicó el color de su solución y su procedencia.

Pero recién con los trabajos de Hans Fischer y su escuela, a partir de 1915 se aclara la estructura de las porfirinas.

Con el objeto de racionalizar la nomenclatura, Fischer creó el núcleo de la porfina, sustancia sintética que no se encuentra, como tal, en la naturaleza, pero sí le están sus derivados, como por ejemplo la Protoporfirina, que es el ácido 1,3,5,8 tetrametil, 4 divinil porfina, 6,7 dipropiónico.

Así mismo fue Fischer quien preparó los cuatro isómeros posibles de etioporfirinas, en los que cuatro grupos etilo y cuatro metilo reemplazan los hidrógenos beta de los núcleos pirrólicos. Cada etioporfirina se puede considerar como punto de partida de una serie de porfirinas derivadas por introducción de grupos vinyl-

lo, ácido acético, ácido propiónico etc. en lugar de los grupos metilo e etilo. Es interesante el hecho que los pigmentos de la serie II y IV no parecan ser productos de las células vivientes, perteneciendo, los hasta ahora encontrados a la serie I y III.

Es fácil identificar a las porfirinas debido a su color y a la estructura de resonancia de su molécula, esta última propiedad determina: 1º) la presencia de bandas de absorción características y definidas en las regiones visible (500-700 mμ) y en el ultravioleta intenso (Banda de Soret); 2º) una fluorescencia intensa roja, a la luz ultravioleta, que permite reconocerla aún en concentraciones de $1/10^9$ en solvente apropiado.

Entre las porfirinas más importantes, destacaremos las siguientes:

PROTOPORFIRINA IX

Es una porfirina de importancia biológica extraordinaria pues constituye el núcleo prostético de la hemoglobina. Es del tipo isomérico III y parece ser la única que se encuentra en la naturaleza.

Observando la fórmula se vé que hay quince maneras distintas de combinar los cuatro metilos, dos vinilos y dos restos de ácido propiónico, como sustitutos de los ocho átomos de hidrógeno beta de la porfina.

La novena experiencia fué la que reprodujo

la porfirina natural en el trabajo de síntesis de Fischer; se la distingue entonces como Protoporfirina IX.

En la naturaleza se la encuentra en las hemoproteínas, en la mioglobina y hemoglobina, en la catalasa, peroxidasa y en los citocromos constituyendo su núcleo prostético. En ciertas especies animales aparecen localizaciones peculiares de Protoporfirina IX; así al iluminar con luz U.V. una glándula de Harder de rata, se nota intensa fluorescencia debido a su contenido de Protoporfirina. A partir de la hemoglobina, se puede obtener el éster metílico de la Protoporfirina IX al estado puro (3).

COPROPORFIRINA

Los isómeros pertenecientes a la serie I y a la III parecen ser los únicos que se encuentran en la naturaleza.

COPROPORFIRINA I

Fischer la aisló por primera vez, a partir de orina y principalmente de heces de enfermos de porfiria, y de anemia hemolítica y perniciosa. Se la encuentra en las heces normales, en el meconio, en el líquido amniótico y en embriones de pollo.

En ciertos estados clínicos, la Coproporfirina I se excreta en cantidades relativamente altas cuando se produce una regeneración rápida de la sangre, hecho que está en favor de la hipótesis de que la Copro I es un subproducto de la síntesis normal de la Protoporfirina.

COPROPORFIRINA III

Fue aislada por primera vez por H. van der Bergh a partir de orina de enfermos de porfiria congénita (4).

En el caso de intoxicación con plomo, afecciones hepáticas, infecciones y anemias aplásticas, la excreción de Copro III predomina sobre la de Coproporfirina I.

UROPORFIRINA

El número de la serie I fue el primero que se encontró en material biológico en casos de porfiria, especialmente de los del tipo congénito o eritropoietico, siendo un dato patognomónico del estado de porfiria. La existencia de una Uroporfirina III no ha sido confirmada por todos los investigadores hasta estos momentos.

UROPORFIRINA I

Fue descubierta por Fisher, quien logró aislarla de orina de enfermos de porfiria crónica. Al lograrse su síntesis (5) se confirmó la estructura propuesta por este autor. Constituye el 75% de la Uroporfirina III de Waldenström, como veremos más adelante; normalmente se excreta pequeñas cantidades de Uro I por la orina, por día; es interesante también la deposición de uroporfirina en ciertas conchas marinas y en las zonas de calcificación de los huesos del feto. En los casos de porfiria humana, impregna los huesos y otros tejidos.; resultados semejantes obtuvo Rimmington en un estudio similar efectuado con material perteneciente a una necrosis bovina. Así mismo el esqueleto

osca de la ardilla (*Sciurus niger*) y de otros roedores, tienen un tinte moreno y dá una fluorescencia roja intensa con luz U.V., particularmente la de los dientes, debido a estar impregnado de Uroporfirina.

Finalmente, se han identificado en la sécula fésca de conejos intoxicados con plomo cantidades relativamente grandes de Uroporfirina I.

UROPORFIRINA III

En 1935, Waldeström (6) aisló de orinas de porfirinas de tipo agudo, una porfirina insoluble en etar etílico, con ciertas propiedades similares a las de la Uroporfirina I aislada de porfirias congénitas o eritropoyéticas, pero con comportamiento químico distinto. Por decarboxilación por el método de Fischer-Zerweck, Waldeström obtuvo Coproporfirina III. Con este y otros datos experimentales, creyó encontrarse con una uroporfirina de la serie III, y este criterio fué aceptado universalmente; es interesante mencionar que ciertos investigadores, Kingston entre ellos, dicen haber aislado un complejo de cobre de la Uro III, en las plumas de los turacos (*Muscophagidene*), aves africanas emparentadas con el cuculillo, mientras que Fisher e Hilger (7) demuestran que la turacina, es decir el pigmento rojo de las plumas de dichas aves, es un complejo de Uroporfirina I y cobre.

Los trabajos de Grinatsis y colaboradores (8) hicieron dudar de la existencia real de esta porfirina; la cromatografía en columna con CO_2/Ca permitió reconocer que la uro III no es una entidad química sino una mezcla. En el trabajo mencionado se llega a la siguiente conclusión: " La porfirina extraída de la orina previamente lle-

vada a pH 3,0 - 3,2 con acetato de etilo y que fué descrita por Waldeström como una Uroporfirina III no es más que una mezcla o combinación molecular de aproximadamente 75% de Uroporfirina I y 25% de otra porfirina de 7 carboxilos de una estructura isomérica III, que distinguiremos como porfirina 208".

En algunos casos no fué posible fraccionar la Uro III de Waldeström en Uro I y 208, pero los productos de decarboxilación son esencialmente Coproporfirina I; Grinstein concluye diciendo que esta Uro III que se comporta como una entidad cromatográfica a en columna de CO_3Ca , es una combinación molecular de Uro I y 208. Watson llama a estos complejos de la siguiente manera:

- I) Porfirina de Waldeström tipo A: fraccionable en Uro I y 208.
- II) Porfirina de Waldeström tipo B: combinación molecular.

PORFIRINA 208 o FERIAPORFIRINA

En 1945, Grinstein y colaboradores (9) encontraron que mediante la cromatografía en columna sobre CO_3Ca , se puede aislar de la Uroporfirina III de Waldeström dos fracciones: una con punto de fusión correspondiente a la Uroporfirina I (284) y otra con un punto de fusión de 208° C, correspondiente a un ácido heptacarboxílico y que entonces llamaron Porfirina 208.

El éster metílico de la 208 cristaliza en metanol más lentamente que el de la Uro I, pero al igual que esta, lo hace cuantitativamente en forma de agujas largas y flexibles, con gran tendencia a formar rosetas compactas.

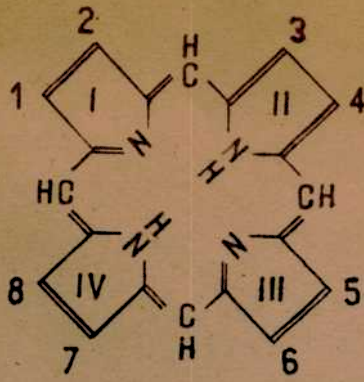
El color de los cristales es rojo vino y funden en forma definida a 207-208° C, como ya se ha dicho.

Por decarboxilación de Coproporfirina III, y el análisis funcional ha demostrado sin lugar a dudas que se trata de una porfirina de siete carboxilos.

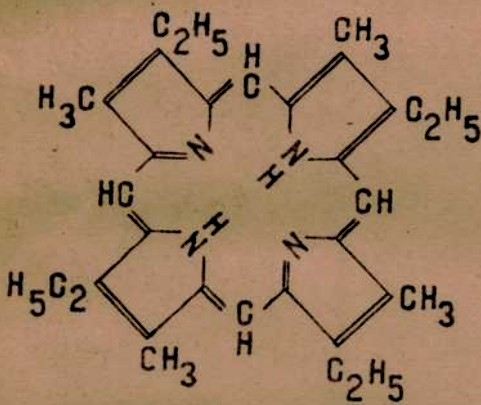
Resumiendo, la 208 es una porfirina del tipo isométrico III, con siete carboxilos, habiéndose encontrado, hasta el presente, únicamente, en material perteneciente a estados porfíricos humanos.

Estamos pues, frente a una porfirina que se formaría exclusivamente en estados de porfiria, como porfiria aguda y porfiria cutánea tarda. En los estados de porfiria cutánea tarda, que predomina en nuestro medio, la porfirina 208 constituye hasta un 42% de la porfirina de Waldeström.

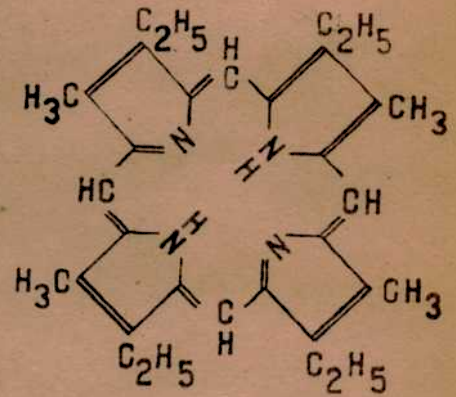
Admitiendo como definitiva la terminación fixis como expresión específica del estado de porfiria, Grinstein (8) sugiere para esta nueva porfirina el nombre de Fixisporfirina III.



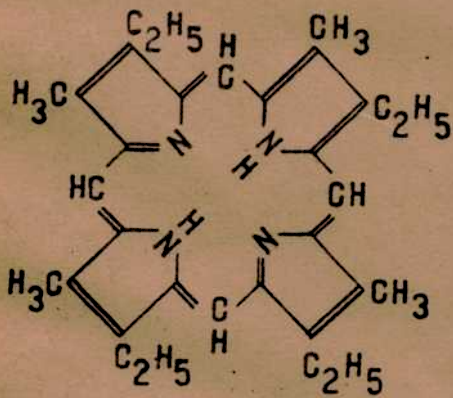
Porfina



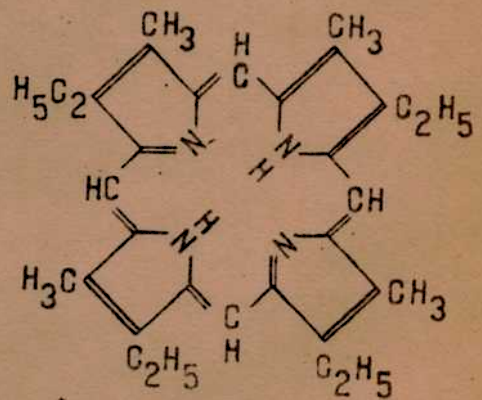
Etioporfirina I



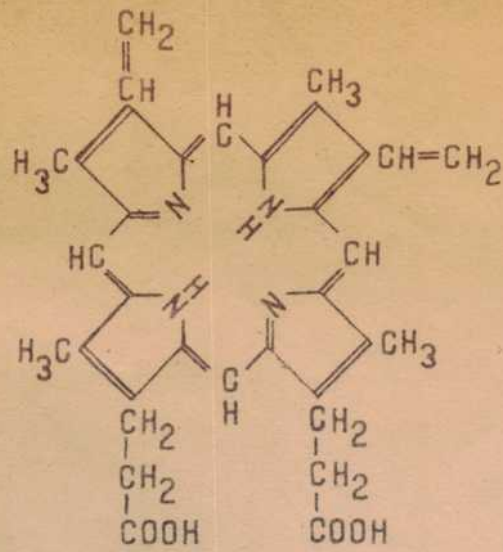
Etioporfirina II



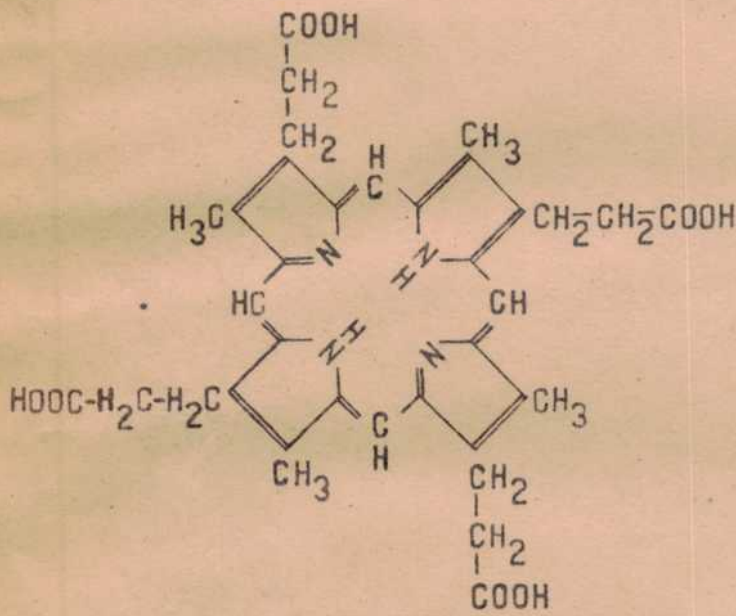
Etioporfirina III



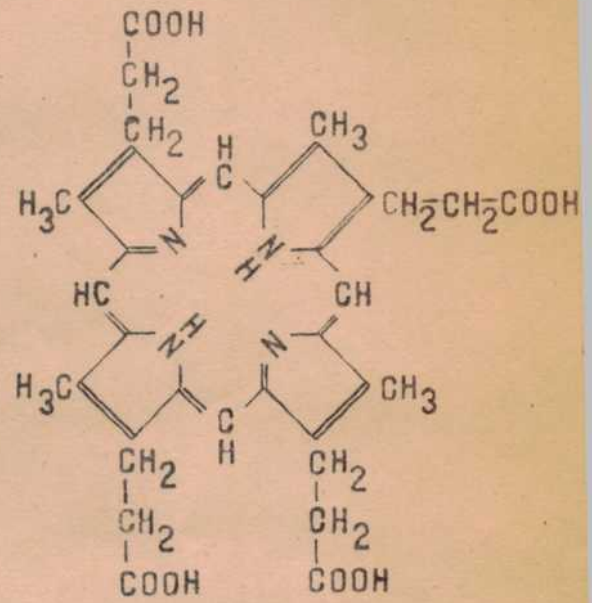
Etioporfirina IV



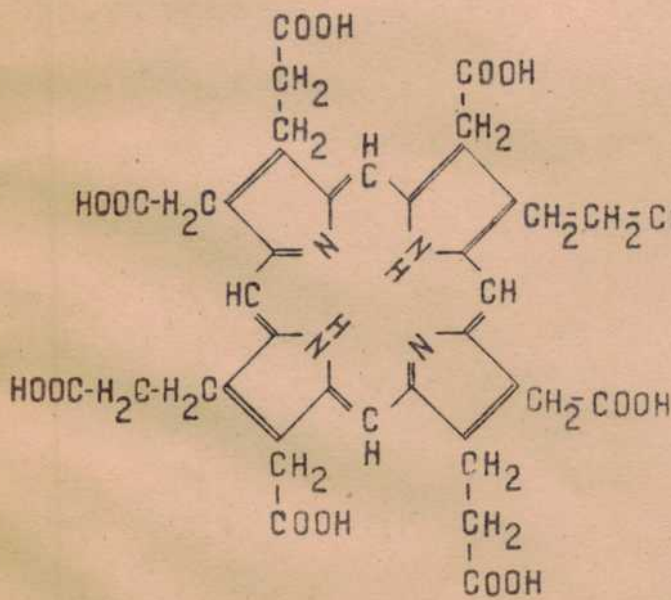
Protoporphirina IX



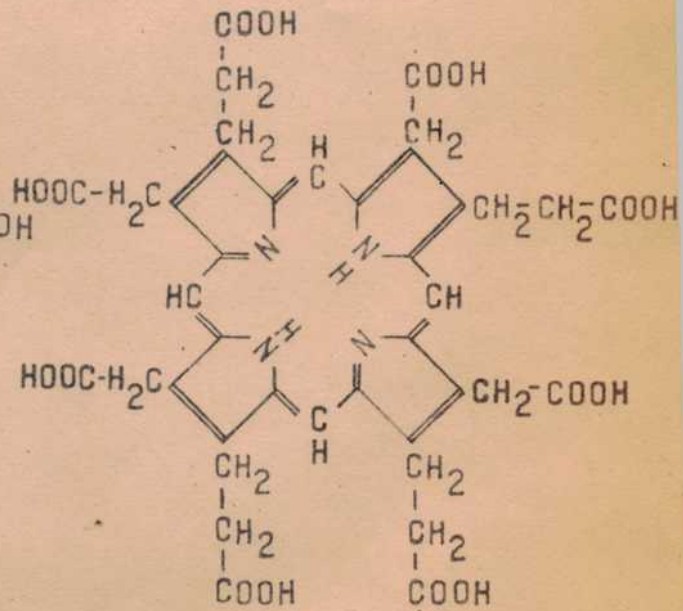
Coproporphirina I



Coproporphirina III



Uroporphirina I



Uroporphirina III

PORFIRIA

El término porfiria abarca un grupo de enfermedades caracterizadas por rasgos clínicos definidos, junto con una excesiva formación y excreción de ura y coproporfirina, acompañadas a veces por ciertos cromógenos o precursores. Algunos autores consideran al estado de porfiria como una anomalía, un error de metabolismo, pero recientemente Watson y otros, consideran que es factible adquirirlo, como ocurre con las del tipo experimental provocadas en conejos, ratas y perros, especies animales entre las que no se han registrado aún, anomalías espontáneas del tipo de la porfiria humana.

La sintomatología es variada, pudiendo el enfermo sufrir de anemia hemolítica, dolores abdominales, parálisis bulbar y respiratoria, insuficiencia hepática, trastornos nerviosos y endocrinos, y como rasgo distintivo, una fotosensibilización tan extraordinaria que en la antigüedad confundió a los investigadores, los cuales creyeron encontrarlos ante casos de lepra ("lepra nostras") esta fotosensibilización, cuando existe, puede ser tan marcada, que llega a la destrucción de partes del organismo expuestas al sol, perdiendo el paciente, por ejemplo, parte de la nariz, labios, orejas, etc.

CLASIFICACION DE LAS PORFIRIAS

Hasta hace poco tiempo, las clasificaciones de porfiria se habían realizado con un criterio puramente clínico, tales son las clasificaciones de Günther, Waldeström y Michaeli Domizici; es la moderna clasificación de Watson

se han tenido en cuenta tanto la faz clínica como la bioquímica de la enfermedad. A continuación se enuncian las distintas clasificaciones:

Günther (10):

Aguda { tóxica
 idiopática

Crónica

Congénita

Waldenström (6):

Aguda con variaciones

Cutánea tarda

Congénita

Watson (12):

I. Porfiria eritropoietica

II. Porfiria hepática

- a) aguda intermitente
- b) cutánea tarda
- c) mixta o combinada
- d) latente

En la clasificación de Watson, el tipo eritropoietico corresponde al crónico de la clasificación de Günther, y se la denomina así pues las porfirinas anormales y la excesiva cantidad de coproporfirina se forman en las células inmaduras de la médula ósea. En cambio, en las porfirias del tipo II, que son las mas abundantes, las porfirinas anormales y el porfobilinógeno se formarían en el hígado como expresión de la perturbación que sufre el metabolismo de la protoporfirina, vinculada a la catalasa; esta es la causa de la denominación de porfiria hepática; los subgrupos a, b, c y d tienen distinta sintomatología clínica, acompa-

hacia a veces por un cuadro químico distinto.

PORFIRIA CUTANEA TARDA

Nos referiremos exclusivamente a este subgrupo por ser el dominante en Argentina como ya se ha publicado en otras oportunidades. (12) El término fue creado por Waldeström para designar el tipo crónico de Günther, como se dijo anteriormente; el nombre expresa el rasgo principal de la enfermedad, el cual es la aparición tardía de fotosensibilización y de lesiones cutáneas.

La mayoría de los casos de porfiria cutánea tarda, adquieren fotosensibilización después de dos o tres décadas de vida. Además las mutilaciones causadas por ella no son tan importantes como las causadas en la porfiria eritropoética. Otra característica de estos enfermos es el color particular que tiene la piel; es una pigmentación marrón violácea, particularmente intensa alrededor de los ojos.

Debemos agregar como caracter también común, el color de la orina de los enfermos, que va del amarillo anaranjado oscuro al rojo vino de Borgoña; iluminada con luz U.V. emite fluorescencia roja.

Entre las porfirinas excretadas por orina predomina, por su cantidad, el complejo que se distingue como Porfirina de Waldeström; que está combinada con el Zn; está constituida por Uroporfirina I y 20^8 o Pirioporfirina (8).

Además se excreta Copro I y III y dos porfirinas no identificadas, posiblemente de cinco y seis carboxilas.

Grinstein resume los resultados de la siguiente

manera: "En los estados de porfiria hepática, tipo cutanea tarda, se excretan por orina, principalmente Uroporfirina I y Porphobilinogénica III; esta última es una porfirina de siete carbonos y con una estructura isomérica III. También se excretan en cantidades mucho menores, Coproporfirinas I y III y dos porfirinas más, aún no identificadas, que por su ubicación en el cromatograma se trataría de porfirinas de cinco y seis carbonos respectivamente".

GENERALIDADES DE CROMATOGRAFIA SOBRE PAPEL

Actualmente, la separación y purificación de sustancias es uno de los mayores problemas a los que se vé abocado el químico diarriante. En su esencia implican un fraccionamiento de dos o mas componentes.

Los distintos métodos de fraccionamiento pueden dividirse en dos grupos:

a) Separación de sustancias originariamente presentes en fases diferentes: se hace uso de propiedades físicas muy diversas para la separación de las fases preexistentes, como son dureza, tamaño, comportamiento eléctrico e magnético, densidad, etc.

b) Fraccionamiento de sustancias presentes en la misma fase. En este caso los métodos a emplear se pueden dividir en dos clases, según que se utilice la distribución entre diferentes fases o la separación por transporte difusivo.

La cromatografía depende de un proceso de partición englobado en el grupo de las separaciones por difusión que utilizan el principio de la purificación en contracorriente; la partición tiene lugar entre una fase fluida y una fase interfacial.

La adsorción es lo que diferencia fundamentalmente la cromatografía de los otros métodos de fraccionamiento.

Podemos decir que la cromatografía equivale a una continua y ordenada agitación del adsorbato, seguida de una filtración y nueva iniciación del proceso. Debe hacerse notar que en esta forma se logra separar sustancias que por su estructura similar presentan una adsorción tan semejante que haría inútil el intento de separación por simple extracción con solvente.

A pesar de existir varios trabajos anteriores sobre el tema, es recién en 1943, con Gordon, Martin y Singe (13) cuando se comienza a trabajar con intensidad modificando el método en la forma que actualmente se denomina cromatografía sobre papel.

El fundamento teórico está basado en la cromatografía de partición; sintéticamente, ésta consiste en una columna sólida que es esencialmente un soporte semisólido para la fase líquida estática, a través de la que fluye la fase líquida móvil.

Es decir, que así como en la forma de cromatografía usual la separación de las componentes se produce por un gran número de adsorciones y diluciones repetidas, en la cromatografía de reparto tiene lugar un gran número de particiones consecutivas de la sustancia entre las dos fases líquidas; desempeñan entonces un papel decisivo las diferencias de coeficientes de partición en el éxito de la experiencia. En la cromatografía sobre papel, el soporte está representado por el papel de filtro, que tiene una ventaja extraordinaria al permitir realizar la cromatografía en forma bidimensional, como en el caso del método de Chu, Green y Chu, que veremos más adelante.

De la misma forma que la cromatografía de partición ordinaria, la fase estática, que generalmente es agua, se encuentra embebida por el soporte, es decir el papel de filtro, sobre el que circula la fase líquida móvil. La sustancia problema se coloca en cantidad adecuada (que puede variar entre 1 y 300 microgramos de sustancia sólida disuelta en un solvente apropiado), en la proximidad de uno de los extremos del papel, de acuerdo a lo aconsejado por cada técnica. Seguidamente se realiza un desarrollo con sol-

vantes adecuadas en cámara cerrada y saturada con vapor de ambas fases, estática y móvil. A continuación se procede al secado de la tina desarrollada. En los métodos bidimensionales, se efectúa con el siguiente solvente un nuevo desplazamiento en un sentido girado 90° con respecto al primero. Terminado este paso se seca nuevamente, procediendo a pasar de manifiesto la posición de cada una de las sustancias separadas, lo que comúnmente se realiza pulverizando un reactivo adecuado sobre el papel.

En el caso de las porfirinas, este revelado se realiza iluminando el papel con luz ultravioleta filtrada, pues se aprovecha la intensa fluorescencia roja de las manchas, como se dijo anteriormente.

La posición de cada una de las manchas es fija y la naturaleza de las mismas puede ser determinada utilizando sustancias conocidas como testigos de comparación.

En la práctica se las distingue por su R_f , valor definido por la relación:

$$R_f = \frac{\text{desplazamiento del soluto}}{\text{desplazamiento del frente de avance del solvente}}$$

TECNICAS UTILIZADAS

Entre las distintas técnicas que se pueden utilizar en cromatografía sobre papel, mencionaremos la descendente monodimensional y la ascendente mono y bidimensional, que son las que nosotros hemos usado.

a) CROMATOGRAFIA DESCENDENTE MONODIMENSIONAL

Se emplea una tira de papel de filtro de 1,5 cm. de ancho como mínimo y de longitud variable, más o menos 20-60 cm. Se traza con lápiz una línea a través de la tira y a unos 5-8 cm. de sus extremos. En el centro de ella se coloca una cantidad determinada de la solución problema, en las condiciones especificadas por el método: en general se usan micropipetas o capilares de vidrio previamente calibrados; también se puede usar un anso de platino abierta, de manera tal que deposite, por vez, 2 microlitros de líquido. La tira de papel, una vez evaporado el solvente de la solución, se sumerge en la fase móvil, contenida en un recipiente que puede adoptar distintas formas; en nuestro caso usamos siempre cristalizadores. El papel se sujeta mediante un portaobjeto, un trozo de varilla de vidrio o cualquier otro dispositivo adecuado. De esta manera un trozo de la tira queda dentro del solvente y el resto de ella cuelga en el interior de la cámara cromatográfica, cuyas características pueden ser también muy diversas. El cristalizador se llena con el solvente, que muchas veces se satura con agua, y en el fondo de la cámara se coloca un vasito con el mismo solvente, con el fin de lograr una atmósfera adecuada y homogénea.

Se tapa la cámara y se permite al solvente correr a través de la tira durante un número variable de horas, que

depende fundamentalmente del tipo de papel, del largo de la tira y de la naturaleza del solvente empleado.

La temperatura es otro factor que se debe tener en cuenta, pues incide sobre la velocidad y eficiencia del desarrollo.

Una vez que el solvente ha recorrido la distancia requerida, se abre la cámara y se saca el papel, procurando no tocarlo con las manos ni con utensilios que no estén perfectamente limpios: que puedan ser atacados por el solvente; preferentemente se usarán pinzas de níquel o acero inoxidable. La tira no puede secar con ventilador, con estufa o con aire a presión.

Una vez seco se revela, ya sea por métodos químicos pulverizando sobre el papel una solución del reactivo empleado, o por métodos físicos diversos, como ser la radiación ultravioleta etc.

Al sacar el cromatograma de la cámara se marcará el frente máximo alcanzado por la fase móvil. Una vez terminado el revelado, se marcan las posiciones alcanzadas por los distintos solutos y se procede a calcular los diferentes R_f , cuya definición se ha dado anteriormente.

b) CRONATOGRAFIA ASCENDENTE MONODIMENSIONAL

En el desarrollo de los cromatogramas no es indispensable que la progresión por capilaridad se realice a favor de la gravedad. Era de esperar entonces que, al generalizarse los métodos de cromatografía sobre papel, aparecieran técnicas en las que el progreso del solvente se realizara en forma ascendente.

Su principal ventaja es la de requerir un material muy simplificado, y la escuela americana ha aceptado con entusiasmo este método.

La única diferencia con el método descendente es que la navecilla con el solvente se encuentra en la base de la cámara; por lo demás, vale todo lo dicho anteriormente respecto a las temperaturas, saturación, solventes, secado, revelado, etc.

c) CROMATOGRAFIA ASCENDENTE BIDIMENSIONAL

En este caso se procede como en el párrafo b) pero una vez realizado el primer desarrollo y secado, se gira la hoja de papel de filtro 90° y se procede a desarrollar en este sentido con el solvente necesario; resulta obvio que cada técnica indica la forma más apropiada de proceder.

CRONATOGRAFIA SOBRE PAPEL APLICADA A PORFIRINAS

1) PARA PORFIRINAS LIBRES

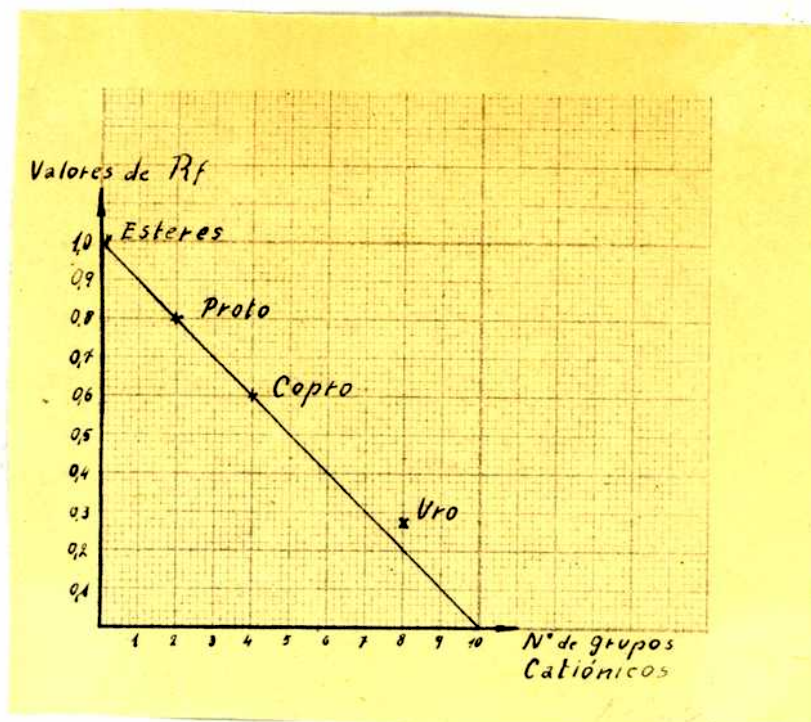
a) Método de Nicholas y Rimington

Es un método descendente. El material se coloca a 6 cm. de uno de los extremos de una larga tira (35 x 6cm) de papel de filtro Whatman N° 1. El papel se coloca de manera que uno de los extremos quede sumergido en un cristalizador con el solvente; este es una mezcla comercial de dos lutidinas (2-4 y 2-5 dimetil piridina). Todo el aparato está dentro de una cámara de vidrio hercética, conteniendo dos vasos de precipitado, uno con agua y otro con el solvente; en el trabajo original (14) se recomendaba saturar la cubeta con amoníaco, pero posteriormente (15) consiguieron que esto último era innecesario.

Los autores recomiendan especialmente el control de temperatura, debiéndose trabajar por debajo de 17°C siendo 5°C la temperatura óptima; por encima de 17°C las lutidinas empleadas se separan del agua, dejando de ser completamente miscibles con ella; al separarse las fases se arruina el cromatograma.

Otro factor que se debe tener en cuenta es la luz y los mejores cromatogramas se obtienen en ausencia de ella.

Con este método, Nicholas y Rimington han logrado separar las distintas porfirinas que normalmente se encuentran en material biológico animal. Además encontraron una relación lineal inversa entre el número de carboxilos que posee la porfirina y su Rf. Es decir que a mayor número de carboxilos, menor Rf, como se observa en el gráfico siguiente:



b) Método de Erikson (16)

Es un método de cromatografía ascendente. Se usa papel de filtro Whatman Nº 1 para cromatografía, cortado en rectángulos de 20 x 25 cm. y el material en cantidades de 0,1 - 1 microgramo aproximadamente, en solución de CHNH_4 2N; se coloca sobre el papel a una distancia de 2,5 cm. del borde del lado más corto mediante una pipeta capilar. La solución se pasa de la pipeta al papel por capilaridad; de esta forma se pueden obtener manchas tan pequeñas como se quieren. Generalmente no debe dejarse que las manchas tengan un diámetro mayor de 0,5 cm. La distancia entre cada toque no debe ser menor de 1 cm. y ninguna mancha debe quedar a menos de 4 cm. del borde más largo.

Es necesario hacer manchas testigos ("markers") pues puede haber pequeñas variaciones del Rf. Las manchas se secan con aire a presión o con secador de cabello, siempre a la temperatura ambiente.

Luego se da al papel la forma de cilindro, sujetándolo con ganchos capilares o hilo de seda; los bordes del lado más largo del papel no deben tocarse, pues puede correrse el solvente y arruinarse el cromatograma.

El cilindro se coloca en una caja de Petri que contiene como solvente, una mezcla de 5 volúmenes de 2-6 lutidina y 3 volúmenes de agua en proporción, hasta una altura de 0,5 cm. del fondo. En el centro de la caja se coloca una vasita de precipitado conteniendo NH_3 25%, para saturar.

La caja de Petri está colocada sobre una lámina de vidrio plano, que a su vez se encuentra sobre una mesa perfectamente horizontal.

Una cámara de vidrio, abierta únicamente en la base rodea al cilindro de papel de filtro.

Se deja desarrollar el cromatograma durante 4-5 horas, al cabo de las cuales el solvente subirá aproximadamente 15 cm; de preferencia se trabajará en ausencia de luz, pues las porfirinas en soluciones alcalinas son poco estables.

Por último el papel se retira y se seca en la forma arriba descrita (8); el cromatograma se revela a la luz ultravioleta.

El método de Eriksen permite separar las distintas porfirinas, obteniéndose resultados similares a los de Rimington y colaboradores, con las siguientes ventajas:

1º El solvente usado es miscible a la temperatura del laboratorio, y aún por encima de 40°C , lo que permite trabajar a temperatura ambiente, sin que se separen las fases

2º Requiere menos de tiempo de desarrollo; así un cromatograma puede ser revelado a la luz U.V. a las 4-5 horas de comenzado, mientras que con el método anterior se debía dejar entre 12 y 24 horas para su desarrollo total.

II) PARA ESTERES METILICOS DE LAS PORFIRINAS

a) Método de Chu, Green y Chu

Es un método ascendente, indicado para separar Uro I, Copro I, Copro III y Proto IX. Se utilizan dos sistemas diferentes como solventes: el primero es cloroformo-keroseno, y el segundo propanol-keroseno.

Se usa como soporte papel de filtro Whatmann N° 1 cortado en rectángulos 12,5 x 14,5 cm; se marca a 2 cm. del lado más largo con soluciones acéticas de los metil ésteres de las porfirinas, con pipeta capilar (más o menos 0,3 μ l por gata).

De esta forma, se hacen doce toques, luego se le da al papel la forma de un cilindro mediante dos ganchos de vidrio,

Mientras tanto, se satura una cámara de vidrio, que en síntesis consiste en un cilindro o un cubo de vidrio con una de sus bases abiertas, la cual se cierra herméticamente mediante un trozo de vidrio, perfectamente plano, teniendo cuidado de engrasar el borde contacto de la cámara con el vidrio que le sirve de tapa, la saturación se realiza con cloroformo, durante cinco minutos. Pasado este tiempo, en un cristallizador que se encuentra dentro de la cámara, se coloca, con una pipeta, 4 ml. de keroseno y 2,6 ml. de cloroformo.; para mezclar se debe inclinar varias veces la cá-

nasa, evitando que el solvente se ponga en contacto con el líquido de saturación.

Se deja desarrollarse el cromatograma 25' a 24°C (esta es la temperatura del laboratorio). Durante este tiempo, el solvente corre 75 mm. sobre la línea basal.

Se saca el cilindro y se coloca sobre una hoja de papel de filtro para que escurra un minuto; se marca con un lápiz el frente del solvente; luego se seca el horno, a 105-110° C durante 4'; inmediatamente se retira y se enfría a temperatura ambiente. A continuación se coloca el cilindro en una segunda cubeta del mismo tipo que la primera, que se habrá saturado con keroseno antes de introducir el solvente; dicho solvente consiste en una mezcla de 5 ml. de keroseno y 1 ml. de n-propil alcohol. Después que el solvente migra en el mismo sentido que durante el primer paso, durante 40', se retira el cilindro y se seca igual que anteriormente.

Una vez seco y a temperatura ambiente, se retiran los ranchitos y se mira con luz ultravioleta.

En el artículo original (17), los autores describen otros sistemas de solventes, pero el anteriormente explicado es el que da mejor resultados.

Resulta interesante hacer notar que Watson y colaboradores (18) trabajando con este método de Chu, Green y Chu han encontrado que, con cantidades menores que 0,4 microgramos de mezcla de Copro I y Copro III, la separación es deficiente, siendo el error a favor de la Copro III, mientras que para cantidades de mezcla de más de 0,5 microgramos el error es a favor de la Coproferina I.

b) MÉTODO DE FALK Y BENSON

Se trabaja en forma ascendente. Los materiales usados son los siguientes:

Kerosene destilado sobre Cl_2Ca , se utiliza la fracción que pasa entre $190-250^\circ\text{C}$.

Cloroformo, lavado tres veces con agua y secado sobre Cl_2Ca .

Cloroformo estabiado: al cloroformo tratado como se dijo anteriormente, se añade estanoen una concentración de 1% (v/v).

Dioxano: se debe purificar con el método de Sinsberger.

N propil alcohol: se debe redestilar, tiene un punto de ebullición de $95-97^\circ\text{C}$.

La cámara es similar a la utilizada en el método de Chu, Green y Chu; es un cilindro o tubo de vidrio con una base abierta; se apoya sobre una mesa perfectamente plana por el extremo cerrado; la base abierta se cierra con un vidrio plano, engrasando el borde de unión; el solvente se coloca en un cristallizador y el solvente de saturación, se vuelca directamente sobre el piso de la cámara.

Método

Se corta un cuadrado de 20 cm. de lado, de papel Whatman N° 1. Se efectúan toques a 2 cm. de un borde, con soluciones cloroformicas de porfirinas. Se le da al papel la forma de un cilindro, mediante un hilo de seda, o mejor aún con ganchitos capilares de vidrio. Luego se hacen los dos desarrollos siguientes:

1º Solvente: keroseno-cloroformo etanólico:atmósfera: cloroformo.

El papel se desarrolla con un solvente constituido por una mezcla de keroseno (4 ml.) y cloroformo etanólico (6 ml.) hasta que las manchas de porfirinas se hayan movido un tercio del alto del papel. Esto se retira y se seca.

Según los autores (19) con este desarrollo se logra que la Uro I y la Uroporfirina III de la turacina, descrita por Himington, se corran hasta la misma altura, es decir que todavía no hay separación, pero en la mancha inicial quedan las impurezas que puedan tener estas porfirinas y que pueden molestar en el paso siguiente.

Después de secado, se mira el papel con luz U.V. se marcan hasta donde se han corrido las porfirinas. Inmediatamente se recorta la base del papel 0,5 cm. por debajo de las manchas que han corrido, eliminando las no móviles.

2º Solvente: keroseno-dioxano:atmósfera:dioxano.

El papel con el pedazo cortado se desarrolla en la misma dirección que antes, mediante un solvente constituido por una mezcla de keroseno (4ml) y dioxano (1,5ml) no permitiendo al solvente llegar hasta el borde superior del papel. Inmediatamente se retira el cilindro de la cámara y se seca a la manera anteriormente descrita. Luego se mira con luz U.V. debidamente filtrada.

En el artículo citado, Paik y Benson combinan este método para Uroporfirinas con el de Chu y colaboradores, que separa los isómeros de la Coproporfirina.

De esta manera logran según ellas, separar Uro I

Uro III, Copro I y Copro III.

El método es el siguiente:

1º Se coloca una mancha con la mezcla de porfirinas en el extremo derecho inferior de un cuadrado de 20 cm. de lado de papel Whatman N° 1, a 2 cm. de ambos lados.

Se hace un cilindro y se desarrolla según el método completo de Chu, Green y Chu, ya arriba descrito. Con este primer desarrollo las Uroporfirinas quedan cerca de la línea basal, mientras que las Copro y la Protoporfirina están en la parte superior del papel. Se mira con luz U.V., se marcan las manchas, y el papel se corta paralelo a la línea de base y justo por encima de la mancha de Uroporfirina, quedando en el pedazo más grande, las Copro y la Protoporfirina.

2º La tira angosta, con las Uroporfirinas, girada 90º con respecto a la posición anterior se desarrolla según el paso 2º del método de Falk y Benson, como se vé, este es un método bidimensional para las uroporfirinas.

PORTE EXPERIMENTAL

En el presente trabajo utilizamos las siguientes porfirinas:

PROTOPORFIRINA II: obtenida a partir de la hemoglobina por el método de Ginstain (3).

COPROPORFIRINA I y III: aislada de orina de porfiricos.

UROPORFIRINA I (congénita): aislada de orina de porfiria congénita.

UROPORFIRINA I (maldestrog): aislada de orina de porfiria cutánea tarda.

UROPORFIRINA 200 o FICOPORFIRINA III: aislada de orina de porfiria cutánea tarda.

En los distintos cronogramas se emplearon mezclas de las porfirinas anteriores, en forma libre o esterificada, y también mezclas de porfirinas extraídas de orina de porfiria cutánea tarda, con acetato de etilo, según describe el método (8), no separadas previamente por la columna de CO_2/Ca .

La concentración de las porfirinas ha sido determinada mediante un espectrofotómetro de Beckman D U, utilizando los coeficientes de extinción obtenidos por Salmán (20) y aplicando la siguiente fórmula:

Concentración (microgramos por 100 ml) = Constante x densidad óptica

$$\text{Constante} = \frac{1 \times 10^6}{\text{coef. de extinción}}$$

Los valores de las constantes y la longitud de onda correspondiente a la absorción medida figuran en el cuadro I.

CUADRO I

PORFIRINA	CONSTANTE	LONGITUD DE ONDA
208 a Piriroporfirina (1)	776	404 mμ
Uroporfirina I (suave) (1)	376	404 mμ
Uroporfirina I (kald.) (1)	423	404 mμ
Coproporfirina I (2)	172,7	403 mμ
Protoporfirina IX (1)	357	404 mμ

(1): esteros metílicos en solución cloroformica.

(2): forma libre, en soluc.clorofórmica 5%.

Para separar estas porfirinas, trabajamos con los métodos de Nicholas y Birmingham; Erikson; Chu, Green y Chu; Falk y Bersan, y el combinado de los dos últimos, en la forma arriba descrita.

Para el método de Erikson utilizamos el aparato de la figura I.

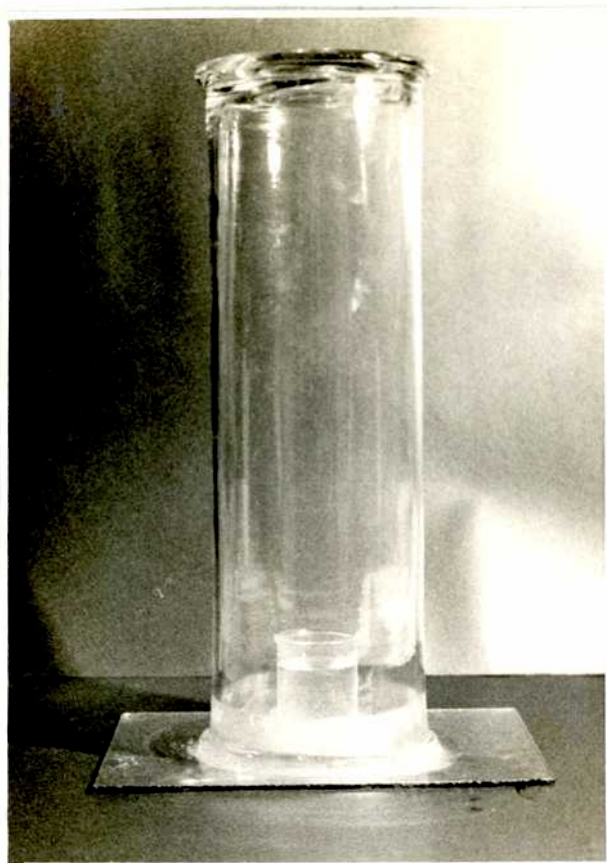


FIGURA 1

En el método de Chu, Green y Chu y en el de Falk y Benschop, se usaron las cámaras expuestas en la figura 2

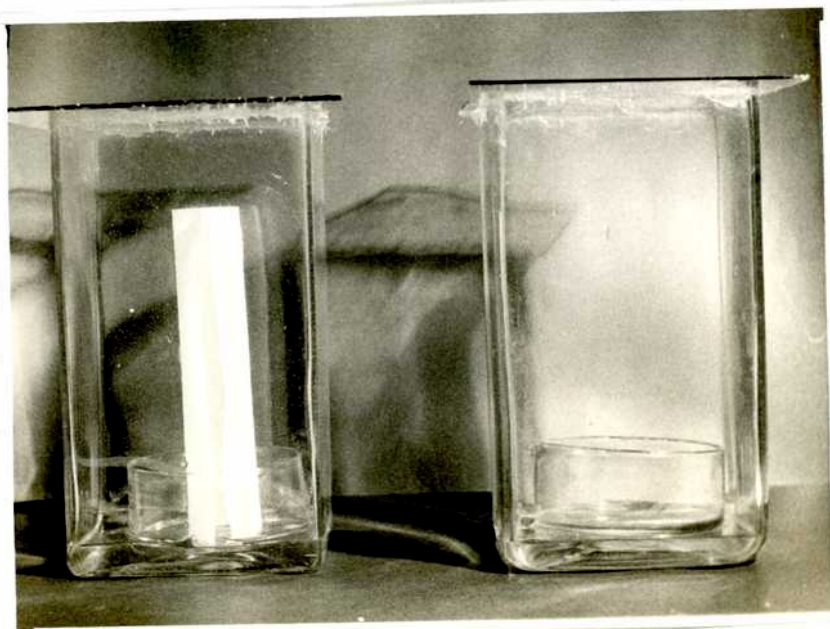


FIGURA 2

El papel de filtro empleado fue el de Whatman N° 1 para cromatografía (*); se ensayó con papel Delta, no obteniéndose buen resultado.

En los métodos accidentales se le dió al papel la forma de un cilindro, tal como lo aconsejaba la técnica; los bordes se sostenían mediante un hilo de cocar blanco, pero luego se cambió esto por ganchitos capilares de vidrio, los mejores resultados los hemos obtenido con ganchitos del tipo expuesto en la figura 3.



FIGURA 3

En cuanto al secado de los cromatogramas, debe decirse que el método de Krikian presenta un inconveniente; el autor aconsejaba secar con aire a la temperatura ambiente (16) y como no se disponía de ventilador y campana, los vapores de lutidina pasaban a la atmósfera del laboratorio.

Se evitó esto, secando a estufa entre 90° y 105° C, debe consignarse que no se notaron modificaciones al cambiar la técnica del secado, en lo que se refiere a posición de manchas, etc. Tampoco se notó diferencia apreciable tratando en la obscuridad y con la luz del laboratorio.

En todos los cromatogramas efectuados, la posición de las distintas porfirinas ha sido establecida por comparación con testigos (markers) de porfirinas conocidas. Hemos considerado conveniente, en general, no

(*) cedido gentilmente por el profesor Arturo L. Cairo.

determinar M por ser difícil de calcular dada la forma irregular con que se presentan las manchas de porfirinas.

RESULTADOS

1º) METODO DE NICHOLAS Y RIMINGTON

Dificultades de orden técnico nos impidieron utilizar esta técnica satisfactoriamente. El inconveniente surgió al tratar de reproducir el solvente usado por los autores, quienes no especifican la composición exacta de la mezcla de las lutidinas usadas, sino que expresan haber usado una mezcla comercial (14, 15).

Por nuestra parte, hemos probado con gran cantidad de mezclas diferentes de 2:4-2:5 lutidina-agua, sin haber logrado resultados satisfactorios.

Tratando de solucionar este problema, nos dirigimos a los proveedores del producto usado en el laboratorio del profesor Rimington, es decir la Yorkshire Tar Distiller England, la que solo nos facilitó los valores correspondientes al peso específico, la humedad y la carga de destilación, sin suministrarnos los datos correspondientes a la proporción de los distintos isómeros.

Además fué posible separar una mezcla de Protoporfirina IX, Coproporfirina I, Firiaporfirina III y Uroporfirina I (congénita). Ver figura 5.

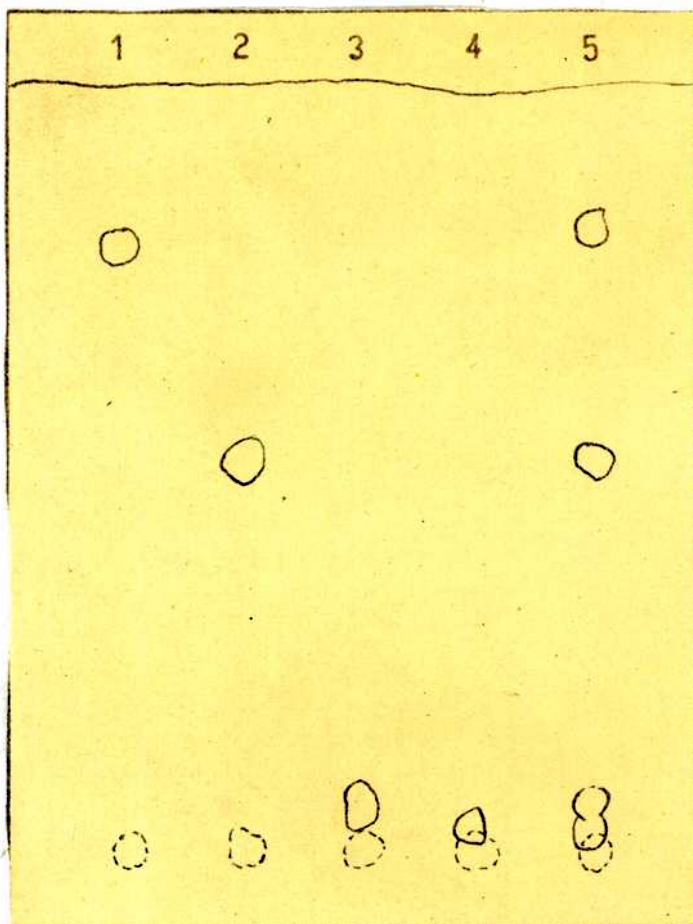


FIGURA 5

- 1: Protoporfirina IX
- 2: Coproporfirina I
- 3: Firiaporfirina III o Porphirina 208
- 4: Uroporfirina I (congénita)
- 5: Proto IX Copro I Firis III Uro I (cong)

Como puede apreciarse, la separación de la Firis III de la Uro I no es tan neta como en el método de Falk y Benson, del que hablaremos luego, pero es bien definida como corresponde a dos entidades distintas.

Estos resultados han sido obtenidos con 2-6 Intidina 955 E. Kodak P 4820*. Debemos hacer hincapié en el

(*) Facilitado por gentileza del profesor Dr. V. Mauloufou

hecho que el uso de la 2-6 latidina de la casa Light England no nos ha permitido reproducir dichos resultados.

3º) METODO DE CHH. GIBBE Y CHU

Hemos trabajado con este método, tratando de lograr una separación de la Uroporfirina I y la Firioporfirina III, pero los Rf de las manchas resultan prácticamente los mismos y en ningún cromatograma hemos obtenido resultados aceptables.

La mezcla de Uro I y 208 queda en la base, casi en el lugar de origen, alargándose en forma de pera.

4º MÉTODO DE FALK Y BENSON

Este método resulta el más conveniente pues permite separar con mucha facilidad y rapidez la Uroporfirina I y la Porfirina 208 o Piriaporfirina III.

Desearnos hacer notar que Falk y Benson describieron este método para separar los isómeros I y III de la Uroporfirina, dando como valores de los Rf 0,02 y 0,5 respectivamente.

En nuestro trabajo hemos utilizado Uroporfirina E (congénita), Uroporfirina I de Waldenström y Piriaporfirina III, obteniéndose como Rf 0,02 - 0,04 y 0,45-0,50, respectivamente.

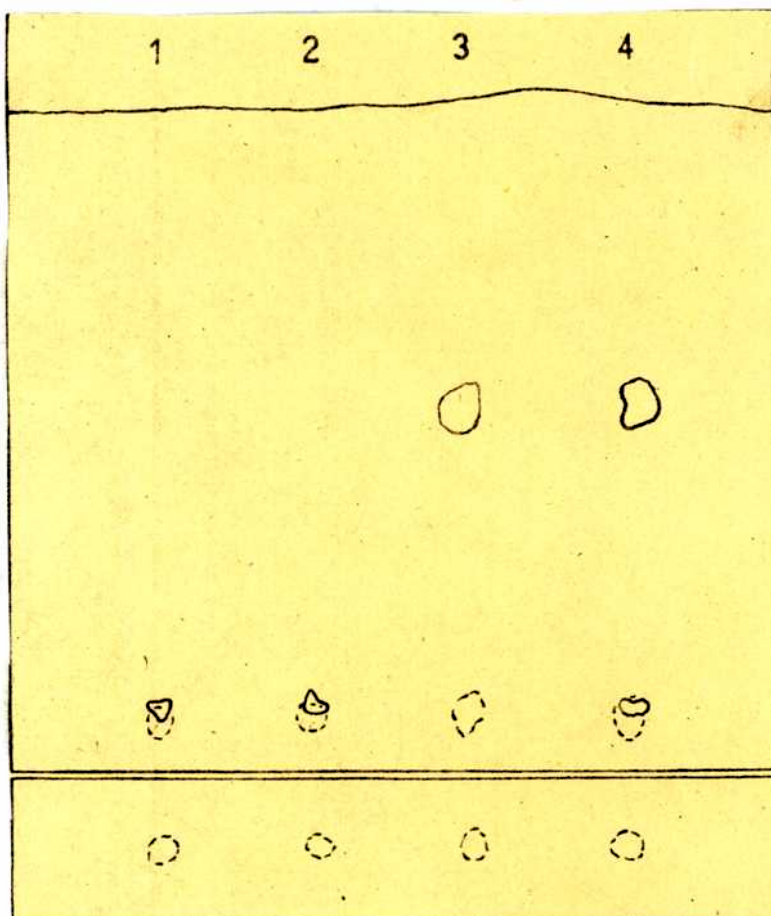


FIGURA 6

FIGURA 6

- 1: Uroporfirina I (congénita)
- 2: Uroporfirina I (Waldeström)
- 3: Firiaporfirina III
- 4: Uroporfirina I (cong) Uro I y Firia III

Como se ve, el Rf de la Uroporfirina I congénita coincide con el de la Uroporfirina I de Waldeström, y el de la Porfirina 208 es definitivamente distinto.

Estos Rf corresponden a valores obtenidos trabajando con cantidades de porfirinas de 0,25 a 1 microgramo. Se encontró que para valores superiores, por ejemplo 5 μ g, los cromatogramas no son tan buenos.

Con 0,25 microgramos las manchas resultaron aún bien visibles. Sin embargo consideramos que una cantidad muy aconsejable a usar es de 0,5 a 1 microgramo.

En la figura 7 exponemos una foto del cromatograma obtenido con mezclas de distintas proporciones de Firia III y de Uro I (congénita); dichas proporciones están indicadas en el cuadro 2.

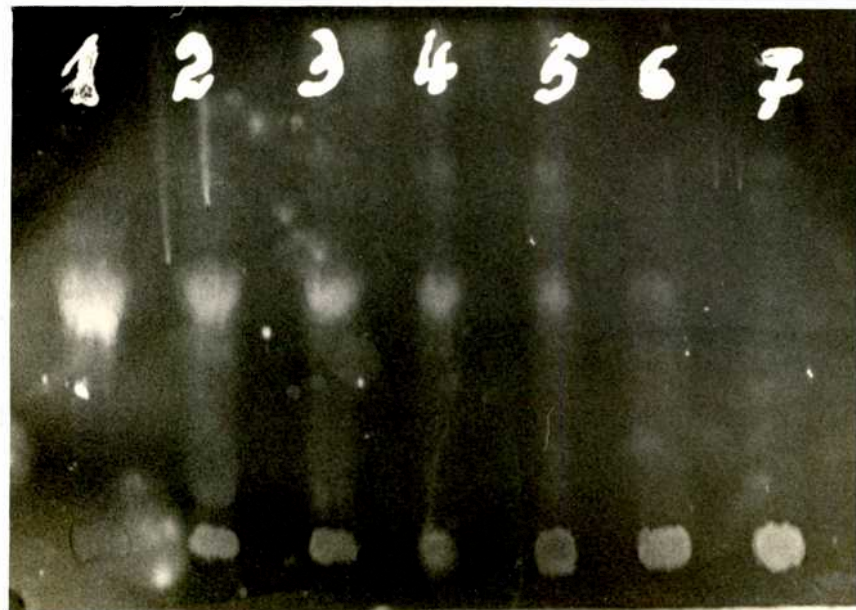


FIGURA 7

Esta foto ha sido obtenida, usando una cámara Rollobflex, objetivo: Tessar 1:3,5; filtro Kodak anaranjado F/IV/32 diafragma 5,6, tiempo de exposición: 5 minutos, distancia: 80 cm. La película usada fue: Kodak Tri-X, 200 ASA, 24 Din.

Mancha	Frisporfirina III		Uroporfirina I	
	en%	en mg	en%	en mg
1	100	1,00	0	0
2	90	0,90	10	0,10
3	75	0,75	25	0,25
4	50	0,50	50	0,50
5	25	0,25	75	0,75
6	10	0,10	90	0,90
7	0	0	100	1,00

CUADRO 2

Puede apreciarse en la foto de la figura 7 que el método de Folk y Benson permite separar la 208 de su mezcla con la Uroporfirina I, ya sea congénita o de síntesis, aún en concentraciones de 10 y 90%, respectivamente. Por otra parte, hay una cierta relación entre la intensidad de fluorescencia y la cantidad de las distintas porfirinas.

Es interesante consignar un hecho frecuente, que es la aparición de manchas y estelas entre la Uro I y la 208; dichas manchas y estelas aparecen también sobre la mancha de la Uroporfirina I sola, mientras que no se aprecian utilizando la 208 sola.

Todos los cronotogramas anteriores se realizaron con porfirinas puras; pero en otra serie de trabajos se realizaron toques con mezclas de porfirinas aisladas directamente de orina de porfiria cutánea tarda, previamente esterilizadas.

Un cronotograma representativo es el de la foto siguiente (figura 8).

Ha sido obtenida en las mismas condiciones que la de la figura 7, habiéndose variado solamente el tiempo de exposición, en este caso es de 10 minutos.

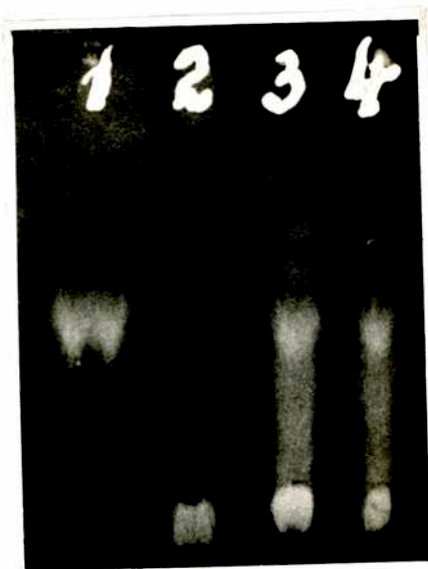


FIGURA 8

- 1: testigo de Firiaporfirina III
- 2: testigo de Uroporfirina I
- 3: Mezclas de porfirinas de porfiria cutanea tarda.
- 4: Mezclas de porfirinas de porfiria cutanea más diluida.

Se observa que la Firia III no da estela, mientras que la Uro I da una estela que sobrepasa la mancha de la anterior.

En 3 y 4 se distinguen perfectamente las manchas de Uro I y 208. También es posible notar una fluorescencia por encima de la Firiaporfirina III.

No se observan las porfirinas no identificadas aún de 5 y 6 carboxilos, ni las coproporfirinas I y III, aisladas por la columna de CO_3Ca (8), muy posiblemente debido a que la cantidad presente en el material está por debajo de la acusable mediante este método. Debemos recordar

que la proporción de estas porfirinas es relativamente muy pequeña con respecto a la de Uro I y Uro II.

5º) MÉTODO COMBINADO DE CHU, ORRIS Y CHU, FAIR Y BENSON

Con este método se trabajó tratando, especialmente, de separar las porfirinas de masas obtenidas directamente de orina de enfermos porfiricos.

Los resultados que se obtuvieron fueron los siguientes:

En el primer desarrollo no se pudo separar las Coproporfirinas; la mancha se alarga, pero no hay ninguna separación. Con el segundo desarrollo se logra separar Uro I y la Piria III, en la forma descrita en el método de Fair y Benson.

Los resultados que hemos obtenido con la aplicación de este método, no implican la no existencia de Coproporfirinas I y III en la masa utilizada, sino que estaría en una proporción tal que el método no permitiría revelar su presencia.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El análisis de los resultados obtenidos permite concluir lo siguiente:

1º) La aplicación del método de la 2-6 lutidina de Eriksen demuestra que la Firiaporfirina III da una mancha única en posición distinta a la correspondiente a la Uroporfirina I. Al igual que en la columna de CO_2/Ca su posición es muy vecina a la de la Uroporfirina I.

2º) a.-Confirmando ensayos anteriores del laboratorio de Watson, se demuestra mediante el método de Falk y Benson que la Firiaporfirina III se separa perfectamente de la Uroporfirina I; igual que en el método de Eriksen la Firiaporfirina III da una mancha única. Dicha separación ocurre con mezclas de Firis III y de Uro I en proporciones que varían de 10% de Firiaporfirina y 90% de Uroporfirina III a 90% de Firiaporfirina III y 10% de Uroporfirina I.

b.-La Uroporfirina aislada de la Porfirina de Waldeström de orina de porfiria cutanea tarda, se comporta de la misma manera que la Uroporfirina I aislada de orina de porfiria congénita, siendo esta última considerada como la Uroporfirina I típica.

Debemos recordar que Watson, utilizando el mismo método, encuentra que la Uro I aislada de Porfirina de Waldeström de orina de porfiria aguda, se comporta de la misma manera que la Uroporfirina I congénita. Esto constituiría una prueba más que permite concluir que la Uroporfirina I de la Porfirina de Waldeström

trón aislada de orina de porfiria cutánea tarda es igual a la de la porfiria aguda e igual a la Uroporfirina I de porfiria congénita.

Se observa con frecuencia que la Uroporfirina I, tanto congénita como de maldestrón y sus mezclas con la Firioporfirina III, de estelas y manchas que por su posición, podrían confundirse con la Uroporfirina III de la turacina, habiéndose sido observado esto también en el laboratorio de Watson (21); esas manchas harían pensar que existe una tendencia a formar una mezcla o combinación molecular que se comporta en este método cromatográfico como una entidad química.

El método de Falk y Benson también permite separar la Firioporfirina III de la Uroporfirina I de mezclas de porfirinas aún impuras, separadas directamente de la orina y sometidas a la esterificación (Fig. 8).

M. L. S. +

Matthe J. Barroquero

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Thudichum, J.L.-Rep.Med.Off.Privy Coun., 10 Apéndice 7,227,1867 (Citado por C.Rimington en Endeavour, pp 126, vol.14 Nº 55-1955.
- 2.- Hoppe Seyler, F.- Med.chem.Untersuch, Nº 1, 4, 1871
- 3.- Grinstein, M.- J.Biol.Chem, 167 pp 515, 1947
- 4.- Van den Bergh A.A.H., Regniers and Müller P.-Arch.f. Verdaungs.
- 5.- Macdonald and Stedman.- J.Am.Chem.Soc. 75, 30, 40, 1953.
- 6.- Waldeström J.- Acta Med.Scandinav., Supp 82, 1937/
- 7.- Fischer and Hilger J.- Z. physiol. Chem, 128, 167 1923.
- 8.- Grinstein, M.- La Prensa Médica Argentina Nº37, pág. 2863, vol XLII 1955.
- 9.- Grinstein, M. Schwartz S. and Watson C.-J.Biol.Chem 157 323, 157.
- 10.- Günther H.- Deutches Arch. F. Klin.Med., 105:89,1911 (citado en 8)
- 11.- Watson C.J.- Porphyrha Advances in Internal Medicine, vol VI, Year Book Publishers, Inc Chicago 1954, pág. 235.
- 12.- Borda, J.M.-Porfirinas y Porfirias. Editorial López y Etchegoyen, 1946.
- 13.- Gordon, A.H., Martin A.J.P. y R.L.M.Synge.-Biochem.J. 37, 79, 1943.
- 14.- Nicholas and Rimington C.- Scand J.clin.Lab.Invest.] 12, 1949.
- 15.- Nicholas R. and Rimington C.- Biochem.J.48, 306, 1951.
- 16.- Eriksen L.-Scand.J.clin.Lab.Invest.;5, 155, 1953.
- 17.- Chu T.C.; Green A.A.. and Chu E.J.- J.Biol.Chem, 190 643, 1951.
- 18.- Watson C.J. and Bergh M.- J.Biol.Chem., 214, 537, 1951.
- 19.- Falk J.E. and Benson A.- Biochem.J.55, 101, 1953.
- 20.- Salóm Y.- Estudio espectrofotométrico de la Porfirina de Waldeström, Uroporfirina I y Porfirina 208. Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales en 1955.
- 21.- Watson C., Bergh M., and Hawkinson V.- J.Biol. Chem. 214, 551, 1955.