

## Tesis de Posgrado

# Determinación cromatográfica de Colina, Colamina y Serina en la fracción fosfolípidos de germen de trigo y en la lecitina de soya

Pisarello Adorni, María Lydia

1957

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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Pisarello Adorni, María Lydia. (1957). Determinación cromatográfica de Colina, Colamina y Serina en la fracción fosfolípidos de germen de trigo y en la lecitina de soya. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_0914\\_PisarelloAdorni.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0914_PisarelloAdorni.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Pisarello Adorni, María Lydia. "Determinación cromatográfica de Colina, Colamina y Serina en la fracción fosfolípidos de germen de trigo y en la lecitina de soya". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1957.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_0914\\_PisarelloAdorni.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0914_PisarelloAdorni.pdf)

7.19.3

DETERMINACION QUANTITATIVA DE COLINA, COLAMINA Y SERINA EN  
LA EXACCION FOSFOLIPIDOS DE GERME DE TRIGO Y EN LA  
LECITINA DE SOYA

RESUMEN

Sobre fosfátidos de vegetales, cuyos principales componentes nos propusimos determinar en el presente trabajo, la bibliografía es bastante menor que en caso de fosfolípidos de fuentes animales. La cantidad de fosfátidos presente en soya y trigo varía con el procedimiento de extracción, procedencia de la muestra, calidad de la misma, época del año etc, hallándose para soya valores desde 1,5% hasta 3,2% y de 0,6% hasta 1,6% en germen de trigo.

Los constituyentes de los fosfolípidos en vegetales se identificaron con los de fuentes animales, con la única diferencia de no haberse hallado esfingomielinina en los primeros, hasta el presente. La característica de fosfolípidos de soya y trigo es su existencia en forma de complejos carbohidrato-fosfátido-proteína, cuya naturaleza, en la mayoría de los casos, no es de tipo químico, ya que los fosfátidos se liberan totalmente por acción de solventes específicos.

Para la determinación de los fosfátidos totales, es necesario una extracción completa del material y valoración de los mismos en el extracto.

Se trabajó con un germen de trigo argentino, procedente de Pergamino. Luego de una molienda conveniente del germen, se lo extraía de acuerdo a la técnica de Rewald (1937) C.A. 31,6354. en un aparato continuo con una mezcla de benceno-alcohol(4:1) durante 36 hs e igual tiempo con alcohol de 96%. Una vez aislados los fosfolípidos, pueden seguirse 3 caminos para su valoración: a) el método oxidativo o de Bloer, b) por el contenido en ácidos grasos y c) por determinación del contenido en P. Este di-

timo método es el más común y exacto, por la cantidad de técnicas existentes para valorar este elemento y fué el adaptado por nosotros. Para ello, el residuo, de la extracción, luego de eliminar el solvente y secado convenientemente a vacío, se sometía a hidrólisis con  $\text{ClH } 6\text{N}$  a ebullición durante 24 hs, con el objeto de liberar las bases nitrogenadas de los fosfátidos, de la unión con el ácido fosfórico, obteniéndose así ác. fosfoglicérico, elorhidrate de colina, colamina, serina y ácidos grasos, que se eliminaban luego por filtración. Sobre ese hidrolizado se determinaba P y las bases nitrogenadas. Para P, se usó un método colorimétrico, debido a Beveridge y Johnson (1949) Can. J. Research 27, 2, 159, consistente en la conversión del ác. fosfórico a ác. fosfomolibdico y su posterior reducción a azul de Mo. El reactivo consistía en Sulfato de hidrazina- molibdato de sodio. El color azul obtenido era estable 24 hs y su intensidad se medía con el espectrofotómetro.

De todas las determinaciones efectuadas sobre 2 muestras distintas de germen de trigo, se obtuvo el valor promedio de 1,58% de fosfátidos totales, con un máximo de 1,64 y un mínimo de 1,57%.

Con igual técnica se analizaron 2 muestras de Lecitina de soya comercial, hallándose un promedio de 49,76% de fosfátidos totales.

666

La determinación de los constituyentes principales de los fosfátidos es importante por su rol en los procesos metabólicos.

Para ello pueden separarse previamente las distintas fracciones que los contienen: lecitinas, cefalinas e inositol fosfátidos y determinar cada una en la fracción correspondiente o bien valorarlas directamente en el hidrolizado. Este último es lo más aceptable para microcantidad a como en nuestro caso, ya que está sujeto a menos fuentes de error.

De los métodos existentes para la localización y valoración de colina, colamina y serina por precipitación de sales insolubles, colorimétricos etc, se deduce que los cromatográficos, de-

sarrollados en los últimos años, son los más rápidos, convenientes y precisos para el análisis de microcantidades de estas sustancias.

Se aplicaron a los hidrolizados de germen de trigo y lecitina de soya, técnicas cromatográficas sobre papel, descritas para el caso de constituyentes de fosfolípidos cerebrales. (Levine, Chargaff y Green: J. Biol Chem 175, 67 (1948)).

Se ha desarrollado un mismo cromatograma para la localización de colamina y serina y otro aparte para celina; en todos los casos el papel usado fué Schleicher Schull N° 597. Se cortaron rectángulos de papel de 50 cm de altura y ancho variable según las muestras a desarrollar y a 2,2 cm del borde inferior se colocaban gotas de 0,01 cc con una pipeta capilar calibrada y suficientemente separadas y se sometían a cromatografía unidimensional durante 18 hrs en cámaras de vidrio herméticamente aisladas y saturadas previamente con el solvente a usar. Los solventes usados fueron: a) n-BuOH - Morfe-lina (3:1); b) n-BuOH - Piridina (4:1); c) n-BuOH - Diexano (4:1) y n-BuOH - Agua - Ameníaco (50:7:3).

La técnica de revelado era común para colamina y serina: los papeles se secaban al aire (solvente a) ó a 90° (solventes b, c y d) durante 30 a 60 minutos; luego se pulverizaban con solución de ninhidrina al 0,1% en n-BuOH y luego de 5-10 minutos de calentamiento en estufa a 90°C, se desarrollaba el color rosado de las zonas ocupadas por estas sustancias.

Para localizar celina, se secaban los papeles al aire y luego en estufa, se pulverizaban con solución acuosa de ác. fosfomolib-dico al 2% y se lavaban en inmersión en n-BuOH y luego en agua. Finalmente se sumergían en solución recién preparada de Cl<sub>2</sub>Sn al 0,4% en ClH 3N y de este modo las manchas amarillas tenues de fosfomolib-dato de celina, se transformaban en manchas azules bien definidas, de azul de melibdeno. Estas manchas cumplen la Ley de Beer y se aprovechó esta circunstancia para su determinación cuantitativa, per

# FOFNA

medición de la intensidad del color de las mismas con un densitómetro se medían las áreas correspondientes con un planímetro y el contenido de colina se hallaba mediante un cálculo simple.

Para la determinación cuantitativa de colina y serina, se usó la técnica de Naftalin: Nature 161, 763 (1948). Se localizaban las manchas con solución al 0,05% de ninhidrina en n-BuOH y se recortaban dejando un margen. Se colocaban en tubos de ensayo y se trataban con solución bufferizada de ninhidrina al 5% en n-BuOH y se colocaban en baño de agua para desarrollar el color violáceo, estable aproximadamente 12 hrs. Las intensidades de color se leían en un espectrofotómetro previamente calibrado y a 650 mμ.

En todos los casos se operó al mismo tiempo con el hidrolizado de lecitina de soya. Los valores obtenidos para estas 3 sustancias, coinciden, dentro de ciertos márgenes, con los hallados en la literatura.

	Germea	Lecitina
Clorhidrato de colina (mgr/gr)	23,22	29,20
Serina (mgr/gr)	1,37	13,27
Colamina (mgr/gr)	0,235	7,29

## ( CONCLUSIONES - )

- 1) Se ha encontrado que la cantidad de fosfolípidos totales obtenida con el método de valoración de P, está de acuerdo con la hallada en la literatura para este tipo de material.
- 2) Dada la pequeñísima proporción en que se hallan la colina, colamina y serina en los vegetales, se aplicaron técnicas cromatográficas sobre papel para su caracterización, separación y determinación cuantitativa, las que han sido ampliamente desarrolladas para el caso de componentes de fosfolípidos de cerebro.
- 3) Se ensayó el uso de diversos solventes: n-BuOH - Morfolina (3:1);

# FOFNA

nBuOH-Dioxano(4:1) (b); nBuOH-Piridina(4:1) (c) y nBuOH-NH<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O (50:3:7) (d) determinándose los Rf correspondientes a las tres sustancias, previo ajuste de las técnicas mediante el uso de sustancias puras.

4) La serina y colamina se revelaron en un mismo cromatograma y la de colina en cromatograma aparte, usando las mismas técnicas que en el caso de fosfolípidos cerebrales.

5) La localización de serina y colamina, desarrolladas con solvente (c), se hizo además mediante el uso de luz ultravioleta, de acuerdo a la técnica de Philips.

6) Se eligió para cada sustancia el solvente con el que se obtenían manchas más nítidas y se ensayó en ellos la "Cromatografía cuantitativa". Se determinó además en cada caso, el límite de concentración de sustancia necesario para su identificación cromatográfica y el rango preferido para la misma.

La Colina se valoró por densitometría del color azul obtenido reduciendo las manchas de fosfomolibdato de colina con Cl<sub>2</sub>Sn en el papel. Los valores obtenidos son:

	Germea	Lecitina
Clorhidrate de colina(mgr/gr)	3,22	29,20

Las determinaciones efectuadas con colina pura empleando el mismo método, indican que dicho método da valores correctos.

7) La valoración de Colamina y Serina se realizó usando técnicas combinadas de cromatografía en papel con métodos cuantitativos estándar.

Encontramos que el solvente (b) es el que daba los mejores resultados por la diferencia de valores de los Rf.

8) La aplicación del método de Naftalin (93) de elución de las manchas de la reacción con la ninhidrina y su medición con el espectrofotómetro, para aminoácidos, dió muy buenos resultados con Serina y se encontró que es también aplicable, con ligeras modificaciones, en el caso de la Colamina, hallándolo válido

dentro de un amplio margen de concentraciones de la misma.

9) En todas las etapas del trabajo, se realizaron simultáneamente las mismas determinaciones sobre una muestra de Lecitina de soya comercial, como control y guía, dado su reconocido contenido en Colina, Colamina y Serina.

10) Los valores obtenidos con la aplicación por vez primera de las técnicas descritas a este tipo de material, son del orden de las halladas por otros autores con los métodos comunes de la Química analítica cuantitativa, solo que con la aplicación exitosa de la cromatografía, disponemos de un método rápido, elegante y relativamente sencillo para la determinación de Colina, Colamina y Serina en cereales, que de otro modo sería largo y tedioso dada la complejidad del material.

---

*J. P. S. P. S.*

FCENBA.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Determinación cronotérmica de Colina, Colarina  
y Serina en la fracción fosfolípica de Cermen de  
Trigo y en la Lecitina de Soya.

Tesis presentada  
por

MARIA LYDIA FIGARELLO

Para optar al título de Doctora en Químicas.

TESIS 914

1957

Y  
tesis 914



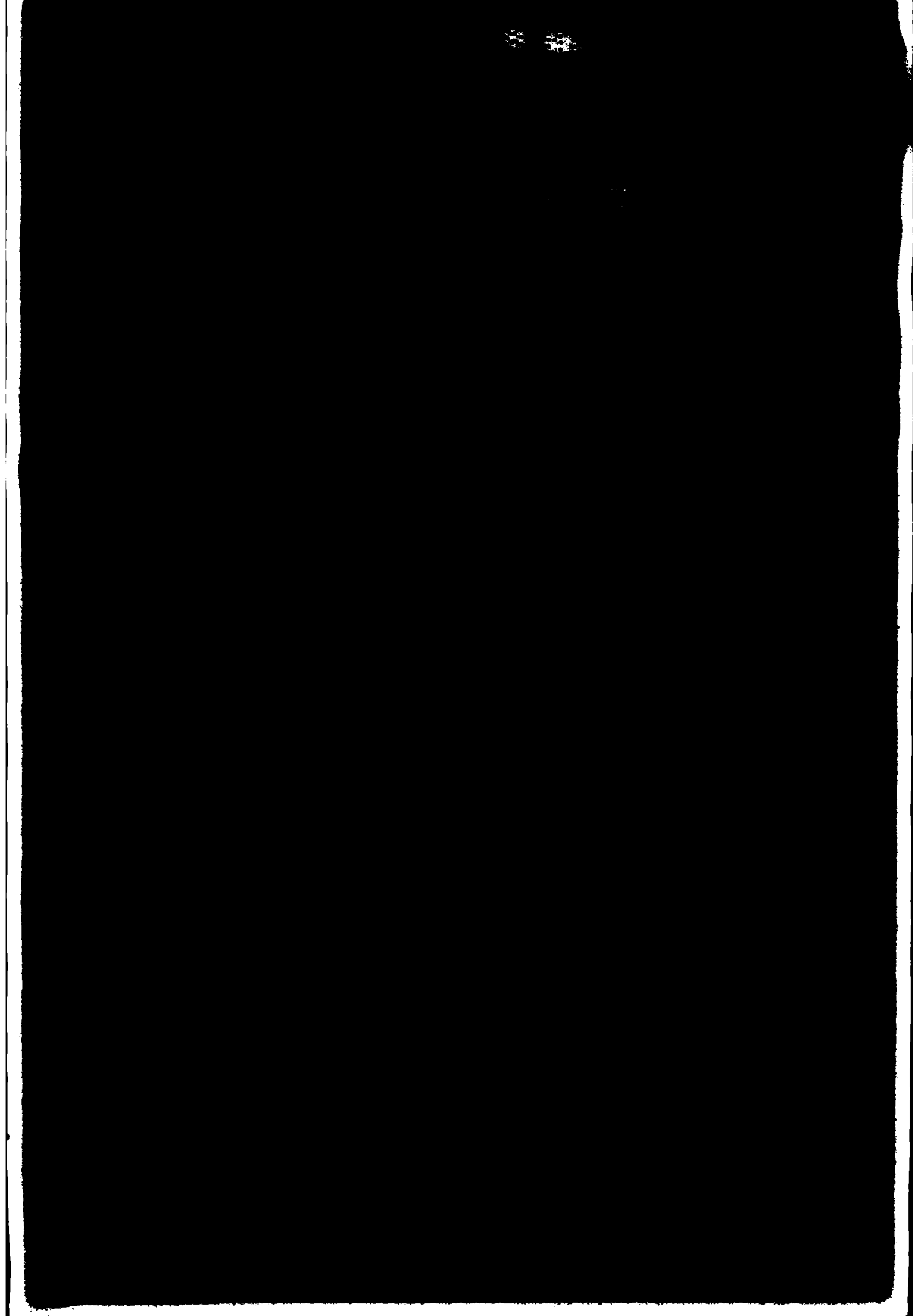
UNIVERSIDAD

Trabajo de Tesis

dirigido por el Profesor

Dr. Jorge R. Mendive

Expreso mi más sincero agradecimiento al Sr. Profesor Titular de Química Biológica, Dr. Jorge M. Mendive, por haberme guiado en la realización del presente trabajo, poniendo siempre a mi alcance el bagaje de sus conocimientos y experiencias; al señor Dr. Aldo E. A. Mitta, por su dedicación e inapreciable apoyo; a la Dra. Beatriz Heir y a todos los que de alguna modo cooperaron en la realización de esta Tesis.



## INDICE

<b>LOS FOSFOLIPIDOS</b>	<b>Pág.</b>
<b>Fosfolípidos de vegetales</b>	<b>1</b>
<b>Extracción y determinación de fosfolípidos totales</b>	<b>10</b>
<b>Constituyentes fundamentales de los FOSFOLIPIDOS.</b>	
<b>Su determinación</b>	<b>15</b>
<b>Colina - Su determinación</b>	<b>17</b>
<b>Colamina - Su determinación</b>	<b>22</b>
<b>Serina - Su determinación</b>	<b>25</b>
<b>Cromatografía en papel aplicada a Colina, Colamina y Serina</b>	<b>27</b>
<b>PARTE EXPERIMENTAL</b>	
<b>Consideraciones generales</b>	<b>32</b>
<b>Preparación del material y extracción de los fosfolípidos</b>	<b>33</b>
<b>Hidrólisis de los fosfolípidos del Germen</b>	<b>35</b>
<b>Hidrólisis de Lecitina de Soya</b>	<b>36</b>
<b>Determinación de Fosfolípidos totales</b>	<b>37</b>
<b>Calibración del aparato para determinación de fósforo</b>	<b>40</b>
<b>Investigación de Colina, Colamina y Serina en hidrólisis de Germen de trigo y Lecitina de Soya</b>	<b>44</b>
<b>Técnica de Revelado</b>	<b>46</b>
<b>Cromatogramas de Colina (fotografías)</b>	<b>49</b>
<b>Cromatogramas de Colamina y Serina (fotografías)</b>	<b>50</b>
<b>Valoración cromatográfica de Colina</b>	<b>52</b>
<b>Gráficas de Colina (densitometría)</b>	<b>54</b>
<b>Contenidos de Colina</b>	<b>58</b>
<b>Valoración cromatográfica de Colamina y Serina</b>	<b>60</b>
<b>Gráfico de Serina y Colamina (espectrofotometría)</b>	<b>63</b>
<b>Contenidos de Serina</b>	<b>64</b>
<b>Contenidos de Colamina</b>	<b>65</b>
<b>Resultados</b>	<b>66</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>67</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>69</b>

## LOS FOSFOLIPIDOS

La clasificación de los fosfolípidos dentro de los lípidos es en cierto modo arbitraria y ha variado en las distintas épocas. Se clasificaron primero como lípidos conteniendo ácido fosfórico y un componente nitrogenado (1) definición que fué posteriormente modificada al no considerarse como un requisito la presencia de nitrógeno (2) pasando de este modo los fosfatídeos a ser una subclasificación dentro de los fosfolípidos.

Esto está en armonía con las propuestas por Chabnon y Chidnall (1927) que fueron los primeros en aislar los fosfatídeos y con la clasificación de los compuestos aislados del bacilo de la tuberculosis dentro de los fosfolípidos (3), a pesar de no contener nitrógeno. Entran de este modo a constituir un capítulo dentro de los lípidos compuestos, o sea de los ésteres de ácidos grasos con alcoholes, conteniendo un grupo adicional.

### LÍPIDOS

#### GLUCOLÍPIDOS

**POSFOLIPIDOS:** contienen un residuo de ácido fosfórico.

**GLUCOLÍPIDOS:** compuestos como los cerebrósidos en los que están combinados ácidos grasos, un Residuo de Carbono y un compuesto nitrogenado.

**SULFOLIPIDOS:** contienen un residuo de ácido sulfúrico.

**AMINOLÍPIDOS.**

Las primeras subdivisiones dentro de los fosfolípidos (1) se basaban en la relación H:P dentro de la molécula, tenemos así: monocaminomonofosfatídeos donde H:P=1 y los diamino monofosfatídeos donde H:P=2:1.

Elle perdió actualmente mucho de su valor, gracias a las

técnicas más modernas que evidenciaron que aproximadamente el 50 % de los compuestos que antes se creían específicos eran lecitinas, esfingeniolíinas o esfalinas impuras o bien mezclas de ellas.

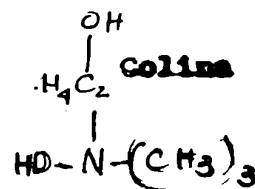
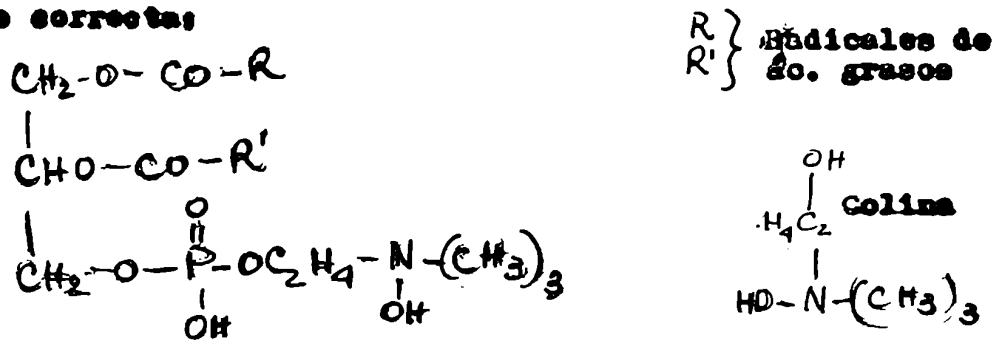
La estructura de la lecitina (del griego lekithos: yema de huevo), fue investigada por numerosos autores, mediante la identificación de los productos de hidrólisis.

Los primeros estudios, hechos en materiales impuros, llevaron a proponer una fórmula para la lecitina (5) en la suposición de que los ácidos grasos esterificaban la porción glicérica de la molécula. Así la lecitina se creyó un diglicérido, ligado por el grupo OH libre a la colina, mediante un radical fosfórico.

Si el ácido fosfórico era en realidad un puente entre la porción glicérica y la colina, debía formar necesariamente un éster con el glicerol y ello se confirmó al hallar ácido glicerofosfórico en los productos de hidrólisis.

Dikhanow y Stricker establecieron que la colina estaba unida en forma de éster, lo que fue posteriormente confirmado por distintos autores (6) y (7).

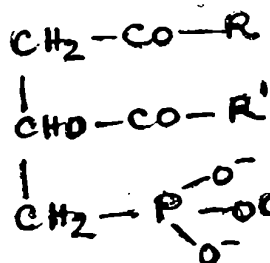
Estos investigadores llegaron a una fórmula para la lecitina que con algunas modificaciones se considera actualmente correcta:



Son de mucha importancia en este sentido los trabajos de Tsuchiana (1931) que fue el primero en aislar lecitina de cerebro y confirmar su estructura.

El término "Cefalina" se usó durante muchos años para designar fosfolípidos que tenían colina como constituyente básico y eran insolubles en alcohol.

La investigación minuciosa de los productos de hidrólisis en semillas de *Phaseolus vulgaris* (4) y (8) y en yema de huevo, llevó a la siguiente probable estructura para la cefalina, donde R y R' son residuos de ácidos grasos:

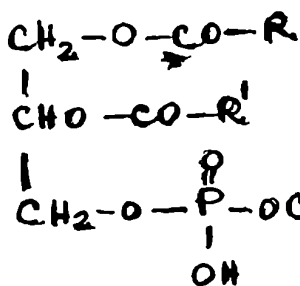


La admisión, sin más, de esta fórmula no era posible ya que los análisis elementales revelaban siempre valores más bajos que los teóricos y además el 5% teórico de ácidos

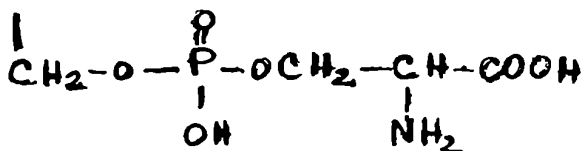
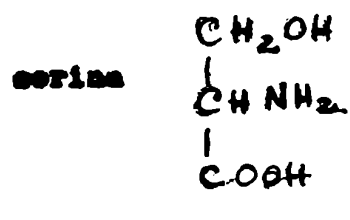
grasos no se obtenía nunca. Fue así que llegó al descubrimiento de otros fosfolípidos, además de los de la fórmula (A) en la fracción cefalina. El problema fue encarado por varios investigadores quienes aislaron un compuesto soluble en alcohol de la fracción "cefalina" que era teóricamente insoluble en él. Felch en 1942 (10) aisló un compuesto similar de otras fuentes y por eso designó al de fórmula (A); fosfatidilcolina.

La presencia en la antigua fracción "cefalina" de un aminoácido o base aminada fue supuesto desde un comienzo (11) y (12), y posteriormente (1940) se confirmó al hacer electroforesis de cefalina de yema de huevo (13). De esos y trabajos posteriores (14) se llegó a que el 40-70% del N presente en la cefalina corresponde a un aminoácido que luego se identificó como serina.

En 1942, se aisló la fosfatidilserina ya pura que daba L-serina por hidrólisis.



R y R' radicales de ácidos grasos



El aislamiento fué posible de ser más soluble, en una mezcla de alcohol y cloroformo, que los inositol fosfátidos y menos soluble que la fosfatidilcolina. Así aislada estaba en forma de sal de K e Na. Al demostrarse que la serina podía ocupar el lugar de colina y al hallarse aún entre fosfolípidos (15), conteniendo inositol dentro de la porción llamada originariamente cefalina, ésta dejó de representar una entidad y actualmente indica una mezcla de compuestos.

Para los compuestos puros es aceptable la sugerencia de Folch (1942) de acuerdo a la cual los compuestos conteniendo colina y serina se denominan fosfatidilaminosetanol y fosfatidilserina respectivamente.

En resumen, una clasificación general de los fosfátidos, podría esquematizarse así:

**GLICEROFOSFATIDOS:** lípidos conteniendo G, en los cuales el glicerol es el único alcohol presente.

LECITINA	}	Fosfatidilcolina
CEFALINAS		Fosfatidilserina

ACETALFOSFATIDOS	}	Lisolecitina
LIEFOSFATIDOS		Lisefosfatidilcolina

**ACIDOS FOSFATIDICOS**

**FOSFATIDOS DEL BACILO DE LA TUBERCULOSIS.**

**FOSFATIDOS CONTENIENDO ESFINGOSINAS:**

**ESFINGOMIELINA**

**INOSITOL FOSFATIDOS:** fosfolípidos en los que se halla inositol pero pueden contener no obstante otros alcoholes como ser glicerol.



### FOSFÁTIDOS DE VEGETALES

Son relativamente escasos los trabajos publicados sobre este tema, en comparación con la copiosa bibliografía existente sobre fosfátidos de cerebro, sangre, etc., y de tejidos animales en general.

Ya en 1859 Knapp y en 1861 Tüpler aislaron fosfátidos de semillas de vegetales y posteriormente (16), (17), se demostró la presencia de colina en los productos de hidrólisis de fosfátidos de plantas, junto con ácido glicerofosfórico y ácidos grasos. De acuerdo a esos trabajos se consideraba en ese entonces a la lecitina como el fosfátido característico de las plantas. Trabajos más recientes comprobaron la existencia de fosfatidilserina y fosfatidilcolina en soya, nabo silvestre (colza), maíz, y otros cereales.

En 1927, Kacian y colaboradores (1) demostraron la identidad entre los fosfolípidos de animales y plantas en contra a lo supuesto hasta ese entonces, con la única diferencia notable de no haber hallado esfingomielina en plantas, sino solamente en fuentes animales, afirmación que es válida hasta el presente.

SOYA Y TRIGO: La cantidad de fosfátidos presente en los distintos vegetales varía con el procedimiento de extracción, así en soya tenemos valores desde un mínimo de 1,5% hasta un máximo de 2,5 a 3,2% y también varía con la procedencia de la muestra; así en

Norte Carolina	2,0 - 3,0%
Illinois, Indiana	2 - 2,9%
Checoslovaquia	1,5 - 2%

Además de la clásica lecitina de soya; de la fracción colina purificada luego de hidrólisis, se aisló inositol y la sal de brucina é el ácido inositol monofosfórico, junto con otros ésteres de ácidos fosfóricos (18) y se confirmó en es-

te caso la existencia de una combinación química entre los inositol fosfátidos y los Edo C.

Los ácidos grasos de lecitina de soya son: (Thornton-Johnson y Ewan 1944).

<u>Ácido</u>	<u>Peso %</u>
Palmitico	15,77
Estéarico	6,30
Arquidico	0
Oleico	12,98
Linoleico	62,92
Linolénico	2,02

El cambio en el contenido de fosfolípidos durante la maduración de la planta fue asimismo estudiado (19), (20). Aparentemente el contenido en fosfátidos de la raíz, tallo y hojas decrece durante la maduración, mientras que el contenido en fosfátidos de los peritos no cambia apreciablemente. El estudio de la distribución del P total, P de lípidos y P ácido soluble en soya germinada revela que el P ácido soluble se mantiene constante durante la germinación.

La presencia de fosfátidos en trigo y productos derivados fue reconocida ya en 1889 (21) y posteriormente en 1894 por Nitte que estimó la cifra de fosfátidos en trigo en 0,6%, 1,6% en salvado y 1,6% en germen. Estos valores varían mucho de un investigador a otro, así para fosfátidos en germen, tenemos:

Geoffrey (1934)	1,3 %
Ronald (1936)	0,6 %
Halden (1947)	1,2-1,3 %

Aunque variables, las cifras, todas muestran cualitativamente que la mayor parte de fosfátidos del trigo están presentes en el germen. No obstante la ligera discrepancia en los valores puede deberse a diferencias en la pureza del ger-

men, e en la calidad del trigo y zona de procedencia.

La cantidad de fosfátidos en gluten es también bastante elevada y se estima en 8,5-11,1%. El añadido de aproximadamente 0,35 % de fosfátidos a la harina de trigo, actuaría como un favorecedor del horneado y mejora notablemente las cualidades del trigo blanco.

De esos fosfátidos, es la lecitina la que actuaría como mejoradora mientras que la fracción cefalina no tiene mayor acción.

En cuanto a los ácidos grasos de los fosfolípidos de trigo, se encuentran, ácido mirístico, láurico, esteárico y palmítico, sobre todo este último. Los no saturados son principalmente linoleico, con una pequeña cantidad de oléico.

Varios investigadores (22), (23) aislaron colina y colamina de trigo, confirmando así la presencia de lecitina (80%) y fosfatidilcolina (20%). La relación N:P es aproximadamente 1:1 para fosfátidos de germen. Tomando como base el % de N:P cenizas y ácidos grasos en germen, se vio (24) que además de lecitina y cefalinas, un 42% de los fosfátidos totales lo constituye el ácido fosfatídico en forma de sal de Ca, Mg y K. Esto fué posteriormente probado por H&L en 1947. Aunque este material puede representar un estado intermedio en la síntesis de fosfátidos en tejido vivo, no puede descartarse la posibilidad de que sea un producto de degradación biológica.

También se encontró linoleocitina pero se consideró un producto de degradación.

La selección y purificación de fosfátidos, tanto en soya (6), trigo, como en cualquier otro vegetal, reviste algunas dificultades, no sólo por hallarse en pequeñas cantidades, sino también por estar en forma de complejos con proteínas e hidratos de carbono, lo que trae como consecuencia la va-

riación de solubilidad de los componentes y dificultades en obtenerlos al estado analíticamente puro.

Así tenemos que caracterizándose los fosfátidos por su insolubilidad en acetona, pueden volverse solubles en ella bajo la influencia de las proteínas. Análogamente, los hidratos de carbono, ordinariamente insolubles en solventes orgánicos, pueden solubilizarse bajo la influencia de los fosfátidos, tanto que en muestras comerciales de fosfátidos de soya extraídas de semilla por solventes hidrocarbonicos, se hallaron hasta 25% de hidratos de carbono.

La naturaleza de estos complejos carbohidrato-fosfátido-proteína se demostró en la mayoría de los casos, de no ser de tipo químico y en 1937 se halló que la acción de solventes convenientes, liberaba totalmente los fosfátidos (25).

En soya, el que los fosfátidos se encuentren en combinación con otras sustancias se revela por el hecho de que la extracción con solventes hidrocarbonados extrae sólo un 0,55 % de fosfolípidos. Una parte está asociada a proteínas y se disocia totalmente por acción del alcohol, el cual tiene acción sólo parcial sobre la porción asociada a hidratos de carbono.

Los hidratos de carbono en el caso de la soya están como mezclas complejas de celulosa, glucósidos, pentosanos, hexosanos, di y polisacáridos, etc., pero se sabe poco acerca del % en que se hallan.

Trabajos realizados por varios investigadores (26) evidenciaron la presencia de un complejo  $\beta$ -glucósido, siendo este glucósido una combinación de un monosacárido con un hidroxido dibásico. Este trabajo implica la existencia de una combinación química entre el hidrato de carbono y el fosfátido, lo cual confirma la observación de investigadores anteriores, de que era necesario hervir el complejo con 5 %

de ácido sulfúrico varias horas, para provocar la disociación. Por el contrario, Newald en 1937 (25) se considera el complejo Hidrato de Carbono fosfolípido, una unión química ya que se disocia bajo la influencia de solventes acuosos. Por ejemplo: cuando una suspensión acuosa del complejo era tratada con tricloroetileno o cloroformo los fosfolípidos pasaban a la fase orgánica y los Hidratos de Carbono permanecían en la fase acuosa.

La naturaleza de este tipo de Complejos, está aún en discusión; donde no existe duda de la unión química es en los inositol fosfátidos aislados de coya por Klenk y Sakai.

Estudios sobre lípidos de germen de trigo, demostraron que aquí también los fosfolípidos estaban ligados a hidratos de carbono y proteínas (27) (25) (un 63% está asociado a Hidrato de Carbono).

El tratamiento de estos complejos como solventes como tricloroetileno, rompían totalmente la unión hidrocarbónica, no así la unión con la proteína. Esta última se liberaba cuantitativamente luego de un corto tratamiento con alcohol caliente. El hidrato de carbono ligado se identificó como sacarosa y la relación azúcar a fósforo se mantenía constante en todos los experimentos.

### EXTRACCION Y DETERMINACION DE FOSFOLIPIDOS TOTALES

De lo dicho anteriormente acerca de la naturaleza relativamente compleja de los fosfolípidos, se desprende que no son pocos los problemas ligados con su determinación.

El análisis cuantitativo de los fosfolípidos puede dividirse en tres partes:

1) La extracción de éstos de la fuente animal o vegetal mediante micro e macrofólicas. Esta no sólo debe ser completa, sino que debe tratarse de obtener con la composición más cercana a la que presentan en la fuente original, sin desnaturalización, oxidación, u otro cambio que interfiera con el análisis posterior.

2) La determinación de fosfátidos totales en el extracto.

3) La división de los fosfátidos totales directa e indirectamente, en sus componentes y la determinación cuantitativa de éstos. El solvente más ampliamente usado para la extracción de fosfátidos de los distintos materiales es el etanol solo o con solventes auxiliares, ya que tiene la ventaja de disociar la unión lípido-proteína u otro complejo y ejercer una extracción completa de los lípidos.

Ya en 1908 fué usado para la extracción de fosfolípidos de sangre (28) y posteriormente en 1915 en el mismo material (1 a) mezclado con éter libre de peróxidos en la relación de tres partes de etanol y una de éter. Se añadía un volumen medido de sangre a un exceso de solvente y precipitaban así las proteínas finamente divididas. Ese fine estado de división combinado al exceso de solvente permitía una extracción rápida, siendo necesario llevar el solvente al punto de ebullición para una extracción completa. Se hacía resaltar que la influencia disociante de etanol, combinada con el gran poder solvente del éter, daban una mezcla capaz de una extracción y distribución completa.

Además el calor suave evitaba toda posible descomposición de los fosfátidos. Las proteínas se eliminaban por filtración y el filtrado se usaba para el análisis de los fosfátidos.

La mezcla de etanol-éter, en distintas proporciones, fue posteriormente usada por muchos investigadores para distintos materiales (29), (30), (31), (32), siguiendo a grandes rasgos la técnica anterior, con algunas ligeras modificaciones, como ser aumento de temperatura (33), etc.

Otros solventes fueron también propuestos con éxito, como ser metanol (34) aplicado a sangre; metanol más cloroforme (35) para sangre y tejidos, metilal (formaldehído) (36) para extraer los fosfolípidos de suero de sangre, o bien alcohol absoluto (37) para fosfolípidos de sangre.

El uso de etanol-éter y metanol-cloroforme para la extracción de fosfátidos fue comparado por Erickson y colaboradores (1940) y hallaron a ambos igualmente eficaces.

Los métodos usados para extraer los fosfátidos de semillas, cereales y plantas en general, son totalmente similares a los usados en el caso de fuentes animales.

La presencia de hidratos de carbono y sales inorgánicas cuyas solubilidades cambian al hallarse combinadas a los lípidos, asociado a la escasa cantidad de fosfolípidos presentes, hace estos métodos algo dificultosos. En este caso, al igual que en sangre y tejidos, el etanol es el más generalmente usado como solvente inicial, éste e en combinación con éter. El tiempo requerido para extracción completa es variable, pero el material a extraerse debe desde luego estar en el más fino estado de división posible. Algunos afirman que el contenido de fosforo del material obtenido en la primera extracción es una medida de los fosfolípidos presentes. Otros, por el contrario consideran necesario la rectifica-

ción mediante varios solventes y la precipitación de los fosfolípidos con acetona o cloruro de magnesio. Es necesario destacar que en los procedimientos de extracción para fosfolípidos de vegetales, en general, hay que considerar solamente las solubilidades de los glicerofosfátidos, dada la ausencia de esfingomielina. El secado del material antes de la extracción, tanto en caso de material biológico como de cereales, no se considera conveniente por el peligro de insolubilizar los fosfátidos.

Etanol 95% fué usado para extraer fosfátidos de semillas de soya (38), (39).

La extracción sucesivamente con etanol y éter, fué asimismo empleada para soya (40) para la determinación de fósforo de fosfátidos en salvado y germen de trigo (41).

Un procedimiento totalmente distinto es el de extraer los fosfolípidos de plantas con metanol 50% hirviendo, durante dos horas (42). La solución luego se diluye con una cantidad igual de agua y los fosfátidos se absorben en sulfuro de plomo preparado "in situ". El metanol saturado con ácido sulfúrico servía para clarificar la fracción de fosfolípidos, cuyo contenido en fósforo quería determinarse.

Gerbach (43) propone el uso de benceno-etanol como un solvente muy efectivo en la extracción de fosfátidos de todo tipo de cereales. Se extrae el material en un aparato continuo con dos porciones de solventes y el residuo se rectifica por reextracción con éter y los fosfátidos se determinan por el contenido en fósforo de la fracción soluble en éter.

Howald (1947) (25) realizó un estudio comparativo de los distintos métodos empleados para cereales hasta ese entonces, concluyendo que la mezcla benceno-etanol (1-4), extraía un 98% de los fosfátidos, extracción que se hacía prácticamente total con una segunda etapa con etanol de 96%. El resultado tan satisfactorio causado por este solvente, es lo que nos



llevó a emplearlo para la extracción de los fosfolípidos del germen de trigo en el presente trabajo, tal como se detallará más adelante en la parte experimental.

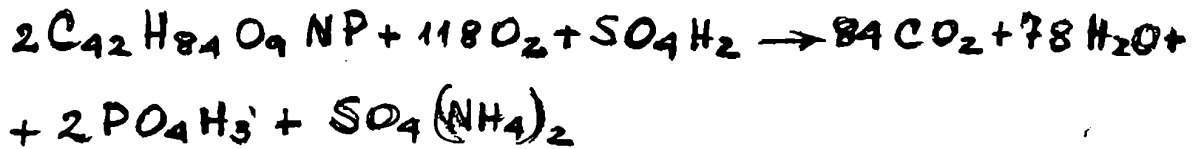
Una vez que los fosfátidos se han aislado, surge el problema de su determinación cuantitativa. Esta puede hacerse sobre la solución alcohólica, etérea, cloroformica, etc., o bien sobre el precipitado obtenido por acción de acetona o cloruro de magnesio.

El procedimiento de pesada del precipitado obtenido fue descartado dada la gran posibilidad de error al ser tan difícil la obtención de estos compuestos puros.

Por ende, se propusieron métodos indirectos de los cuales los más usados son:

1) MÉTODO OXIDATIVO: conocido también como método de Rloor, oxida la molécula de fosfátido con dicromato de potasio en solución ácida fuerte y se valora o bien la cantidad de agente oxidante consumida, o bien los gases producidos.

La reacción que ocurre es, según Royá:



2) DETERMINACION DEL CONTENIDO EN FOSFORO: es un método común, dada la gran variedad de técnicas existentes para la determinación de este elemento. La fuente de error de este método, es la posible contaminación del material, con compuestos inorgánicos fosforados, como puede ocurrir por ejemplo en sangre. Generalmente la determinación se hace directamente sobre el extracto, pero algunos prefieren rectificar con éter.

Para pasar del % de fósforo, al % de fosfátidos totales, se multiplica por un cierto factor. Dado que el contenido en fósforo de los glicerofosfátidos y de esfingomielina es

de aproximadamente 4 %, la mayoría de los investigadores, multiplica la cifra de fósforo por un valor próximo a  $10/4=25$ . Esta es la corriente empleada. No obstante se han determinado otros factores experimentales (44) y (32).

3) DETERMINACION DEL CONTENIDO EN ACIDOS GRASOS: Fue ampliamente desarrollado por Arton (1932) y es bastante exacto cuando estos se hallan en aproximadamente 5%. Para obtener los ácidos grasos por titulación con álcali, se saponifican con álcali, se acidifican con un ácido mineral y se aislan por extracción con éter. En este caso, como en los anteriores, la exactitud se halla restringida por la imposibilidad de obtener una fórmula empírica exacta para la mezcla de fosfátidos.

El método 2) es el adoptado en el presente trabajo, según la técnica de Beveridge Johnson (45), tal como se describe más adelante.

CONSTITUYENTES FUNDAMENTALES DE LOS FOSFOLÍPIDOSSU DETERMINACION

La determinación de los constituyentes principales de los fosfolípidos es de gran importancia por su rol en los procesos metabólicos. La determinación de estas sustancias dentro de los fosfátidos, puede hacerse: a) separando previamente las distintas fracciones que las contienen, gracias a diferencias de solubilidad y localizando cada una de ellas en su fracción correspondiente. b) Valorarlas directamente en los productos de hidrólisis.

El primer método es algo precario, ya que la separación de las distintas fracciones (lecitinas, cefalinas e inositol fosfátidos), mediante diferencias de solubilidad no es completa ni exacta, especialmente cuando se trabaja con menores cantidades. No obstante, hay un procedimiento descrito por Bleer (16) y posteriormente adoptado por varios autores, que separa la fracción lecitina de cefalina por tratamiento con etanol absoluto, en el cual esta última es insoluble y precipita.

En el método de Kirk (44) los fosfolípidos se precipitan con acetona o cloruro de magnesio y se extraen con éter para insolubilizar la esfingomielina. La cantidad de lecitina se determinaba en el extracto étereo por el contenido en colina. La fracción cefalina se determinaba por diferencia entre la lecitina y los fosfolípidos totales en el extracto étereo que se valoraba gravimétricamente. Esta técnica adolece de muchos errores y fué objeto de profunda crítica.

Existe un método de separación de los constituyentes de la fracción cefalina, debidos a Felch y se basa en que una solución cloroformica de cefalina que no ha sido tratada por ácidos al añadir alcohol, precipitan primero los inositol fosfátidos que son menos solubles; la adición de más etanol

precipita la fosfatidilserina mientras que el fosfatidil amino etanol permanece completamente soluble en la mezcla de etanol y cloroforme. En cada porción se llevaba a cabo la determinación de serina y colina.

El método b) es de mayor exactitud y es el adoptado en el presente trabajo.

La hidrólisis de los fosfátidos puede hacerse con distintas sustancias, alcalis e ácidos. Molesan (4 a) propone el uso indistinto de Hidróxido de bario e ácido clorhídrico y lo mismo Barrah y McArthur (46) que emplean ácido clorhídrico al 3% durante 15-20 horas o bien hidróxido de potasio 1,6-5% e igual período de tiempo Hack (47) usó hidróxido de potasio normal a 37° durante 16 horas en la hidrólisis de lecitina.

Ácido sulfúrico al 10% a 100°, durante cuatro horas, fué usado por Moruzzi (1908) (48).

Se comprobó que tanto los reactivos ácidos como los básicos son muy adecuados.

La distribución de los productos de hidrólisis entre los fosfátidos más comunes es la siguiente:

	$H_3PO_4$	colina	colamina	serina	glicerol
Lecitina	1	1			1
Fosfatidil colamina	1		1		1
Fosfatidil serina	1			1	1
Esfingomielina	1	1			

De ello se deduce que la determinación de colina mide la totalidad de la lecitina y esfingomielina presentes, la determinación de colamina da la cantidad de fosfatidilcolamina y la de serina la de fosfatidilserina. En vegetales donde no se ha probado la presencia de esfingomielina, la colamina resulta por ende una medida directa de la lecitina.

COLINA - SU DETERMINACION

La colina (del griego cholembilis) representa aproximadamente el 15% de la molécula de lecitina y fué aislada por primera vez por Strecker en 1849 de bilis de cerdo a pesar de existir allí en muy pequeña cantidad, sola o combinada en la lecitina. Posteriormente (49), (50), se aisló de semillas de mostaza y se identificó como el hidróxido de trimetil, o hidroxietil amonio  $\text{HO-C}_2\text{H}_4\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{OH}^-$ .

Es de una extraordinaria importancia biológica que los distintos autores le atribuyen en especial a su pluralidad de grupos metilo.

En su comienzo fué confundida con la neurina, (hidróxido de vinil trimetil amonio), aislada por Liebrich de lecitina de cerebro y que es una sustancia extremadamente venenosa, que resulta de la descomposición de la colina.

La síntesis de colina y sus compuestos se debe a Wurtz (51), Bode (52), Trier (53).

Es una sustancia extremadamente higroscópica, por lo cual se obtiene generalmente en forma de un líquido viscoso, incoloro. La colina reacciona con ácidos para dar sales. El reosulfato, periodato, fosforunato y fosfomolibdato, al igual que las sales dobles con tricloruro de oro y bicloruro de mercurio, son insolubles en agua. Algunas, como el cloruro, sulfato, nitrate, picrato, borato, carbonato, acetato, oxalato, etc., son solubles en agua y metanol.

En 1921 fué obtenida al estado cristalino por Meyer y Hopff. Por calentamiento, se descompone sin fundir y precipita los metales como ácidos o hidróxidos.

La colina es considerada por algunos autores como un vitamínico o bien como un vitágeno y últimamente, (51), la denominaron "factor dietético".

Es una sustancia fundamental en la nutrición, dada su gran actividad en los procesos metabólicos. Su importancia en la dieta, surge de la observación de que los hígados grasos (por aumento patológico de grasas y ésteres de colesteroles) de animales pancreatocetomizados y mantenidos con insulina, eran debidos a la falta de un factor en la dieta y se curaban por administración de rawbeef pancreas e de fosfátidos de yema de huevo. Las experiencias de Post y colaboradores (51) comprobaron que la presencia de colina, no sólo evitaba la formación de hígado graso sino que los curaba, una vez desarrollados. Posteriormente se hallaron otras sustancias de actividad similar como la betaina, metionina e inositol y se denominó a todas ellas: factores lipotrópicos.

La dieta deficiente en colina, es también responsable de una cantidad de transformaciones patológicas, como ser, por ejemplo: la degeneración hemorrágica del hígado y pulmones de animales (55) que cesaba por administración de 1-2 gr. de colina diarias.

Otro trastorno observado es la involución del timo y aumento del bazo (55) y (56).

Se halló además que la colina, en combinación con el complejo de vitamina B<sub>12</sub>, era esencial para el normal mantenimiento del epitelio gástrico y la prevención de la hiperplasia en ratas. (57). Es también indispensable para el normal crecimiento en ratas y pollos.

De las anteriores y muchísimas otras investigaciones se desprende el importantísimo rol de la colina en la regulación del metabolismo de los lípidos y en la prevención de condiciones patológicas derivadas de una dieta lipotrópica.

Es una unidad estructural de los tejidos, al ser componente de la lecitina, presente en todas las células vivas, y de la esfingomielina y se incorpora directamente a ellas, lo que

se comprobó en experiencias usando colina con  $\delta$  isotópico.

Por acetilación en el organismo, forma acetyl colina, que es un agente que disminuye la presión sanguínea y estimula la actividad peristáltica y esta particularidad fué empleada también para su determinación (58).

La determinación de la colina es de gran importancia en la bioquímica y fisiología de animales y plantas. Para su determinación se aprovecharon desde un comienzo la formación de los compuestos insolubles anteriormente citados.

Así tenemos su determinación como cloroplatinate por Kauffman y Vörländer (59) el cual cristaliza de agua en forma de cristales cúbicos. También por Maruzzi-Farina (48) Helean (4) y Levene-Ingevalden (60). Estos últimos aprovechan la precipitación del cloroplatinate de colina, para su separación de colamina.

Hoffman-Hübeld (61) la analiza como perclorato de colina, el cual evaporado con ácido nítrico en baño de agua se transforma en su éster nítrico que son cristales y dan la reacción de los ésteres nítricos. Sánchez (62) la dosa por su transformación en iodoforme que se identifica por el color o por reacción con resorcinol.

La valoración como clorocaurate de colina se debe a Finckussen y Von Heyden (63); el precipitado se disuelve en cloroforme y se titula con tiosulfato de sodio. Se han desarrollado también micrométodos como el de Martini (61) que precipita colina con ácido fosfotúngstico o fosfomolibdico, en forma de cristales hexagonales incoloros, de una sensibilidad 1:10,000. Otros micrométodos emplean su transformación en el mono ioduro (65)  $C_2H_3(CH_3)_3NOI_9$ . Estos autores consideran que es posible estimar 0,005 a 5 mgr. de colina con un error de  $\pm$  5%. El consumo de iodo se determina titulando el exceso con tiosulfato. En este caso la precipita-

ción de colina no se afecta por la presencia de colanina, y fue considerado satisfactorio para determinar colina en fosfolípidos de soya. Appleton (66) determina colina libre en plasma precipitándola con trioduro de potasio, disolviendo el precipitado en dicloroetileno y haciendo una medición al espectrofotómetro.

De los métodos por formación de sal insoluble, el más frecuentemente empleado con distintas modificaciones es el de formación del reineckato de colina. Se basa en que de todas las sustancias básicas que precipitan con sal de reinecke a distintos pH (2-13). Esta técnica se llevó a cabo por primera vez por Kapfhammer y Riehoff (67). Más adelante fue adaptado a una colorimetría de la solución acotónica del reineckato de color rojo obscuro. Para precipitar el reineckato de colina se usaba una solución saturada de reineckato de amonio diez minutos a 60° o bien una solución de reineckato de amonio al 2% en metanol. Para aumentar la concentración del agente precipitante. (68). La determinación de la intensidad de color del reineckato de colina dio también lugar a un método fotoeléctrico (69), quien destacó la importancia del pH en la precipitación.

Otro procedimiento derivado del reineckato es la oxidación del cromo del precipitado a cromato y valoración colorimétrica de éste, método con una sensibilidad hasta de 15  $\mu$ gmas (70).

Otras modificaciones a este método, fueron las propuestas por Winsler y Keeser (71). Reveli (72), Fleury y Guitard (73), Tracer (74).

Otro procedimiento interesante para valorar colina, es el de oxidar a éster con permanganato de potasio, con liberación cuantitativa de trimetilamina que se titula (75). Puede aquí liberarse a también amoníaco, si está presente aminometanol como ocurre generalmente en los hidrolizados de fosfolípidos,



en ese caso se trata la mezcla de gases con formaldehído, con el cual reacciona el amoníaco. Otro procedimiento de oxidación es con persulfato de potasio (76) aunque este es menos específico que el permanganato.

Se han aplicado también técnicas microbiológicas para la determinación de estas sustancias. Una de ellas usa una mutante de hongo, la *Neurospora crassa*, que requiere colina para su desarrollo. En los últimos años, adquirió importancia la investigación cuali y cuantitativa de la colina mediante técnicas cromatográficas que se describirán más adelante.

El contenido en colina de plantas y fuentes animales fué determinado y comparado por Engel en 1942. Algunos de esos valores se expresan a continuación:

**Clorhidrato de colina por gr. de material**

<u>Fuentes animales</u>	<u>Yengo</u>	<u>Engel</u>
Hígado de cerdo	5,52	18,35
Carotro de cerdo	3,75	18,20
Alveolas	3,29	12,60
Hígado	2,56	13,06
Yema de huevo	17,13	32,81
Leche	0,147	1,14
<u>Fuentes vegetales</u>		
Cermen trigo desgrasado	4,03	4,32
Cermen de maíz	1,00	1,78
Salvado de trigo	1,43	1,56
Cebada	1,39	1,55
Avena	0,94	1,00
Trigo entero	0,92-1,02 (Glick)	1,01
Harina de trigo	0,52 (69)	0,57
Maíz amarillo	0,37	0,41
Harina de maíz	0,10	0,11

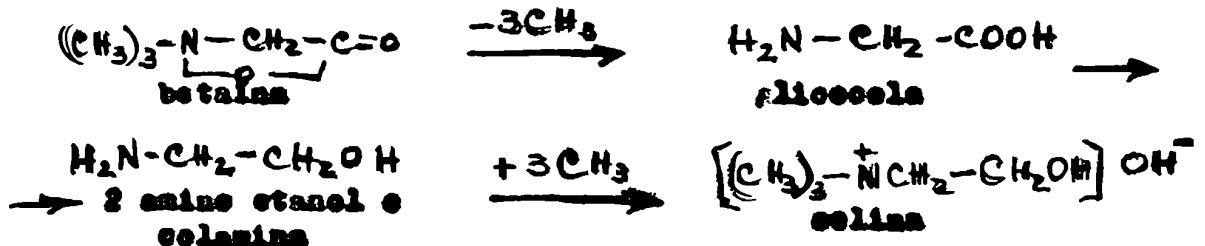
<u>Fuentes vegetales</u>	<u>Fresco</u>	<u>Seco</u>
Green soybeans	3.00	3.32
Aceite de soya refinado		0.05
Harina de soya	3.45	3.75
Germen de Trigo (69)	3.54	
Salvado (69)	1.53	

Se deduce que los organismos animales, yema de huevo y tejido nervioso son mejores fuentes de colina que las plantas. En el reino vegetal, las mejores fuentes de colina son las plantas de hojas verdes, harinas, aceites y germen de granos.

#### COLINA: SU DETERMINACION

La colina  $\text{CH}_2\text{OH}-\text{CH}_2\text{NH}_2$  es una sustancia alcalina y con el olor típico de las aminas. Hierve a  $171^\circ$  y destila sin descomposición. Es soluble en agua, alcohol y cloroformo. Se sintetizó por primera vez en 1859 por reacción entre el amoníaco y la etilena clorhidrina u óxido de etileno y es aún ahora el procedimiento comercial para su obtención. La colina es fisiológicamente inerte, salvo en lo referente a su carácter básico.

Su presencia en gran cantidad en tejidos animales y vegetales es interesante por la investigación de Du Vigneaud y colaboradores (77) que la consideran como un precursor de la colina es la que se convertiría posiblemente por los grupos metilos dados por la betaina, de acuerdo a la siguiente ecuación:



La serina se considera un posible intermediario entre la

glicerolo y la colamina, lo que está apoyado por el hallazgo de grandes cantidades de fosfatidilserina.

La glicina que se forma por desmetilación de la betaina es un precursor de la colamina (77). La posibilidad de formación de colamina por descarboxilación de la serina fue expuesta por Nord en 1919.

La colamina actúa como acelerador de la coagulación de la sangre no así sus jabones con ácidos grasos de alto número de átomos de carbono, por ejemplo, el esteárico que paraliza la coagulación del fibrinógeno. Los jabones originan asimismo una marcada disminución de la presión sanguínea.

La colamina forma sales de fórmula  $CH_2OH-CH_2NH_3X$ , que son por lo general más solubles que las correspondientes de colina por lo cual es más difícil aislarla de los hidrolizados de fosfátidos. Trilur (8) aisló colamina de los productos de hidrólisis de lecitina con hidróxido de bario en porcel y halló que ésta representaba 1/7 del nitrógeno total de la lecitina y fue el primero en considerarla como sustancia madre de la colina.

Fournau y Conséles en 1921 (78) la separaron de la colina con ácido Naftalen-sulfónico ya que en presencia de ácido clorhídrico la salida se forma más rápidamente que el éster, y precipita así la Naftalen sulfonamida.

El aislamiento de la colamina por formación de distintas sales insolubles, fue ampliamente usado, por ejemplo su precipitación con ácido quinizarin sulfónico (79) con ácido ftálico y oxálico (80) con ácido fosfotúngstico o silicotúngstico (81), con ácido 3-5 dióxido salicílico (8), clorofórmico (11) y como para hidroxiasobenceno para sulfonato por Folch en 1942. La reacción que de la colamina con ácido periódico es cuantitativa:

y fué usada para su separación de serina (83), (32) y de colina (73). Farmator (83) mide el amoníaco desprendido por acción del ácido periódico sobre la fracción cefalina, que involucra serina y colamina.

La primera se valora con ninhidrina y halla la segunda por diferencia. Para medir el amoníaco se usó microdifusión en solución saturada de perborato de potasio. Arton (32), pasa el hidrolizado de cefalina por Permutit, que absorbe cuantitativamente colamina y nada de serina, determinándose esta última por el método anterior. La colamina se elufa de la columna con cloruro de sodio y hacia la reacción sobre ese líquido de elución.

En (73) es más sencillo porque la colina no reacciona con  $\text{IO}_4\text{H}$  ni a  $100^\circ\text{C}$ . Se valora aquí el  $\text{HCHO}$  formado o el exceso de  $\text{IO}_4\text{H}$  por yodometría. Es exacto hasta un  $0.75 \mu\text{g/l}$  de colamina.

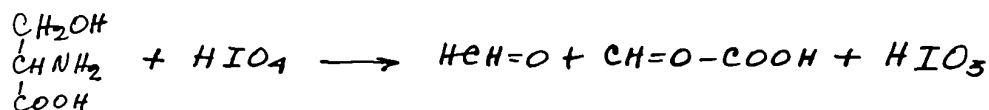
Una valoración espectrofotométrica fué desarrollada por Axelrod (84), para colamina en plasma; mide el color que da con dinitrofluorobenceno y que es soluble en solventes orgánicos.

La localización y estimación cromatográfica, se hizo generalmente junto con colina y serina (ver pág. 27).

### SERINA SU DETERMINACION

La serina o ácido L (-)-β-hidroxiamino propiónico  $\text{CH(OH)CH}_2\text{NH}_2\text{COOH}$ , fué aislada por primera vez de un hidrolizado de sericina por Kramer en 1865. Más tarde se confirmó su estructura y se llevó a cabo su síntesis por Leuchs y Geiger en 1906. Funde a 228°. Se encuentra presente en gran cantidad de proteínas como sericina, gelatina, suero, albúmina humana, en las proteínas de leche humana y vacuna y en proteínas de hígado, corazón y bazo de cerdo, beef lamb y en músculo de pello (85). Durante su aislamiento esta sustancia se racemiza y se obtiene una mezcla ópticamente inactiva. Como ocurre con todos los aminoácidos, la forma natural es la L y en el caso de la serina se demostró que la forma D es tóxica (32a) Es un aminoácido no esencial en la nutrición humana, aunque se considera un precursor de la glicina en la rata (85). En un animal normal de agua y anhídrido carbónico como productos de su metabolismo.

La serina reacciona cuantitativamente con el ácido periódico:



y ello fué usado para su valoración (83), (86), quienes pesaban el derivado del formaldehído con dimedona. De este modo valoraban hasta 20 mgr. de serina con una aproximación de 2-3%. Boyd y Logan (87) condensaban el formaldehído formado por acción de ácido periódico con ácido cromotrópico y hacían una medición al colorímetro mientras que Friesel lo determinaba fotométricamente.

Existen métodos microbiológicos para la determinación de esta sustancia, por ejemplo el que usa *Lactobacillus delbrueckii* y titula el ácido láctico desprendido (88). Bathurst hidroliza fosfátidos de tejidos de plantas y luego de la extracción con alcohol, determina los aminoácidos microbiológicamente.

Scherrmiller y Walter en 1952 (89) realizaron un estudio comparativo de todos los métodos existentes para valorar serina hasta esa entonces, concluyendo que los dos mejores, eran los de oxidación con tetraacetato de plomo y con ácido periódico sobre todo este último. Una nueva reacción colorada para detectar aminoácidos, fué creada por Inukai, Tsurumi y Sakai en 1954 (90) que consiste en fundir 0,5-1 mgr. de sulfocianuro de potasio o amonio, con serina y se obtenía un color rojo intenso.

---

CRONOTOGRAFIA EN PAPEL APLICADA A COLINACOLAXINA Y SERINA

La técnica cronotográfica, es debida al botánico ruso Tsvett y data de 1906. El principio de absorción selectiva empleada por Tsvett se halló posteriormente que era válida para una cantidad enorme de sustancias, y su uso se extendió y perfeccionó tanto que abarca actualmente una gran cantidad de técnicas y se aplica ese nombre a procesos que tienen sólo una remota relación con el sistema de su creador y para los cuales carece de sentido la alusión a "color" que lleva implícito el término.

Podríamos definirla de acuerdo a Strain, Engel y Sato (1954) como la utilización de procedimientos analíticos de muy amplia aplicación para la resolución de mezclas de solutos, por migración diferencial desde una zona pequeña, en un medio poroso, siendo esta migración producida por potencial eléctrico o bien por pasaje o corriente de un líquido o gas.

Desde el punto de vista práctico se pueden considerar tres divisiones de la cronotografía:

- 1) Por pasaje de solvente o gas.
- 2) Por migración eléctrica (electroforesis)
- 3) Por combinación de 1 y 2.

De acuerdo a la naturaleza del medio de migración, tenemos cronotografía en columnas porosa, en papel y en gels.

La descripción de cada una de las técnicas cronotográficas, sería larga dada su gran variedad y saldría del objeto del presente trabajo; además ha sido tema de numerosas publicaciones en estos últimos años.

Sólo mencionaremos que la aplicación exitosa de la cronotografía en papel que es la que usamos para colina colaxina y

serina fué lograda por Martin, Synner, Condon y Jordan (91) brindándonos de este modo un método rápido, conveniente y preciso para el análisis de microcantidades de estas sustancias.

Data de estos últimos años, el uso de estos métodos para la determinación cuantitativa de las sustancias, dando así lugar al título de la "Cromatografía Cuantitativa". El examen de las cromatogramas sobre papel, revela la relación existente entre la cantidad de sustancia y la intensidad de color de la mancha resultante. Se colocan iguales volúmenes de sustancias de concentración conocida y decreciente, y uno del desconocida y se compara. Este procedimiento es muy rudimentario y está sujeto a todos los errores de la colorimetría visual. Berry en 1949 (92) le asigna una exactitud del 10 al 15%. Uno de los procedimientos más usados para la determinación cuantitativa es el de elución de la mancha.

Una vez desarrollado el cromatograma, se cortan las secciones conteniendo las manchas, se eluye la sustancia del papel con un solvente adecuado y se determina por un procedimiento conveniente, generalmente colorimétrico (93), (94), (95), y (96).

Este método requiere, no obstante una comparación bien hecha de las sustancias y su exactitud es de aproximadamente 5%.

Fisher (97) describe un procedimiento basado en la observación de que al aplicar al papel gotas de iguales volúmenes, las áreas de las manchas resultantes guardan una relación lineal con el logaritmo de la concentración de sustancia en cada una de ellas.

Las manchas se circunscriben en lápiz y se determina su área con un planímetro.

Si la reacción colorada, usada para localizar la sustancia, cumple la ley de Beer, se tiene un método relativamente



simple para la estimación por medición de la densidad de color de la mancha (99) y (98).

La investigación de serina por cromatografía unidimensional en papel, juntamente con otros aminoácidos fué realizada por Shrame y en columnas de intercambio iónico (10).

La detección de serina por cromatografía circular fué también ampliamente desarrollada por Hae y Ciri (1953), que usan como solvente una mezcla de butanol-ácido acético-agua (40:10:50), y se halla con esta técnica circular,  $R_f$  algo mayores que las obtenidas con el método unidimensional en papel.

En todos los casos la localización de la serina se hacía al igual que el de todos los aminoácidos en general por tratamiento del cromatograma con solución diluida de ninhidrina, apareciendo luego de calentamiento a  $80^\circ$  una o dos minutos unas manchas definidas, color rosado violáceo, en el lugar donde se halla el aminoácido. La ninhidrina es el reactivo más ampliamente usado en todos los trabajos. Se han propuesto algunos otros, por ejemplo Ciri y Nagabhushanam en 1952 (101), sumergen el papel en un reactivo (I) que consta de 0,1% de 1,2 naftoquinona, 4 sulfonato de sodio en acetona, luego calientan  $3-5'$  a  $80-90^\circ$  y lo sumergen  $1-2'$  en el reactivo (II) consistente en 10 ml de hidróxido de sodio alcohólico con 30 ml de reactivo (I) hasta que aparezca el color.

Seifer y Orkes en 1954 emplean la isantina como reactivo para aminoácidos, con los que da distintos colores.

En el campo vegetal, serina fué detectada cromatográficamente por Ozaki-Horiyane en 1952 (102) en arroz y por Isawa y Hatake en 1954 (103) en distintas partes de la planta de trigo, éstos últimos hallaron siempre ácido aspártico, glutámico y alanina junto con serina y ocasionalmente valina y leucina.

En la investigación cromatográfica de colina, colamina y serina es importante el trabajo de Levine-Chargaff-Green de 1948 (104), quienes la detectan en fosfátidos de cerebro. La presencia de colina se demostraba mediante su conversión a fosfomolibdato de colina, seguida de reducción a azul de molibdeno. Serina y colamina se detectaban por la formación de las clásicas manchas rosadas al reaccionar con la ninhidrina. Brante en 1949 revela la presencia de serina y colamina por formación de manchas marrones al someter al cromatograma a vapores de yodo. Este procedimiento es criticado posteriormente por Manier-Machebeeff en 1951 (105), que no obtuvieron resultados satisfactorios con serina y sólo ocasionalmente con colamina. Estos autores proponen la siguiente técnica para revelar un cromatograma de separación de las tres sustancias: 1°) Serina y colamina por la clásica técnica de la ninhidrina y luego someten el papel a una corriente de aire tibia cargada de vapores de yodo que tinte de marrón la zona ocupada por la colina. Este color marrón desaparece al aire luego de unas horas, pero se puede hacer reaparecer, exponiéndole nuevamente a los vapores de yodo.

Proponen además un nuevo reactivo para revelar colamina basándose en que en medio débilmente alcalino, ésta se combina en frío con los aldehídos, y se estenan para dar exasolidinas sustituidas. El reactivo consta de:

Quinona recristalizada	0,5 gr.
Firidina	10 ml.
n-butanol	40 ml.

Se pulveriza con él el papel y las zonas de colamina se tiben de marrón rojizo, no así la serina y colina. Estas últimas se colorean ligeramente al se somete el papel a calentamiento en estufa.

Manier y Machebeeff en sus experiencias con colina, colamina

y serina usan como solventes sistemas alcalinos a base de alcoholiso-amílico, butanol, amoníaco, agua y monocloriglicina del glicol y sistemas ácidos, a base de butanol, ácido acético y agua en distintas proporciones a cada una de las cuales denominan "fase".

Schulte y Krause (106) demostraron la presencia de colina, celanina y serina en los hidrolizados de germe de trigo y senteno ellos separan primero los aminoácidos por electroforesis y luego hacen cromatografía bidimensional con fenol-agua y colidina-agua y los revela por la técnica de Levine-Chargaff-Green. La determinación cuantitativa de estas sustancias, la llevan a cabo en el hidrolizado.

La cromatografía cuantitativa de estas sustancias la hicieron por primera vez Levine y Green (104 a) en 1951 en fosfatidos de cerebro basándose en su trabajo anteriormente mencionado.

Colina se valoraba por el método de Fisher, de planimetría de las manchas de azul de molibdeno. Para serina y celanina se usaba el método de absorción y medición del color de la reacción con ninhidrina al fotocolorímetro.

Saber y Hill (107) estiman cromatográficamente colina y celanina (entre 2-100  $\mu$ gmas), preparando pequeños dispositivos de las fotos de los cromatogramas en papel y midiendo la intensidad el espectrofotómetro. La exactitud del método es de 5-10 %.

PORTE EXPERIMENTALConsideraciones Generales

De todos los métodos para la investigación, localización y separación de las sustancias anteriormente comentadas y del estudio bibliográfico, se deduce que los cromatográficos son los que ofrecen las más grandes ventajas, unidas a su relativa sencillez.

Es por esa razón que nos proponemos aplicarlos para la investigación de los componentes principales de los fosfátidos del germen de trigo, previa determinación de la cantidad total de los mismos, empleando para ello, técnicas similares a las descritas para el caso de fosfátidos de fuentes animales (cerebro y tejidos), aunque con ligeras modificaciones.

Se ensayó la aplicación de la "Cromatografía cuantitativa" para la valoración de colina, colamina y serina, en los cromatogramas obtenidos con distinto tipo de solventes, tratando así de adaptar las técnicas a materiales de origen vegetal, que no había sido hecho hasta el presente.

El mismo tratamiento llevado a cabo sobre dos muestras de germen de trigo de la misma partida, se aplicó a lecitina de soya, como control en cada etapa del proceso, dándose su reconocimiento contenido en colamina y serina y relativamente alto de colina.

---

I. PREPARACION DEL MATERIAL Y EXTRACCION DE LOS  
FOSFATIDOS

El germen de trigo empleado en el presente trabajo, procede de la zona de Pergamino de la Provincia de Buenos Aires, y corresponde al llamado trigo de primavera, mezcla de los tipos "Aniversario" y "Cometa", que se cultivan en las localidades de: "El Cantor", "Aéres Villán", "Ortiz Pasualdo" y "Wheelright".

La humedad del trigo era de 12,5% en seco y los residuos minerales: 0,66 %.-

El germen fué cuidadosamente molido en una Tuzmix para favorecer una extracción más completa y luego pasado por una malla de 40 mesh, equivalente a                    micrones.

Fuó evitada la desecación del material, por el peligro que esa operación reviste en la posibilidad de insolubilización de los fosfátidos. Todas las determinaciones que se detallan a continuación, efectuadas sobre una muestra de germen de trigo, fueron posteriormente repetidas con otra muestra del mismo, para control de los métodos y promedio de los resultados. Para mayor comodidad, designaremos en lo sucesivo a la primera muestra: Germen A. y Germen B a la segunda.

50 gr. de germen A. finamente molido (30 gr. en el caso de Germen B), fueron extraídos en un aparato de extracción continua, de acuerdo a la técnica propuesta por Sewald (25), quien estudió todos los métodos existentes hasta ese entonces, hallando que éste es el más efectivo.

Se trataron durante 36 hs. con una mezcla de 80 partes de alcohol y 20 partes de benzol puro y luego otras 36 hs. con alcohol de 96°.

En ambos casos, al cabo de ese período de tiempo, el solvente ya no tenía más color. El primer tratamiento con la mezcla

cia de alcohol y benzol, se estima que extrae aproximadamente un 98% de los fosfolípidos totales (25), extracción que se hace prácticamente total en la segunda etapa con el alcohol. Además, luego de este tratamiento exhaustivo, los fosfátidos se consideran totalmente liberados de la unión proteica y con hidratos de carbono.

En cada caso se juntaron los líquidos de las dos extracciones y se sometieron a destilación para eliminar el solvente, hasta que quedara un volumen pequeño en el balón. Este volumen se evaporó a baño María y el residuo se secó al vacío sobre  $P_2O_5$  o KOH.

Este residuo de color marrón oscuro y de consistencia viscosa que contenía todos los fosfátidos, algunos azúcares e impurezas, pesaba 19,845 gr. en el caso A y 9,899 gr. en el caso B.

---

### HIÓLISIS DE LOS FOSFÁTIDOS DEL GERME

Del residuo de la extracción del germe, convenientemente desecado a vacío, 14,390 gr (germen A), y la totalidad para germen B, se sometieron a hidrólisis ácida. Como agente hidrolizante se eligió el ácido clorhídrico, por las ventajas que presenta para su eliminación, sobre otros ácidos como el ácido sulfúrico.

El tiempo de hidrólisis fué de 24 hs. con 950 cc. de ClH en el caso A y 650 cc. en el caso B, a ebullición suave. Luego el líquido obtenido se filtró para eliminar los ácidos grasos y se evaporó a Baño María hasta casi sequedad. Ese residuo, previamente desecado a vacío sobre  $P_2O_5$  o KOH., se llevó a 25 cc. con agua destilada (A) y a 20 cc. (B).

Se determinó el pH de la solución obtenida en un potenciómetro, resultando ser de 1,1 en ambos casos.

Esta hidrólisis tuvo por objeto liberar a las bases nitrogenadas de los fosfátidos, de la unión con el ácido fosfórico, obteniéndose de esa manera: ácido glicerofosfórico, ácidos grasos (que se eliminan posteriormente por filtración) y clorhidrate de colina, de colamina y de serina, permitiendo así su investigación en ese extracto por cualquiera de las técnicas existentes para microcantidades.

Los hidratos de carbono, liberados por la hidrólisis de los complejos con fosfolípidos y proteínas, existentes en todos fosfátidos de plantas y microorganismos, se encuentran siempre en la porción acuosa del hidrolizado.

### HIDROLISIS DE LECITINA DE SOYA

El nombre de lecitina se le da generalmente a los fosfolípidos comerciales, que contienen, además de los fosfátidos propiamente dichos, un 35-40% de aceite, que se considera que ejerce una función de estabilizador en estos productos tan sensibles a la acción del oxígeno y de la humedad.

Se usó una lecitina de soya comercial, que era un sólido de aspecto ceroso, consistente y de color anaranjado oscuro.

El olor y gusto de esta lecitina está relacionado con el del aceite de soya.

Técnica usada: 4 gr. de este material se sometieron a hidrólisis durante 36 hrs. con  $\text{CaH}_2$ , operando luego en la misma forma que en el caso anterior.

El residuo, desecado a vacío, se llevó a 25 cc. con agua, resultando una solución de pH 1.

Sobre este hidrolizado de lecitina de soya, se aplicaron las mismas técnicas cuali y cuantitativas que en el caso de germen de trigo.

La valoración cuidadosa de los constituyentes fundamentales de los fosfátidos, al igual que la de fósforo total, carecería de sentido en este material por la diversidad de datos existentes para las distintas muestras comerciales. No obstante, se ha hecho sólo como una guía o control, sobre todo en los ensayos cromatográficos.



### DETERMINACION DE FOSFOLIPIDOS TOTALES

De los tres métodos posibles para la determinación de fosfolípidos totales: a) por método oxidativo; b) por determinación de fósforo de fosfolípidos y c) por valoración de ácidos grasos, anteriormente comentados, se eligió el segundo por su mayor sencillez y exactitud, ya que la sola valoración de este elemento mide la cantidad de fosfátidos totales.

Algunos autores prefieren determinar lo en el precipitado obtenido por acción de acetona o  $\text{Cl}_2 \text{K}_2$  sobre el hidrolizado, mientras que otros lo efectúan directamente sobre este último.

Las precauciones a tomar varían con cada material, ya que la solución a analizar puede contener otros materiales fosforados que no provengan de los fosfolípidos y ésta constituye la más grande fuente de error. En esos casos se hace indispensable una purificación, como ocurre por ejemplo en sangre, tejidos y músculos.

En grasas, aceites y germen de cereales, donde no existe la posibilidad de contaminantes, no es necesaria la etapa de purificación.

Existen numerosos métodos para la determinación de fósforo: gravimétricos, nefelométricos, gasométricos, titrimétricos y colorimétricos. Nosotro adoptamos uno de estos últimos, por su rapidez y aplicación a micro cantidades, tal como las existentes en germen de trigo.

La mayoría de los procedimientos de este tipo se basan en la conversión del ácido fosfórico a ácido fosfomolibdico y su posterior reducción a azul de molibdeno.

Como agente reductor se han propuesto varios, por ejemplo: hidroquinona (Bell y Deisy, 1920); ácido 1 amino 2 hidroxinaftaleno sulfónico (Fiske y Subarow, 1925),  $\text{Cl}_2 \text{Sn}$  (Kuttner

y Cohen, 1927), etc. etc.

La técnica empleada por nosotros, usa como reductor un reactivo constituido por molibdato-sulfato de hidrazina y fue desarrollado en los últimos años por Beveridge y Johnson (45).

#### Preparación del reactivo:

A 25 cc. de una solución de  $\text{Na}_2\text{O}_4 \cdot \text{Na} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  al 2,5 % en  $\text{SO}_4\text{H}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , se añaden 10 cc. de sulfato de hidrazina de 0,15 % y se llevaba a 100 cc. con agua. Debía estar recién preparado en el momento del uso.

#### Procedimiento:

Un cc. de las soluciones en cuestión, (los hidrolizados de germen A y B y de lecitina de soya en nuestro caso), se colocaban en tubos Pyrex, se les añadía un cc. de  $\text{SO}_4 \text{H}_2$  concentrado y se calentaban 5 minutos a llama suave, luego se agregaban dos gotas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de 100 volúmenes, agitando luego del añadido de cada gota, y se calentaban 10 minutos más.

Se dejaban enfriar y se pasaban a balancitos aferados de 50 cc de capacidad. Se añadían 20 cc. de reactivo sulfato de hidrazina - molibdato, llevaba a volumen con agua, mezclaba y dejaba 10 minutos en baño de agua hirviendo. Luego se dejaba enfriar hasta que el menisco volviera a su posición.

Se obtenía así un hermoso color azul, estable 24 hs. que acusaba hasta 4 gamas de fósforo al espectrofotómetro.

Esta técnica se llevó a cabo primero con cantidades de fósforo crecientes, desde 10 gamas hasta 100 gamas, con el objeto de calibrar el aparato y trazar la curva correspondiente.

Para ello se preparó una solución stock de  $PO_4H_2K$ , que contenía mg. de  $PO_4H_2K$  en 100 cc. de agua; 10 cc. de ésta, se llevaban a 100 cc. con agua y se obtenía una solución estándar diluida, de la cual 1 cc. equivalía a 100  $\mu$ gms de fósforo.

De los 25 cc. del hidrolizado de germen A. de pH 1,1, se tomaron 2,5 cc. y se llevaron a 50 cc. con agua destilada y la determinación de fósforo se llevó a cabo sobre 1 cc. de la solución resultante.

En el caso de la lecitina de soya, de los 25 cc. de hidrolizado, 1 cc. se llevó a 50 cc. y para la determinación de fósforo, se usó 1 cc. de esta nueva solución.

Para la estimación del contenido en fósforo de la muestra B de germen, se realizó una nueva calibración del aparato, en la misma forma que la anterior, con una nueva solución estándar de fósforo, resultando una recta casi coincidente con la anterior.

En este caso, de los 20 cc. de hidrolizado B, se tomó 1 cc. y se llevó a 25 cc. usándose 1 cc. de esta última.

Para la valoración de P en lecitina, se usó en este caso, el nuevo hidrolizado.

En cada caso, las lecturas se efectuaron en un espectrofotómetro Coleman Universal, a  $630 \mu$  y antes de las 2 horas siguientes al desarrollo de color.

CALIBRACION DEL APARATO PARA DETERMINACION  
DEL FOSFORO

En las dos calibraciones efectuadas, las lecturas corresponden a absorción de color.

<u>Cant. de P.</u> (en $\gamma$ )	<u>Primera det.</u>	<u>Segunda det.</u>
10	0,92	0,8
20	1,45	1,5
30	2,5	2,48
40	3,3	3,2
50	3,8	4,1
60	4,65	4,65
70	5,4	5,55
80	5,9	6,49
90	7	
100	7,25	
Germen (A)	4,15	
Lecitina (A)	4,8	
Germen (B)		3,05
Lecitina (B)		5

Muestra A. de germen de trigo:

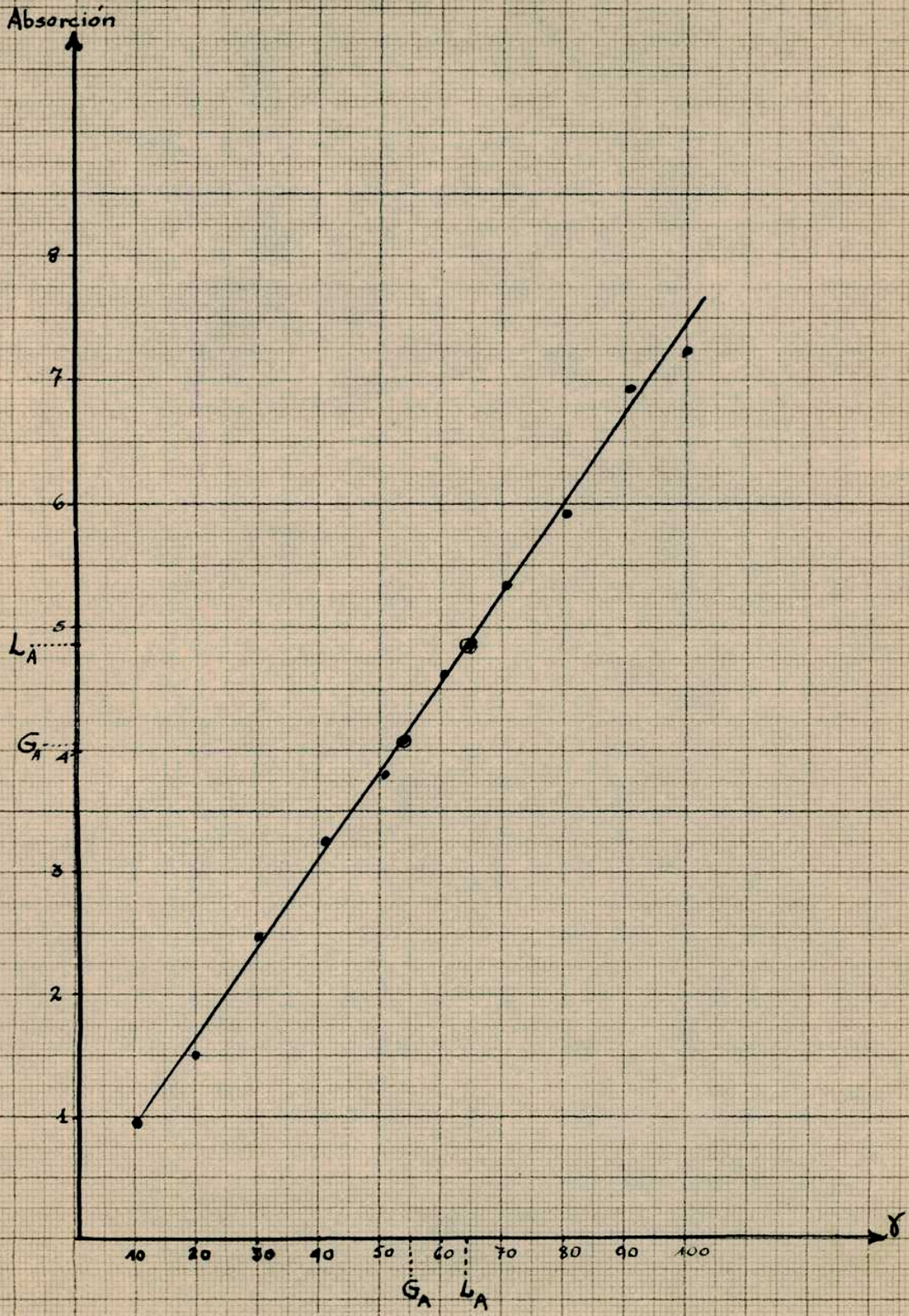
De acuerdo al gráfico, 1 cc. de hidrolizado equivale a 54,8  $\gamma$  de P, lo que significa una cantidad de 0,063 gr. de P en 100 gr. de germen.

Para la conversión de P a fosfátidos totales, adoptamos el factor propuesto por Jamieson y Mac Kinney (38):  $F : 100 : 25$  ya que el contenido en P de los glicerofosfatos es de aproximadamente 4%.

$0,063 \times F : 1,575$  % de fosfátidos en la muestra A. de germen de trigo.

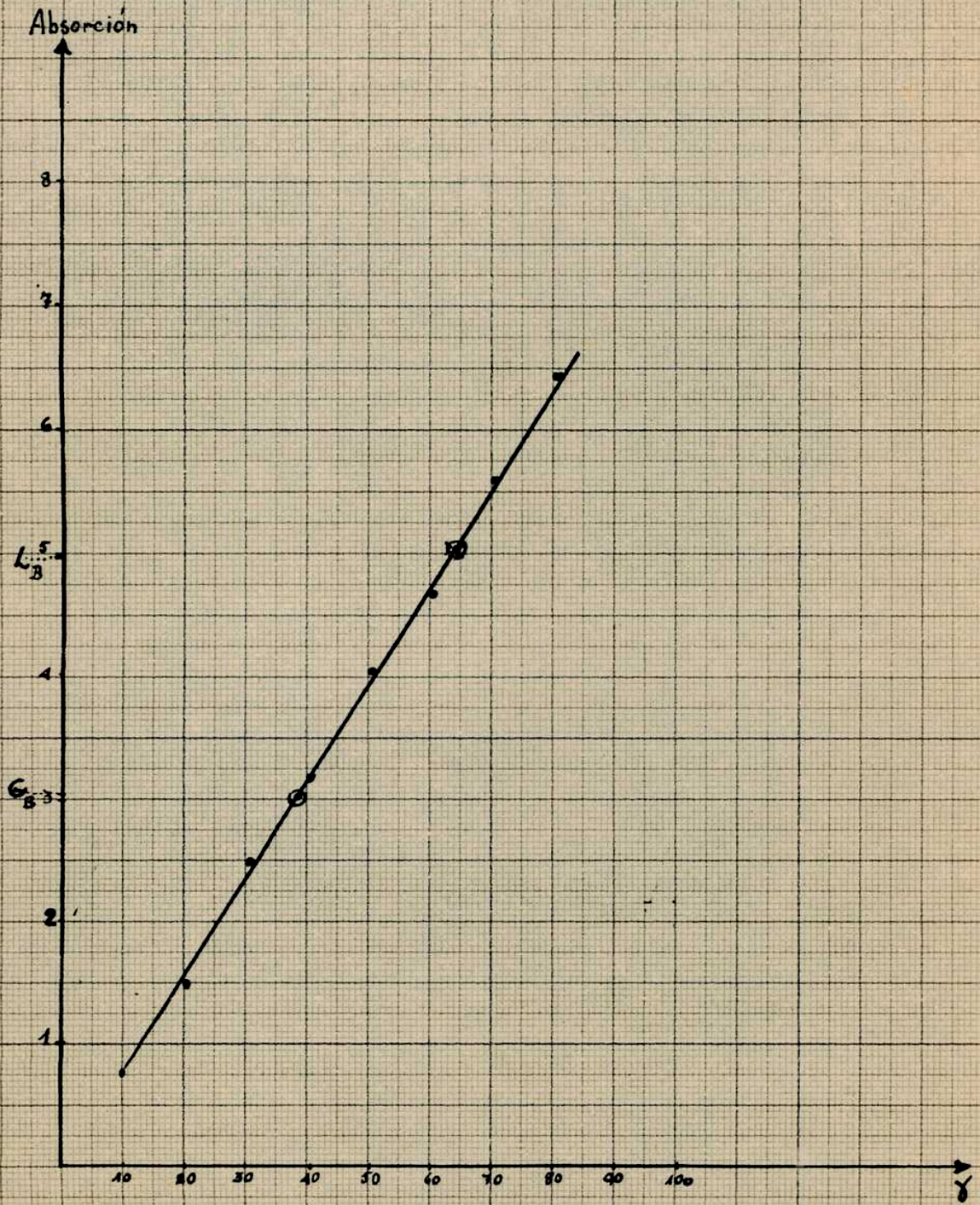
Primera Calibración

Corresponde a las muestras "A" de Germen de trigo y Lecitina de soya

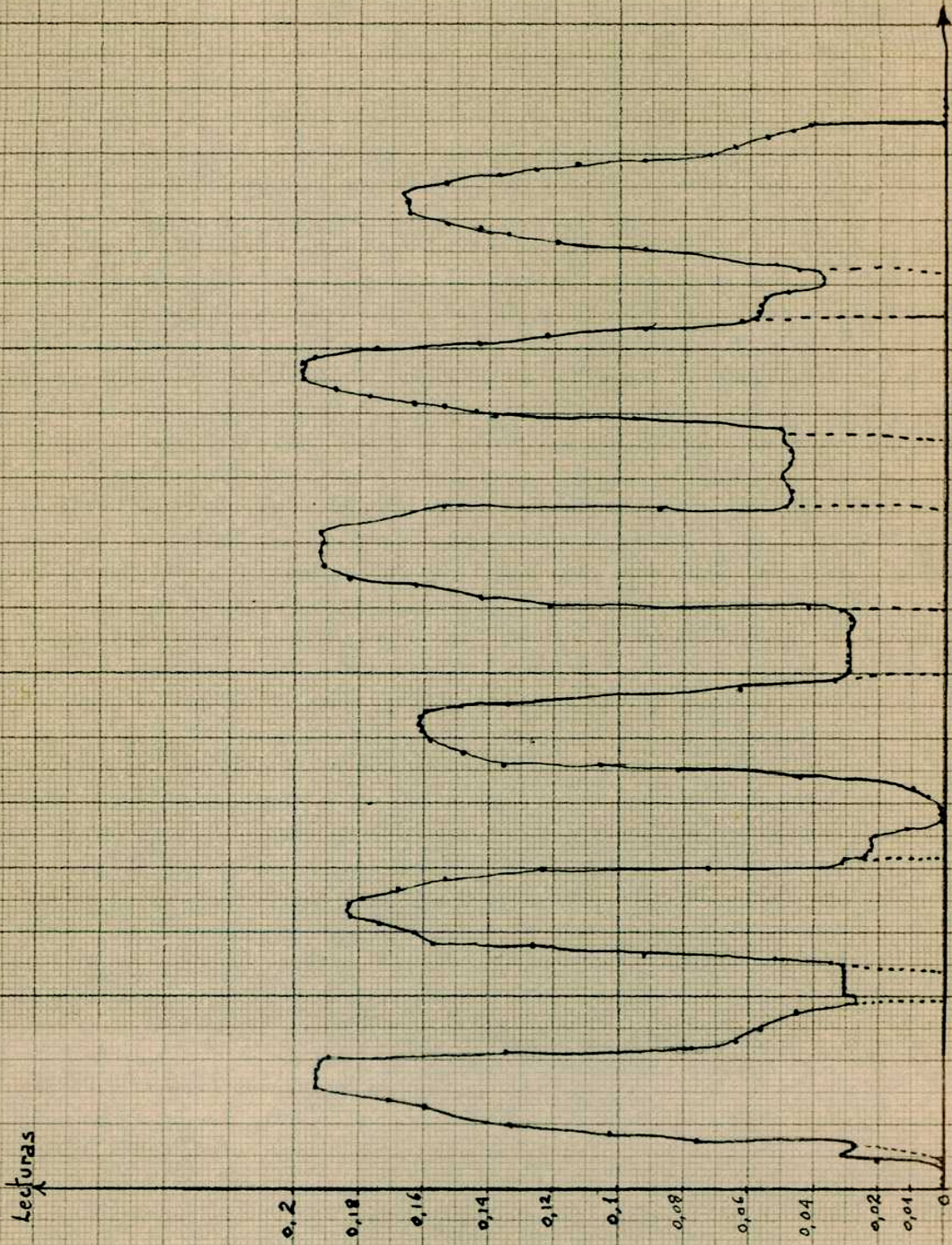


Segunda Calibración

Corresponde a las muestras "B" de Gerben de trigo y Lecitina de soya



Primera determinación de Colina en muestra "A" de germen de trigo y lecitina de soya  
Orden de las manchas: 55, 50, 45, germen, kernen, lecitina.



Muestra B. de germen de trigo:

1 cc. de hidrolizado equivale a 38,4  $\gamma$ , e sea que contiene 0,064 gr. de P por 100 gr. de germen.

$0,064 \times P$  : 2,6% de fosfátidos en la muestra B.

Muestra A. de lecitina de soya:

1 cc. de hidrolizado equivale a 63,5  $\gamma$ , de P. e sea 1,98 gr. de P por 100 gr. de lecitina.

$1,98 \times P$  : 49,5% de fosfátidos.

Muestra B. de lecitina de soya:

1 cc. de hidrolizado equivale a 63,8  $\gamma$  de P, e sea a 2 gr. de P por 100 gr. de lecitina.

$2 \times P$  : 50% de fosfátidos.



INVESTIGACION DE COLINA, COLAMINA Y SERINA EN  
HIDROLIZADO DE GERME DE TRIGO Y LECITINA DE  
SOYA

Previamente a la localización de estas sustancias por cromatografía sobre papel, en el hidrolizado de germe de trigo y lecitina de soya, se hicieron ensayos con las sustancias puras, con el objeto de ajustar la técnica y establecer las condiciones óptimas de trabajo.

Las sustancias empleadas eran: el Serina (Merk); Colamina (Stanolamina), purificada por destilación (PE 171-171,5) y Clorhidrato de colina U.S.P. Esta Chem. Corp. libre de humedad.

El papel usado fué en todos los casos: "Schlischer y Schull" N° 597.

Se hicieron soluciones: acuosas de clorhidrato de colina (150 mgr. en 25 cc.), colamina (200 mgr. en 10 cc) y serina (10 mgr. en 50 cc.) y microcantidades se sometieron a cromatografía ascendente de acuerdo a la técnica de Levine, Chargaff y Green (194).

Se cortaban rectángulos de papel de 50 cm. de largo y ancho variable según las muestras a desarrollar y a 2,2 cm. del borde inferior se colocaban gotas de 0,01 cc. mediante una pipeta capilar calibrada y con una separación de por lo menos 2,5 cm. entre una y otra. Una vez bien secas las gotas depositadas, se daba al papel forma de cilindro, cuidando de no unir los bordes y se sujetaba con ganchitos de vidrio.

Las cámaras cromatográficas, de vidrio y de unos 55 cm. de altura aproximadamente, se saturaban durante por lo menos 8 hs. con el solvente a usar, que se hallaba dentro de un cristallizador y estaba completamente aisladas del exterior,

levantándose solamente el tiempo necesario para colocar el cilindro de papel.

El solvente se dejaba correr 18 hs. y al cabo de ese período, había ascendido una longitud variable según la temperatura ambiente y la naturaleza del solvente.

Los más comúnmente empleados en este tipo de cromatografía consta generalmente de un solvente orgánico o mezcla de varios, parcialmente solubles en agua y saturados con ésta.

El método descrito se llevó a cabo con los siguientes solventes:

- a) n Butanol - Morfolina (3:1)
- b) n Butanol - Piridina (4:1)
- c) n Butanol - Dioxano (4:1)

Morpholine purísima - John Bell          Croyden - London V.1  
Piridina bidest - Fracc. Malinkrodt.

Estas mezclas se saturaban con agua y para todas las experiencias se usaba la capa superior.

Fue ensayado también uno de los sistemas alcalinos propuestos por Manier y Machobeeff en 1951 (105), se ha comentado en la página 31. El sistema en cuestión es el llamado por ellos: Fase alcalina 7 (solvente d), con el que se obtuvieron manchas muy nítidas y sin solas, sobre todo en caso de colina.

En este caso, se usaba la técnica anterior, con la única diferencia de que la cámara era más pequeña, (40 cm. de altura), ya que se necesitaban sólo 6 hs. para obtener una buena separación y en ese lapso el solvente corría aproximadamente unos 25 cm.

Para localizar colina, colamina y serina en germen de trigo, se aplicaban al papel 0,01 cc. de los 25 cc. de hi-

drolizado y lo mismo para lecitina de soya. En cada caso se hacía un control en el mismo cromatograma, con las sustancias puras.

Al sacar el cromatograma, luego del tiempo establecido, se marcaba el frente alcanzado por el solvente y se dejaba secar al aire, quedando así en condiciones para ser revelado.

#### Técnica de revelado:

Se emplea el mismo procedimiento para colarina y serina. Para colina, éste es totalmente distinto, de allí la necesidad de desarrollar siempre cromatogramas aparte para localizar esta sustancia.

Para la identificación de serina y colarina, los papeles se secaban al aire (solvente a) ó a 90° (solventes b, c, y d), durante 30 a 60 minutos, luego se pulverizaban con solución de ninhidrina al 0,1 % en metanol y un corto calentamiento (5 a 10 minutos) en estufa a 80-90°, bastaba para desarrollar el color rosado de las zonas ocupadas por estas sustancias. Este color desaparece luego de unos días, aunque puede prolongarse un tiempo más en la oscuridad.

Otro procedimiento (108), permite detectar colarina y serina y algunos aminoácidos, sin necesidad de usar reactivos.

Basta calentar el papel a 37° C. para obtener una fluoórescencia visible a la luz ultravioleta, pero ésta se hace más nítida cuando la temperatura es más elevada.

En nuestro caso, luego de un calentamiento de aproximadamente 90 minutos a 85-90°C, se observaban a la lámpara de luz ultravioleta, manchas bien netas, de fluorescencia

blanca violácea, que se hallaron coincidentes con las obtenidas posteriormente con ninhidrina en el mismo papel. Estas manchas sólo se observaron cuando se trabajaba con *n*-butanol-piridina como solvente.

La localización de colina, con los solventes a, b, c, y d, se secaban los papeles al aire 30 minutos a una hora y luego igual tiempo en estufa a 95°C, se pulverizaban con solución acuosa de ácido fosfomolibdico al 2% y se lavaban por inmersión en un volumen considerable de *n*-butanol durante 5 minutos y luego en agua corriente otros 5 minutos. Finalmente se sumergían en una solución recién preparada de  $\text{Cl}_2\text{Sn}$  al 0,4% en  $\text{Cl}_2\text{H}$  3% y de éste modo las manchas amarillas apenas visibles de fosfomolibdato de colina, se transformaban en manchas azules, claramente definidas, de azul de molibdeno. Se probó la técnica de Munier y Machebeuf (105), con vapores de yodo, sin resultado satisfactorio.

La colina se pudo determinar bien con todos los solventes; las manchas obtenidas eran nítidas y muy particularmente cuando se trabajaba con la fase alcalina 7.

Mediante ensayos con las sustancias puras se determinó que el mejor rango para detectar colina era entre 30 y 70  $\gamma$  y entre 10 y 20  $\gamma$  para serina y colamina. Con 5  $\gamma$  de estas últimas, la mancha obtenida era muy tenue y en algunos casos no se observaba bien.

El aspecto presentado por los cromatogramas en los distintos solventes, se puede ver en las fotos de los mismos, sacadas pocas horas después de revelados.

La foto (1), corresponde a cromatogramas de colina en: *n*-butanol-merfolina (M), y fase alcalina (FA) y la (2), en *n*-butanol-dioxano (D) y *n*-butanol-piridina (P). La primera mancha, empezando por la izquierda, corresponde en todos

casos a la sustancia pura, la segunda al germen y la tercera a la lecitina de soya.

La foto (3) permite una comparación de los cromatogramas obtenidos con los 4 solventes.

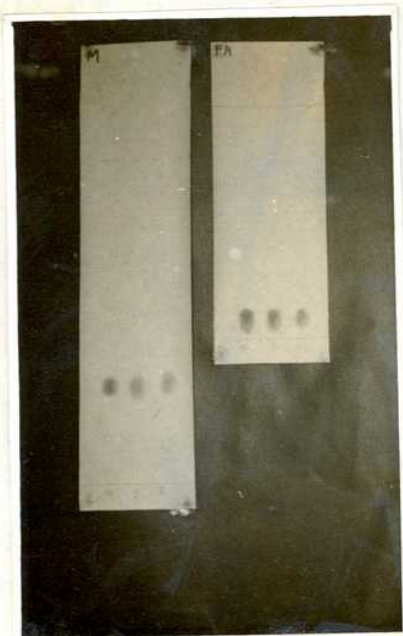
Cromatogramas en n butanol-morfolina (N) y fase alcalina (FA), revelados con ninhidrina, pueden verse en la foto (4); (a), corresponde a serina, (b) a colina y (c) al germen y (d) a lecitina. Otras manchas obtenidas en el caso del germen, sean quizá debidas a la presencia de aminoácidos que reaccionan con ninhidrina.

Lo mismo ocurre en la foto (5), con cromatogramas en a butanol-diclorano (D) y a butanol-piridina (P). En el primero se puede apreciar la forma semilunar de las manchas obtenidas con este solvente.

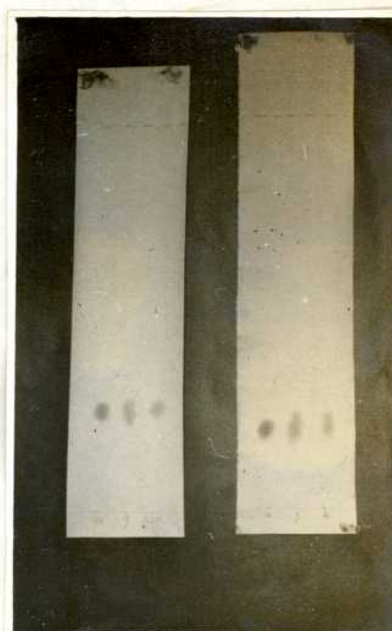
En cada caso se determinaron los  $R_f$  de las sustancias en cuestión, como promedio de un gran número de determinaciones (cuadro N° 1).

$R_f$  :  $\frac{\text{distancia recorrida por la sustancia}}{\text{distancia recorrida por el solvente.}}$

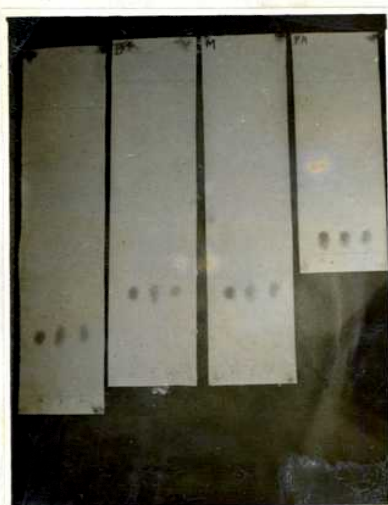
CROMATOGRAFIA DE COLINA



1) Solventes:  
Hexano-Eterfolino(3:1)  
Pentano- $\text{NH}_3$ - $\text{H}_2\text{O}$ (50:3:7)

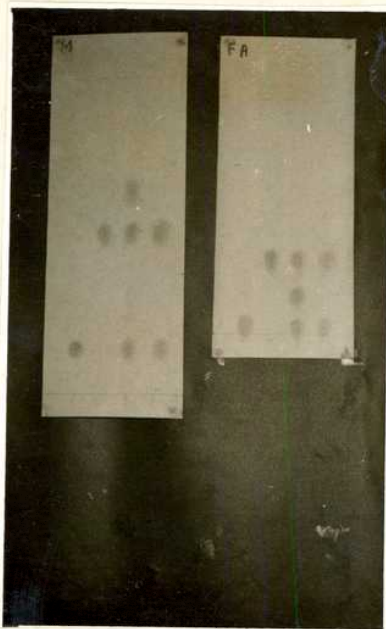


2) Solventes:  
Hexano-Dioxano(4:1)  
Pentano-Piridina(4:1)

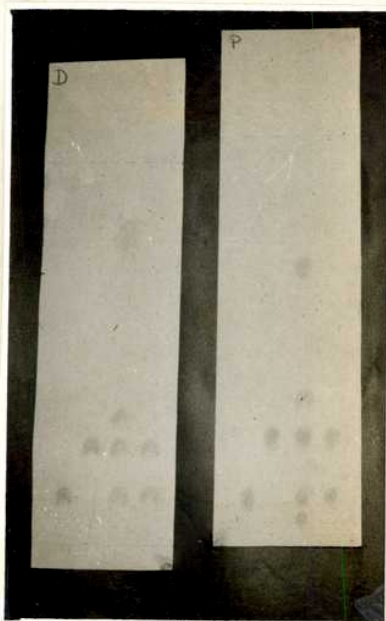


3) Comparación de las manchas obtenidas con los 4 solventes.

CROMATOGRAMAS DE COLAMINA Y SERINA



4) M:nBuOH-Morfolina (3:1)  
FA:nBuOH-NH<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O (50:3:7)



5) D:nBuOH-Dioxano (4:1)  
P:nBuOH-NH<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O (50:3:7)

CUADRO N° 1

Solvente	Tiempo, (hs)	Frente del solv.(prom) cm	Serina	Columnina	Solina
P A	6	23	0,02	0,33	0,07
H	18	30	0,14	0,50	0,30
P	18	36	0,06	0,22	0,20
D	18	36	0,13	0,25	0,26



### VALORACION CROMATOGRÁFICA DE COLINA

Las manchas de azul de molibdeno, obtenidas por reducción del fosfomolibdato de colina con  $\text{Cl}_2\text{Sn}$  en el revelado del cromatograma, cumplen la Ley de Beer, por lo tanto aprovechamos esta circunstancia para su determinación cuantitativa, por medición de la intensidad de color de la mancha, de acuerdo al método comentado en la página 28.

De la observación detenida de todos los cromatogramas de colina de germen y lecitina de soya en los distintos solventes, se eligieron para su valoración, los obtenidos usando fase alcalina como solvente, por la uniformidad de tamaño y nitidez de las manchas.

En el papel destinado a la determinación cuantitativa de colina en germen y lecitina de soya, se cromatografiaban volúmenes iguales pero de concentraciones crecientes de clorhidrato de colina puro, conteniendo: 45, 50, 55, y 60  $\%$ . Estas constituían los testigos de cada medición.

El cromatograma se obtenía del mismo modo que antes, depositando gotas de 0,01 cc. exactamente medidas y con una separación de 3 cm. entre una y otra y dejándose correr 6 hrs. el solvente.

El revelado se hacía en este caso sumergiendo el papel en solución de ácido fosfomolibdico y lavando inmediatamente en abundante n-butanol puro y luego en agua, para sumergirlos por último unos minutos en solución de  $\text{Cl}_2\text{Sn}$  recién preparada. Se dejaban secar al aire 1 hora 30 minutos aproximadamente.

Las mediciones de intensidad de color, se hicieron en un densitómetro "Elpher, Dr. Bander y Dr. Hebein, Karlsruhe, München, Zurich".

La zona transversal del cromatograma donde se hallaban

todas las manchas, era cuidadosamente cortada del anche del vidrio del aparato y empapada con una solución de  $\beta$  naftaleno y aceite de vaselina, que siendo del mismo índice de refracción que el papel, lo hace transparente.

Se colocaba luego entre dos vidrios del aparato, cuidando de que no quedara ninguna burbuja y se hacían las lecturas a cada paso del tornillo del aparato, correspondiente a 1 mm.

Los valores obtenidos se llevaban a un papel milimetrado y se trazaban las curvas.

Las áreas de las curvas se medían luego con un planímetro de la misma marca que el densitómetro; de los resultados obtenidos con toda la serie de testigos de concentración conocida, se deducía la de los desconocidos por una simple regla de tres.

Teníamos así en un mismo cromatograma, tantos valores para celina en germen y lecitina, como testigos y ellos se promediaban a un valor único.

Se efectuaron dos mediciones sobre germen A y lecitina A, en cromatogramas conteniendo:

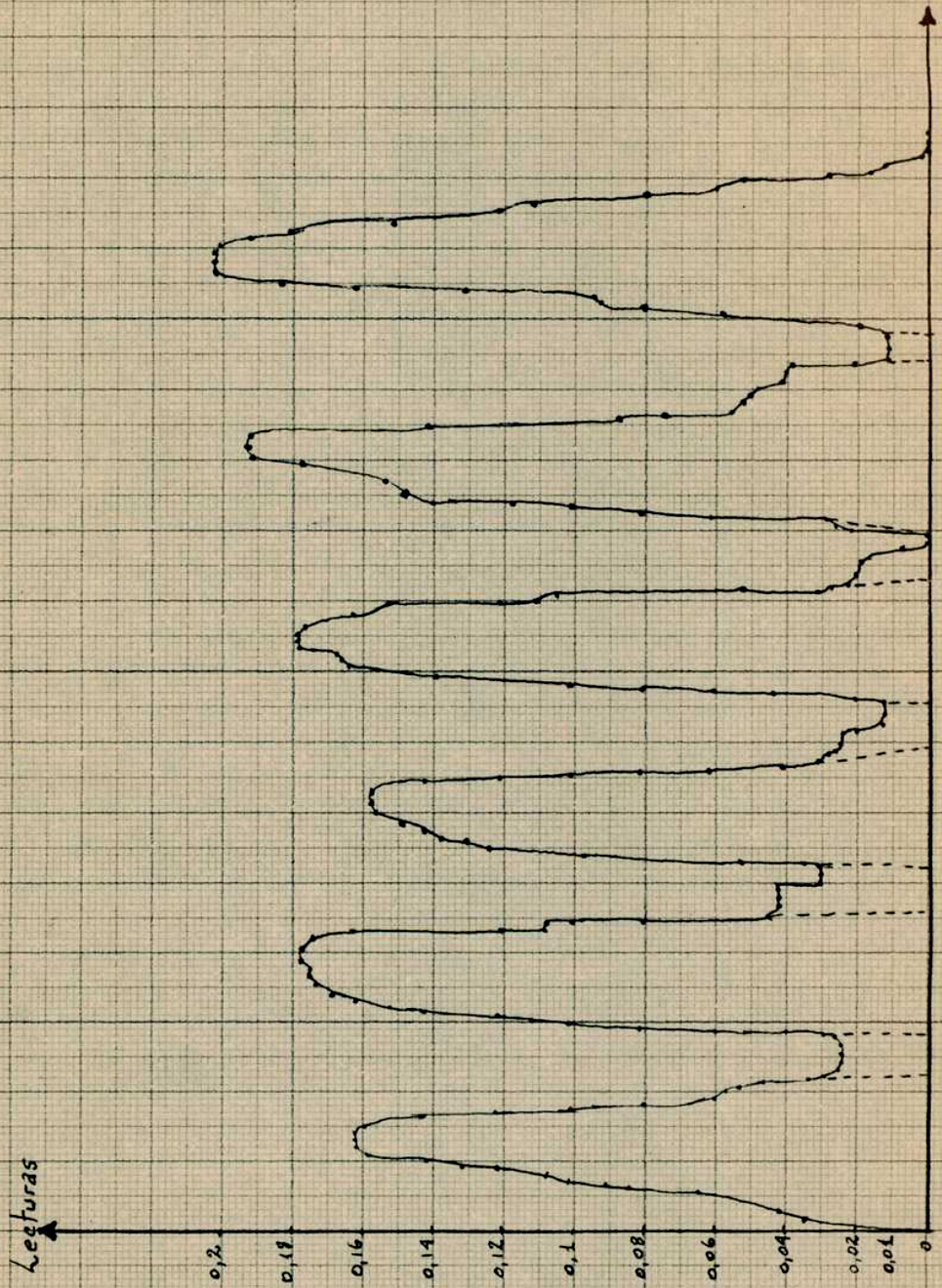
- 1) 55  $\gamma$  - 50  $\gamma$  - 45  $\gamma$  - Germen- Germen- lecit de soya
- 2) 60  $\gamma$  - 55  $\gamma$  - 50  $\gamma$  - Germen - lecit de soya.

que se representaran en los gráficos 1A y 2A; y otras dos sobre germen B, de:

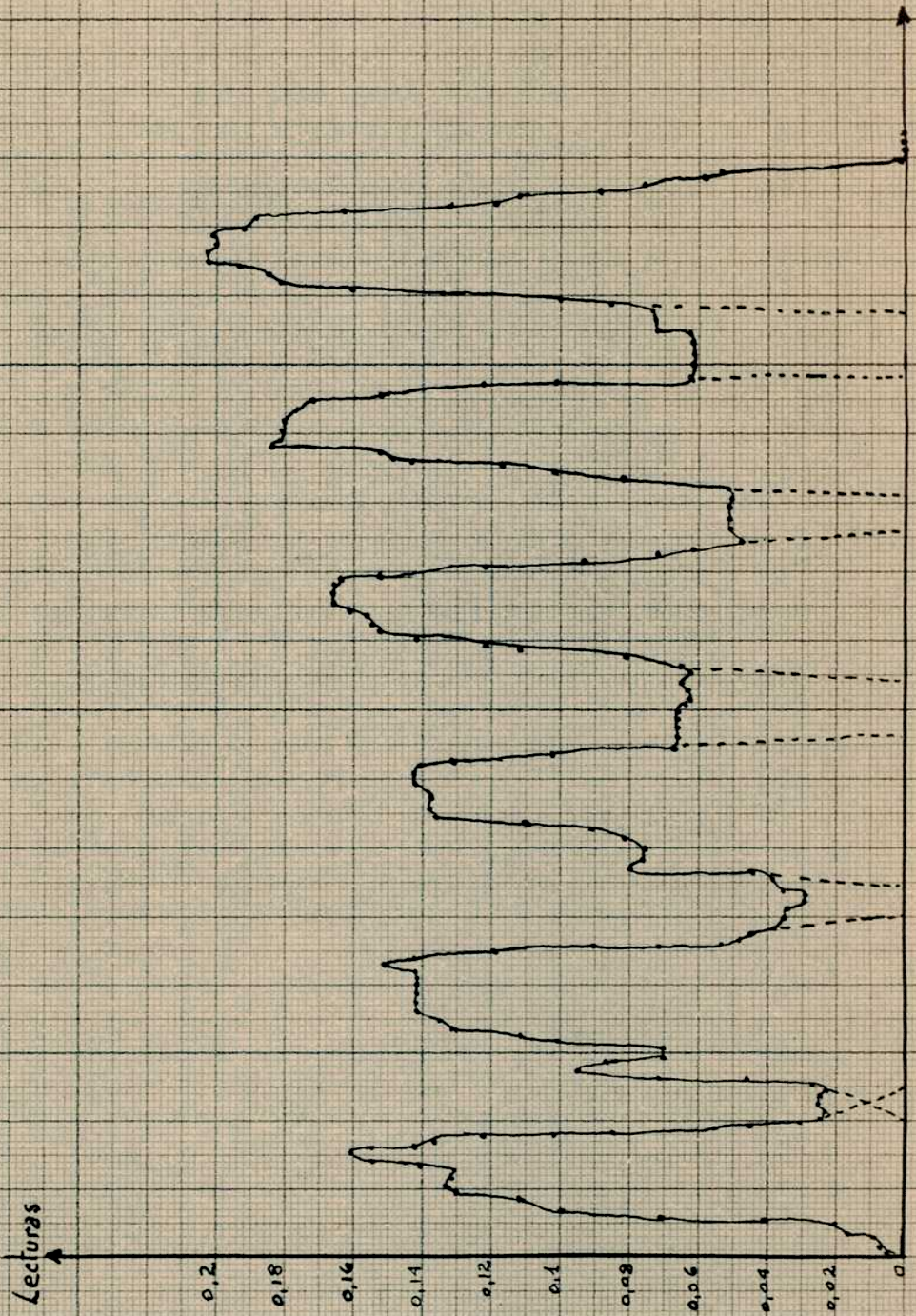
- 1) 60  $\gamma$  - 55  $\gamma$  - 50  $\gamma$  - 45  $\gamma$  - germen-lecit de soya.
- 2) 60  $\gamma$  - 55  $\gamma$  - 50  $\gamma$  - 45  $\gamma$  - germen-lecit de soya

correspondientes a los gráficos 1B y 2B.

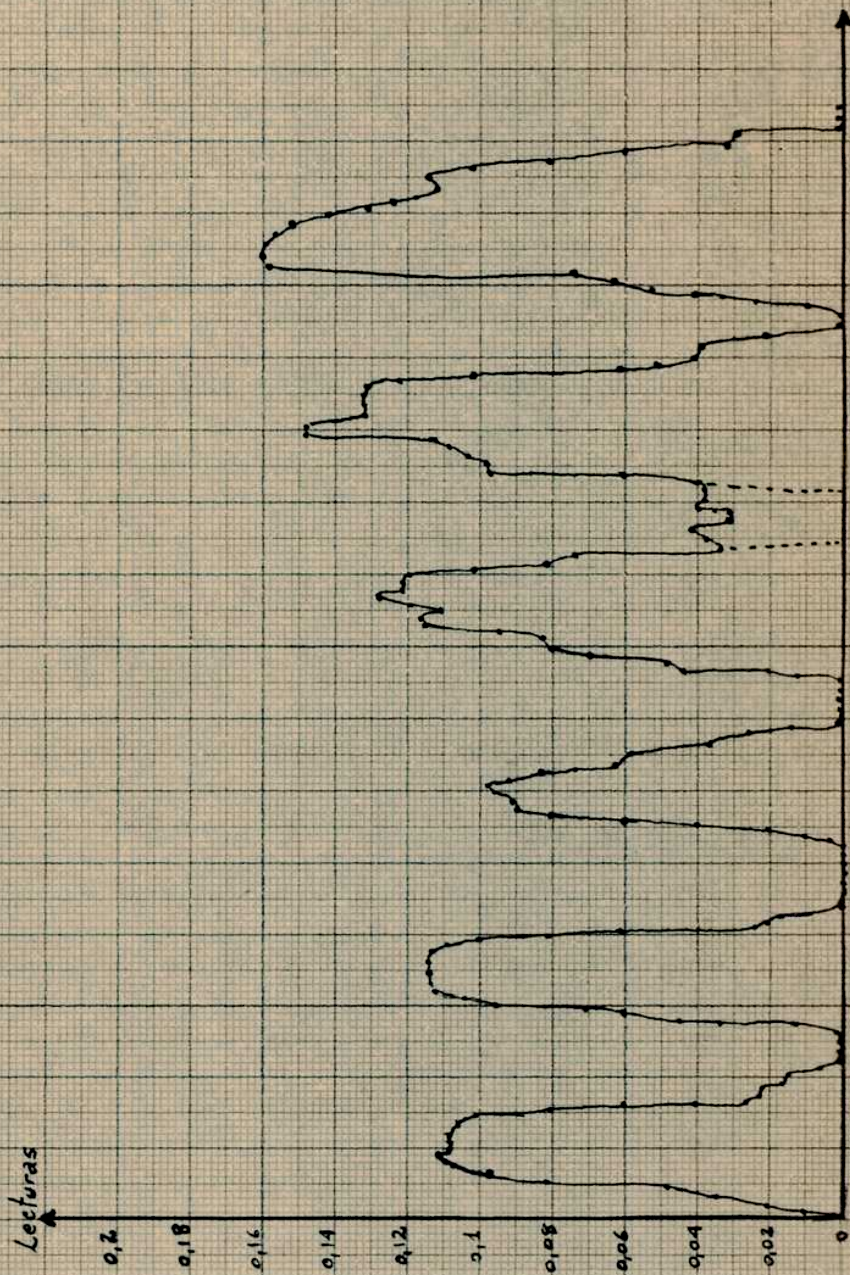
Segunda determinación de Colina en Muestra "A" de germen de trigo y lecitina de soya  
Orden de las manchas: Lecitina, Germeo, 45, 50, 55, 60



Primera determinación, de Colina en muestras "B" de Germen de trigo y Lecitina de soya  
Orden de las manchas: Lecitina, Germen, 45, 50, 55, 60.



Segunda determinación de Colina en muestra "B" de Germen de trigo y Lecitina de soya  
Orden de las manchas: Lecitina, Germen, 45, 50, 55, 60.



CONTENIDO DE COLINAGERMEN DE TRIGO:Muestra A

En la primera determinación, de acuerdo al gráfico, 0,01 cc. de hidrolizado contiene 55,4  $\gamma$ , valor promedio, lo que equivale a 3.189 mgr. de colina por gramo de germen.

En la segunda determinación, (gráfico 2A), 0,01 cc. de hidrolizado contiene un valor promedio de 55,7  $\gamma$ , equivalente a 3.205 mgr. de colina por gramo de germen.

Muestra B

La primera determinación acusa un valor promedio de 48,6  $\gamma$  en 0,01 cc. de hidrolizado, resultante un contenido de 3,24 mgr. de colina por gramo de germen.

La segunda determinación, acusa un valor promedio de 48,2  $\gamma$  para 0,01 cc. de hidrolizado, equivalente a 3,21 mgr. de colina en un gramo de germen.

LECITINA DE SOYAMuestra A

Primera determinación: A 0,01 cc. de hid., corresponden 47,4  $\gamma$  de colina (valor promedio), o sea 29 mgr. de colina por gramo de lecitina.

Segunda determinación: A 0,01 cc. de hid., corresponden 48,3  $\gamma$  (promedio), o sea 30,2 mgr. de colina por gramo de lecitina.

Muestra B

Primera determinación: de un valor promedio de 46,3  $\gamma$

de colina en 0,01 cc. de hidrolizado, e con 2,89 gr. de colina per 100 gramos de lecitina.

Segunda determinación: Da un valor promedio de 46,2  $\gamma$  en 0,01 cc. de hidrolizado, e con 2,88 gr. de colina per 100 gr. de lecitina.

VALORACION CROMATOGRAFICA DE COLAEMINA Y SERINA

Tanto para la valoración de colaemina, como de serina, se usó una técnica, que combina la cromatografía en papel, con los métodos cuantitativos standard, como es la de "elución de las manchas", anteriormente mencionada.

Para evitar los errores debidos a superposición e vecindad de las manchas, estos métodos requieren una buena separación de las sustancias en el papel ( $R_f$  suficientemente distintos).

En nuestro caso eso se cumple con *n*-butanol-morfina como solvente (ver foto (4), pág. 49) y por esta razón fué elegido para las determinaciones.

Existen innumerables técnicas de valoración de aminoácidos en mezclas, por colorimetría del producto de la reacción con la ninhidrina (93), (94), (95), (96).

Varios investigadores usaron métodos semicuantitativos, que dependían del tamaño e intensidad de la mancha, pero sin tener en cuenta los efectos de la variación del pH, contenido de agua, concentración de la ninhidrina y el tiempo y temperatura óptimos para el desarrollo de color.

Nosotros elegimos para serina, la técnica de Hartalin (93), que está basada en la investigación de las variables anteriores.

Los cromatogramas destinados a la determinación cuantitativa, los secábamos solamente al aire, para evitar todo error proveniente de la volatilización de sustancia al someterla al calor.

Se localizaban las posiciones de serina y colaemina, tratando el papel con solución de ninhidrina 0,05 % en *n*-butanol.



Se calentaba 3 minutos en estufa a 80° C, se enfriaban a temperatura ambiente y se recortaban las manchas dejando un margen. Esos pedacitos de papel se colocaban en tubos de ensayo secos y se trataban con solución de ninhidrina al 5% en un bafuel saturado con agua. El agua había sido previamente llevada a pH 7 con Buffer de Sørensen (1 cc. de buffer cada 20 cc. de agua).

La cantidad de solución de ninhidrina al 5% añadida a cada tubo, era la suficiente para humedecer totalmente el papel.

Los tubos se dejaban a temperatura ambiente 5 minutos y otro tanto en baño de agua a 55° C. Luego se aumentaba la temperatura a 80° C por uno o dos minutos.

Una vez frías los tubos, se extraía el producto coloreado de cada uno con 20 cc. de acetona al 75 % de agua. La extracción era completa antes de los 20 minutos y el color violáceo de la solución obtenida era estable unas 12 horas aproximadamente.

Las lecturas se hicieron en el espectrofotómetro Coleman universal a  $650/\mu$ .

Previamente a la determinación de serina en germen de trigo, se calibró el aparato con cantidades crecientes de sustancia pura: 15  $\gamma$ , 20  $\gamma$ , 25  $\gamma$  y 30  $\gamma$ , cromatografiadas en las mismas condiciones. (Gráfico 1 A).

Se hicieron dos valoraciones de serina en germen y lecitina A y otras dos para las muestras B. En este último caso se realizó un nuevo calibrado, hallándose coincidente con el anterior.

Los volúmenes depositados en cada caso, eran de 0,01 cc.

La técnica anterior de Häftalin, válida para aminoácidos,

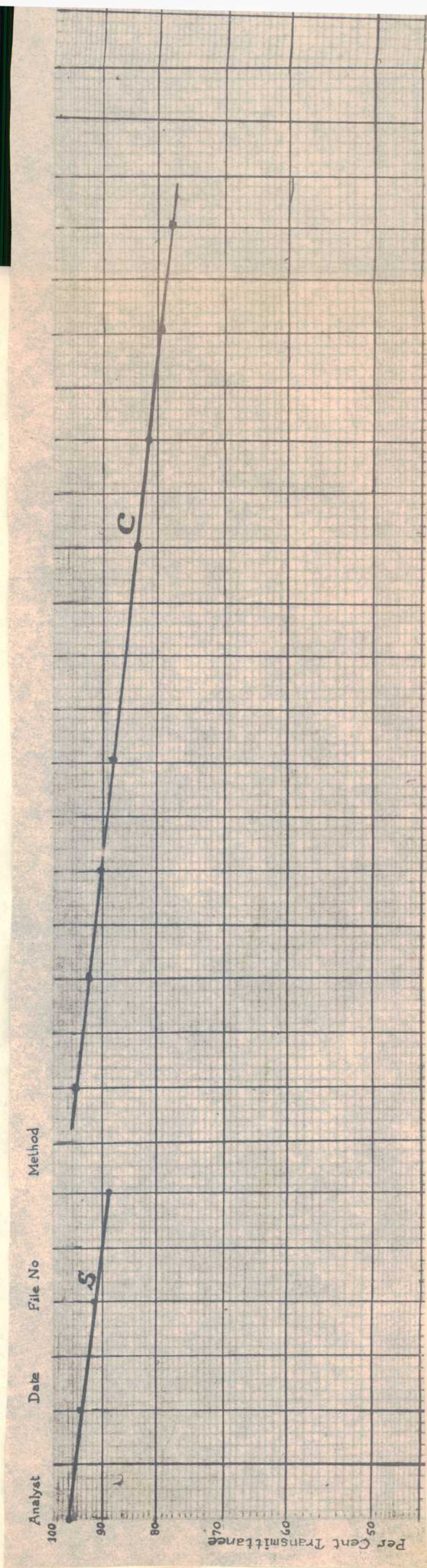
Fue aplicada por nosotros para la valoración de colamina en estos productos, obteniéndose resultados satisfactorios. La única diferencia en este caso es que la extracción del producto coloreado se hacía con 6 cc. de acetona al 75 % en agua.

En el caso de colamina, se cromatografiaban 0.01 cc. para el caso de soluciones de sustancia pura, 0,03 cc. para el hidrolisado de germen de trigo de 0,02 cc. para el hidrolisado de lecitina de soya. En los dos últimos casos, se depositaban tres gotas de 0,01 cc. y dos gotas de igual volumen respectivamente, en un mismo lugar, teniendo la precaución de dejar secar bien la primera antes de aplicar la siguiente.

Como en el caso anterior, se hicieron para colamina dos calibrados del aparato con: 15  $\gamma$ , 20  $\gamma$ , 25  $\gamma$ , 30  $\gamma$ , 40  $\gamma$ , 45  $\gamma$ , 50  $\gamma$  y 55  $\gamma$ , que resultaron coincidentes, para las determinaciones en las muestras A y B.

Las determinaciones de colamina se hicieron por duplicado en cada muestra.

DETERMINACIONES DE OXIGENO Y HIDRÓGENO



CONTENIDO DE SERINA

Calibrado del aparato:

Cant. de serina	Lecturas (transmisión)
15	96
20	94
25	91
30	88,5
Germen A (1a. det.)	92
Germen A) (2a. det.)	92,9
Lecitina A (1a. det.)	93,1
Lecitina B (1a. det.)	93
Lecitina A (2a. det.)	93,2
Lecitina B (2a. det.)	92,9
Germen B (1a. det.)	93
Germen B (2a. det.)	92,8

Muestra A, de germen de trigo: El promedio de todas las determinaciones, revela un contenido, de acuerdo al gráfico, de 23,2  $\delta$  de serina en 0,01 cc. de hidrolizado; lo que equivale a 1,337 mgr. de serina por gramo de germen.

Muestra B de germen de trigo: En este caso, el promedio de los valores, acusa el contenido de 21,1  $\delta$  en 0,01 cc. de hidrolizado, o sea: 1,4 mgr. de serina por gramo de germen.

Lecitina de soya:

	Cantidad de serina en 0,02 cc. de hid.	Id. por 100 gr. de lecitina.
	(Valores promedio)	
Muestra A	20,9	1,305 gr.
Muestra B	21,6	1,35 gr.

CONTENIDO DE COLAJINA

## Calibrado del aparato:

Cant. de colajina	Lecturas (transmisión)
15	95
20	93,1
25	90,8
30	91
40	83,8
45	81,5
50	79,1
55	77,4
Germen A (1a. det.)	90,6
Germen A (2a. det.)	96,4
Germen B (1a. det.)	97
Germen B (2a. det.)	97,2
Lecitina A (1a. det.)	90,5
Lecitina A (2a. det.)	90,8
Lecitina B (1a. det.)	90
Lecitina B (2a. det.)	90,02

Germen de trigo:

	Cant. de colajina en 0,03 cc. de hid.	Id. por gramo de germen
	(Valores promedio)	
Muestra A	12,1	0,23 mgr.
Muestra B	10,9	0,24 mgr.

Lecitina de soya:

	Cant. de colajina en 0,02 cc. de hid.	Id. por 100 gr. de lecitina
	(Valores promedio)	
Muestra A	25,1	0,785 gr.
Muestra B	25,5	0,8 gr.

RESULTADOS

El promedio de todas las determinaciones efectuadas sobre dos muestras de una misma partida de germen de trigo argentino y lecitina de soya, nos condujo a los siguientes valores, para el material analizado:

	<u>Germen de trigo</u>	<u>Lecitina de soya</u>
Fósforo de fosfátidos (gr/100 gr)	0,0635	2,99
Fosfátidos totales (%)	2,58	49,75
Clorhidrato de colina (mgr)	3,22	29,37
Serina (mgr/gr)	2,368	13,27
Colamina (mgr/gr)	0,236	7,92

### CONCLUSIONES

1) Se ha encontrado que la cantidad de fosfolípidos totales obtenida con el método de valoración de P, está de acuerdo con la hallada en la literatura para este tipo de material.

2) Dada la pequeñaísima proporción en que se hallan la colina, colamina y serina en los vegetales, se aplicaron técnicas cromatográficas sobre papel para su separación, separación y determinación cuantitativa, las que han sido ampliamente desarrolladas para el caso de componentes de fosfolípidos de cerebro.

3) se ensayó el uso de diversos solventes: nBuOH- Xerfolina (3:1) (a), nBuOH-diclorano (4:1) (b), nBuOH-Piridina (4:1) (c) y nBuOH- $\text{NH}_3$ - $\text{H}_2\text{O}$  (50:3:7) (D), determinándose los  $R_f$  correspondientes a las tres sustancias, previo ajuste de las técnicas mediante el uso de sustancias puras.

4) La Serina y Colamina se revelaron en un mismo cromatograma y la de colina en cromatograma aparte, usando las mismas técnicas que en el caso de fosfolípidos cerebrales.

5) La localización de Serina y Colamina, desarrolladas con solvente (c), se hizo además mediante el uso de luz ultravioleta, de acuerdo a la técnica de Phillips (10<sup>8</sup>).

6) Se eligió para cada sustancia el solvente con el que se obtenían manchas más nítidas y se ensayó en ellos la "Cromatografía Cuantitativa". Se determinó además en cada caso, el límite de concentración de sustancia necesario para su identificación cromatográfica y el rango preferido para la misma.

La Colina se valoró por densitometría del color azul obteniendo reduciendo las manchas de fosfomolibdato de Colina con  $\text{Cl}_2\text{S}_a$  en el papel. Los valores obtenidos son:

	<u>Cereales</u>	<u>Lecitina</u>
Clorhidrato de colina (mgx/gx)	3,22	29,2

Las determinaciones efectuadas con Colina pura empleando el mismo método, indican que dicho método da valores correctos.

7) La valoración de Colamina y Serina se realizó usando técnicas combinadas de cromatografía en papel con métodos cuantitativos estándar.

8) La aplicación del método de Naftalín ( 93 ) de elución de las manchas de la reacción con la ninhidrina y su medición con el espectrofotómetro, para aminocidos, dió muy buenos resultados con Serina y se encontró que es también aplicable, con ligeras modificaciones, en el caso de la Colamina, hallándolo válido dentro de un amplio margen de concentraciones de la misma.

9) En todas las etapas del trabajo, se realizaron simultáneamente las mismas determinaciones sobre una muestra de lecitina de soya comercial, como control y guía, dada su reconocido contenido en Colina, Colamina y Serina.

10) Los valores obtenidos con la aplicación por vez primera de las técnicas descriptas, a este tipo de material, son del orden de las halladas por otros autores con los métodos comunes de la química analítica cuantitativa, sólo que con la aplicación exitosa de la cromatografía, disponemos de un método rápido, elegante y relativamente sencillo para la determinación de Colina, Colamina y Serina en cereales, que de otro modo sería largo y tedioso dada la complejidad del material.

J. M. Hernández - J. P. Suelto



BIBLIOGRAFIA

- (1) Bloor W.H. Chem. Rev. 2,243. (1925)
  - a) Bloor J.B. c.22,133 (1915)
  - b) Bloor J.B.c 68,33 (1926)
- (2) Thudichum J.L.W. Die Chemische Konstitution des Gehirns des Menschen und der Tiere (1901).
- (3) Anderson A.J. (1927) J. Biol. Chem. 74,525.
- (4) Mac Lean H. (1908) Z. Physiol. Chem. 57,296.
  - a) Mac Lean (1909) Biochim. J. 4,38,168.
- (5) Dakinow C. (1868) Zentr. Med. Wissensch. 2,97.
- (6) Hundeshagen F. (1883) J. Prakt. Chem. 12,585.
- (7) Gilson E. (1888) Z. Physiol. Chem. 12,585.
- (8) Trier G. Z. Physiol. Chem. 73,383. (1911)
- (9) Kennell M.H. (1913) Biochem. z. 55,296.
- (10) Folch J. (1942) J. Biol. Chem. 146,31.
- (11) Thierfelder H. y Schulze E. (1915) Z. Physiol. Chem. 96,296
- (12) Mc Arthur C.G. (1914) J. Am. Chem. Soc. 36,2397.
- (13) Christensen H.H. y Hastings A/B. (1940) J. Biol. Chem. 136,387.
- (14) Hlix G. (1941) J. Biol. Chem. 137, 495.
- (15) Folch J. y Seeley D.B. (1942) J. Biol. Chem. 142,963.
- (16) Hoppe-Seyler F. (1877) "Physiologische Chemie", Berlin.
- (17) Jacobson M. (1889) Z. Physiol. Chem. 13,32.
- (18) Klenk E. y Sakai E. (1939) C.A. 33,4610.
- (19) Newald B. y Niide K. (1933) Biochem. Z. 260,147.
- (20) Haldan W. (1942) Fette u. Seifen 49,697.
- (21) Schulze E. y Steiger E. (1889) Z. Physiol. Chem. 13,365.
- (22) Kettbohn F.E. y Mayer F.M. (1934) C.A. 28,3488.
- (23) Dienair W. y Pleyer B. (1935), Biochem. Z. 275,242.
- (24). Channon H.J. y Foster C.A. (1934) Biochem. J. 28,853.
- (25) Newald B. (1937) C.A. 11,6354-3826.

- (26) Mc Kinney R.S. Jamieson G. y Helton (1937). Oil and Soap 14,126.
- (27) Antener I. y Hölzl O. (1947) Mitt. Gebiete Lebensm Hyg 38,207.
- (28) Kuzakawa M. y Suto K. (1938) Biochem. Z. 8,212.
- (29) Taurog A. y colab. (1944) J. Biol. Chem. 155,19
- (30) Boyd E.H. (1936) J. Biol. Chem. 114,223.
- (31) Bloor W., Felkank y Allen D. (1922) J. Biol. Chem. 52,191.
- (32) Arton C. y Fishman W. (1943) J. Biol. Chem. 148,405.  
a) Arton C. Fishman y Korschod. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 60,284. (1945).
- (33) Han K.C. y Gilden E.F. (1937) J. Biol. Chem. 122,77
- (34) Fournes E. y Pieltre (1913) Bull. Soc. Chim. 11,805.
- (35) Thannhauser S.J. y Lets F. (1936) J. Biol. Chem. 106,669
- (36) Delval J.L. (1944) Bull. Soc. Chim. Biol. 26,99
- (37) Egegaard J. (1948) Acta Physiol. Scand. 16,171.
- (38) Jamieson G.S. y Mc Kinney R.S. (1935) Oil and Soap 12,70.
- (39) Sokolov A.B. (1940) Chemization Socialistic Agr. N° 10,36-8.
- (40) Eichger G. (1932) C.A. 26,4411.
- (41) Andrews J. y Bailey C. (1932) Ind. Eng. Chem. 24,80
- (42) Roth H. y Schuster I. (1940) Angew. Chem. 53,273.
- (43) Gerbach G. (1944) Fette u. Seifen 51,53.
- (44) Kirk E. y Page I. (1934) J. Biol. Chem. 106,203.
- (45) Reveridge J.M. y Johnson S. (1949) Can. J. Research 27,5,159.
- (46). Darrah J. y Mc Arthur C. (1916) C.A. 10,1199.
- (47) Haak H. H. (1947) J. Biol. Chem. 169,137.
- (48) Moruzzi G. y Tama (1908) Z. Physiol. Chem. 55,352.
- (49) Babo L. y Hirschbrunn M. (1852) Ann. Chem. Pharm. 84,10.
- (50) Claus A. y Keesé E. (1867) J. Prakt. Chem. 102,24
- (51) Hurts A. (1867) Compt. rend. 65,1015.
- (52) Bode J. (1892) Ann. Chem. Pharm. 267,268

# FOOTNOTES

- (53) Trier G. (1912) Z. Physiol. Chem. 76, 496
- (54) Best C.H. y Lucas (1943) "Vit. and Hormones".  
Best C.H. Nutrition reviews 11, 321 (1953).
- (55) Engel K. y Salmon W. (1941) J. Nutrition 24, 175.
- (56) Christensen K. (1940) J. Biol. Med. 133, Proc. IX
- (57) Sharpless G. (1940) Proc. Soc. Exptl. Med. 45, 487.
- (58) Hunt R. y Taveau H. (1906) Brit. Med. J. 2, 1788
- (59) Kauffmann H. y Verlander D. (1908) Ber. 43, 2735-43.
- (60) Levene J. e Ingevalien (1920) J. Biol. Chem. 43, 355.
- (61) Hoffmann E.A. y Hübold K. (1940) Ber 44, 1766.
- (62) Sánchez J. (1930) Semana Méd. 1, 1416.
- (63) Finocussen y Von Heyden (1931) Biochem. Z. 234, 484.
- (64) Martini A. Pub. Inst. invest. microquím. (1938), Univ.  
Litoral. 2, nº 2. 75.
- (65) Rosen S. (1930) Biochem. Z. 219, 218.
- (66) Appleton (1953) J. Biol. Chem. 205, 803.
- (67) Kapfhammer J. y Fischhoff G. (1931) C.A. 25, 127.
- (68) Jacobi H.P., Baumann G. y Heck (1941) J. Biol. Chem.  
138, 571.
- (69) Glick D. (1945) Cereal Chem. 22, 95.
- (70) Maranzi A.D. y Cardini (1943) C.R. J. Biol. Chem.  
147, 363.
- (71) Winsler y Keeserve (1945) J. Biol. Chem. 195, 395.
- (72) Revoli (1947) Arch. Farm. Bioquím. (Buenos Aires)
- (73) Fleury P. y Guitard H. (1948) Ann. Pharm. France. 252.
- (74) Trueser (1950) Biokhimiya 15, 495.
- (75) Lintzel W. y Fomin S. (1931) Biochem. Z. 238, 452.
- (76) Cotte y Kahane (1953) Bull. Soc. Chim. France 151, 7
- (77) Stetten D. (1941) J. Biol. Chem. 138, 437.
- (78) Fournieu E. y González (1921) Anales Soc. Españ. Bio-  
quím. 19, 151.
- (79) Zimmerman (1930) Z. Physiol. Chem. 188, 180.
- (80) Kaiser (1940) Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 12, 248.

- (81) Kahane y Kahane S. (1936) Bull. Soc. Chim. (5) 3, 621.  
(82) Chargaff E. (1942) J. Biol. Chem. 144, 495.  
(83) Furmster C.F. J. Biol. Chem. (1946) 165, 1  
(84) Axelrod (1953) J. Biol. Chem. 204, 903.  
(85) Sanyal K. (1948) "Proteins and aminoacids in nutrition" NY.  
(86) Nicolat y Ghian (1941) J. Biol. Chem. 139, 687.  
(87) Boyd L. y Logan (1942). J. Biol. Chem. 146, 279.  
(88) Agren (1949)  
(89) Schormüller y Walter. (1952) Z. Anal. Chem. 134, 337.  
(90) Inukai, Tsurumi y Sakai K. (1954) Proc. Imp. Acad. 20, 310  
(91) Martin, Synge y colab. (1941) Biochem. J. 35, 1358.  
(92) Perry (1949) Arch. Biochem. 24, 179.  
(93) Haftalia L. (1948) Nature 161, 763.  
(94) Awapara J. (1949) J. Biol. Chem. 178, 113.  
(95) Iercira A. y Serra J. (1951) Science 113, 387.  
(96) Thompson A.S. (1951) Nature 168, 390.  
(97) Fisher H.B. (1948) Nature 161, 764.  
(98) Block E.J. (1948) Science 106, 608.  
J. Biol. Sci. 34, 1 (1951)  
Anal. Chem. 22, 1327 (1950).  
(99) Rockland L.R. (1951) Anal. Chem. 23, 1142.  
(100) Hira, Moore y Stein (1952) J. Biol. Chem. 195, 669.  
(101) Giri y Nagabhushanam (1952) Naturwissenschaften 39, 545.  
(102) Ozaki y Moriyama (1952) J. Sci. Soil Manure, Japan  
123, 9.  
(103) Isawa y Nataka (1954) J. Sci. Soil Manure, Japan 24, 283.  
(104) Levine C. Chargaff E. y Green (1948) J. Biol. Chem.  
175, 67.  
(105) Munier A. y Kacheboef (1951) Bull. Soc. Chim. Biol.  
33, 862.  
(106) Schulte y Krause (1951) Biochem. Z. 322, 168.  
(107) Suber y Hübl O. (1953) Mitt. Lebensm. Hyg. 47, 79  
(108) Phillips (1948) Nature 161, 53.

