

## Tesis de Posgrado

# Determinación de la composición en aminoácidos de las proteínas de la "Macrocystis Pyrifera" y su variación estacional

Folgueiras, Roberto Ramón

1963

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:**

Folgueiras, Roberto Ramón. (1963). Determinación de la composición en aminoácidos de las proteínas de la "Macrocystis Pyrifera" y su variación estacional. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1294\\_Folgueiras.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1294_Folgueiras.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Folgueiras, Roberto Ramón. "Determinación de la composición en aminoácidos de las proteínas de la "Macrocystis Pyrifera" y su variación estacional". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1963.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1294\\_Folgueiras.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1294_Folgueiras.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Determinación de la composición en aminoácidos de las  
proteínas de la "Macrocystis Pyrifera" y su variación estacional

Roberto Ramón Folgueiras

1294  
R  
cf. 2

Resumen presentado para optar al  
Título de Doctor en Química

Año 1963

El presente trabajo tiene por objeto determinar la variación estacional en la composición de los aminoácidos de la "Macrocystis Pyrifera".

Se partió de muestras cosechadas en Puerto Deseado, donde fueron secadas al aire. Una vez en Buenos Aires se secaron en estufa a 35-40°C, trituraron en molino a martillos, se volvieron a secar y finalmente se molieron en un pequeño molino a bolas de porcelana.

La parte experimental consistió en:

a) DETERMINACIÓN DE NITROGENO TOTAL

Se siguió la técnica que recomiendan Tompson y Morrison para muestras vegetales consistente en kjeldhalización de la muestra y nesslerización posterior.

Se partió de 100-200 mg de alga sin tratamiento previo ; se trataron con 5-10 ml de ácido sulfúrico 3 N y se inició el calentamiento hasta aparición de humos blancos; la digestión duró 10 minutos. La muestra, una vez fría, es tratada con dos gotas de agua oxigenada al 30 % exenta de nitrógeno; si no se produce decoloración se agregan sucesivas porciones de agua oxigenada hasta obtener un líquido claro. Se neutraliza con hidróxido de sodio al 5 % y lleva a 25 ml.

Para la nesslerización es necesario realizar sucesivas diluciones hasta obtener una que permita hacer lecturas en el fotómetro espectral Carl Zeiss, modelo PMQ II utilizado. Todas ollas se obtuvieron con cubetas de 1 cm y filtro 440.

Como estas soluciones no cumplen la Ley de Beer fué entonces necesario confeccionar una curva con cantidades determinadas de sulfato diamónico, y de allí se extrapolaron los valores que se obtenían para cada lectura de las muestras problemas. Los valores numéricos están dados por el CUADRO I.

b) DETERMINACION DE NITROGENO AMINICO

Se llevó a cabo mediante la titulación iodométrica de las sales de cobre de los aminoácidos según el método de Pope y Stevens puesto a punto por Schroeder, Kay y Mills. Dichos trabajos indican que en la mayoría de los casos dos moléculas de un aminoácido reaccionan estequiométricamente con un ion cúprico para formar una sal azul de cobre.

Se realizan hidrólisis ácida y alcalina y los hidrolizados obtenidos se neutralizan usando timolftaleína como indicador.

Dichas sales azules de cobre pueden ser solubles o no; para favorecer la solubilidad de las mismas se agrega una cantidad conocida de glicina. Por lo tanto, es necesario realizar dos determinaciones: una con agregado de glicina y otra sin ella.

La cantidad de cobre en solución hallada con el método con glicina se sustrae al cobre total en solución y de esta forma sabemos la cantidad de cobre que se ha combinado estequiométricamente tanto con los aminoácidos solubles como con los insolubles.

La cistina permanece insoluble aún en presencia de glicina. Los valores numéricos están dados por el CUADRO II.

c) DETERMINACION DE AMINOACIDOS POR CROMATOGRAFIA SOBRE PAPEL

Las muestras para llevar a cabo la cromatografía también se sometieron a una hidrólisis ácida y otra alcalina seguida, en ambos casos, de un tratamiento adecuado denominado "desalting", consistente en eliminar las sales que luego interferirían en el desarrollo de los cromatogramas.

Para ello se embebe una determinada cantidad del respectivo hidrolizado en un papel de filtro y se seca en corriente de aire caliente; se eliminan las grasas con dicloroetano caliente y se realiza luego una extracción con propanona ácida durante una hora, destilándose al vacío hasta sequedad y recogiendo el residuo con isopropanol al 10 %.

Se realizó cromatografía descendente, utilizando papel Whatman N° 1 recortado según Matthias y como solvente Butanol-ácido acético-agua (40:10:50). Las manchas se dejaron correr durante 40 horas en dos períodos de 24 horas con secado intermedio y se revelaron con solución de nin-

hydrina al 0,1 %.

Una vez en poder de los cromatogramas no se determinaron Rf absolutos teniendo en cuenta las distancias recorridas por el frente del solvente y por la sustancia problema, sino Rf relativos referidos a un aminoácido que en lo sucesivo sirviera como término de comparación para todos los demás.

Para tal fin se eligió la alanina y se determinaron Ra, es decir, la relación existente entre las distancias recorridas por la sustancia problema y por la alanina.

En los casos de posibles dudas debidas a la similitud de los Ra de dos manchas distintas se recurrió a correr dichas muestras con un solvente distinto, etanol al 77 % (v/v), también por el método descendente y usando solución de ninhydrina al 0,1 % como revelador.

El respectivo cuadro da la suma de los aminoácidos provenientes tanto de hidrólisis ácida como alcalina.

DETERMINACION DE NITROGENO TOTAL  
(método de Tompson y Morrison)

	% Nitrógeno total
octubre 1953	1,75
noviembre 1953	1,87
enero 1954	1,12
febrero 1954	1,56
marzo 1954	1,50
abril 1954	1,64
mayo 1954	1,60
julio 1954	1,44
agosto 1954	1,50
hojas	1,68
planta entera	1,60
flotadores	0,85

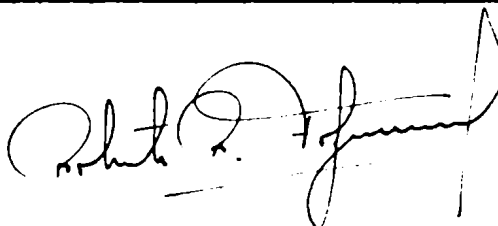
DETERMINACION DE NITROGENO AMINICO  
(método de Pope y Stevens)

	Hidr. ácida	Hidr. alcalina
octubre 1953	0,91	0,85
noviembre 1953	0,95	0,90
enero 1954	0,62	0,52
febrero 1954	0,83	0,75
marzo 1954	0,80	0,72
abril 1954	0,87	0,79
mayo 1954	0,85	0,77
julio 1954	0,80	0,70
agosto 1954	0,79	0,72
hojas	0,90	0,82
planta entera	0,86	0,77
flotadores	0,52	0,41

CUADRO II

VARIACION ESTACIONAL DE AMINOACIDOS EN "MACROCYSTIS PYRIFERA"

	octubre 1953	noviembre 1953	febrero 1954	marzo 1954	abril 1954	mayo 1954	julio 1954	agosto 1954	hojas	planta entera	flotadores
Acido glutámico	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+
$\beta$ -Alanina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
l-Arginina	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
l-Cistina	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
Glicina	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
dl-Histidina	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
dl-Isolucina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
l-Leucina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
l-Lisina	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
Motionina	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
dl-Serina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
l-Tirosina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
l-Treonina	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
dl-Triptofano	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
dl-Valina	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+



CUADRO III



V

**Determinación de la composición en aminoácidos de las  
proteínas de la "macrocytis pyrifera" y su variación estacional.**

**Roberto Ramón Folgueiras**

**Determinación de Nitrógeno total  
(método micro Kjeldhal)**

	PESO mg	H <sub>2</sub> O 0,1N ml	% NITRÓGENO		PESO mg	H <sub>2</sub> O 0,1 N ml	% NITRÓGENO
noviembre 1953	200	2,21	1,88		200	2,22	1,89
enero 1954	200	1,32	1,12		200	1,29	1,10
abril 1954	200	1,94	1,65		200	1,98	1,68
agosto 1954	200	1,75	1,49		200	1,76	1,50

**Determinación de Nitrógeno total  
(método de Tompson-Harrison)**

	PESO GR	NITRÓGENO % CLIVRE 1/40	INDICACION	% NITRÓGENO	PESO GR	NITRÓGENO % CLIVRE 1/40	INDICACION	% NITRÓGENO
octubre 1953	100	0,388	1:25	1,75	100	0,392	1:25	1,76
noviembre 1953	100	0,440	1:25	1,87	100	0,440	1:25	1,87
enero 1954	100	0,250	1:25	1,125	100	0,255	1:25	1,12
febrero 1954	100	0,335	1:25	1,55	100	0,340	1:25	1,57
marzo 1954	100	0,325	1:25	1,50	100	0,330	1:25	1,51
abril 1954	100	0,360	1:25	1,64	100	0,360	1:25	1,64
mayo 1954	100	0,352	1:25	1,595	100	0,355	1:25	1,61
junio 1954	100	0,314	1:25	1,436	100	0,316	1:25	1,45
agosto 1954	100	0,162	1:50	1,49	100	0,164	1:50	1,50
hojas	100	0,190	1:50	1,69	100	0,187	1:50	1,67
planta entera	100	0,352	1:25	1,595	100	0,355	1:25	1,61
florescencias	100	0,194	1:25	0,858	100	0,190	1:25	0,845

**Determinación de Nitrógeno amínico  
(método de Pope y Stevens)**

<u>hidrólisis alcalina</u>	PESO g	59 Mg, 0,005 N 1 ml 10% incog. + 10% glicina	59 Mg, 0,005 N 1 ml 100% glicina	% Nitrogeno amínico	PESO g	59 Mg, 0,005 N 1 ml 10% incog. + 50% glicina	59 Mg, 0,005 N 1 ml 100% glicina	% Nitrogeno amínico
octubre 1953	1	12,32	13,80	0,84	1	12,50	13,80	0,865
noviembre 1953	1	12,77	13,80	0,905	1	12,75	13,80	0,90
enero 1954	1	10,24	13,80	0,515	1	10,32	13,80	0,53
febrero 1954	1	11,77	13,82	0,75	1	11,80	13,82	0,755
marzo 1954	1	11,53	13,82	0,715	1	11,61	13,82	0,725
abril 1954	1	12,03	13,82	0,79	1	12,08	13,82	0,795
mayo 1954	1	11,91	13,82	0,77	1	11,85	13,82	0,76
julio 1954	1	11,45	13,82	0,70	1	11,45	13,82	0,70
agosto 1954	1	11,61	13,82	0,725	1	11,58	13,82	0,72
hojas	1	12,31	13,82	0,83	1	12,18	13,82	0,81
planta entera	1	11,85	13,82	0,76	1	11,92	13,82	0,775
fletadores	1	9,57	13,82	0,41	1	9,61	13,82	0,415

hidrólisis  
ácida

octubre 1953	1	12,78	13,82	0,905	1	12,81	13,82	0,91
noviembre 1953	1	13,03	13,82	0,94	1	13,13	13,82	0,96
enero 1954	1	10,91	13,82	0,615	1	10,93	13,82	0,62
febrero 1954	1	12,31	13,82	0,83	1	12,33	13,82	0,84
marzo 1954	1	12,10	13,82	0,80	1	12,18	13,82	0,81
abril 1954	1	12,51	13,82	0,865	1	12,56	13,82	0,875
mayo 1954	1	12,42	13,82	0,85	1	12,33	13,82	0,84
julio 1954	1	12,10	13,82	0,80	1	12,08	13,82	0,795
agosto 1954	1	12,03	13,82	0,79	1	12,03	13,82	0,79
hojas	1	12,78	13,82	0,905	1	12,76	13,82	0,90
planta entera	1	12,51	13,82	0,865	1	12,42	13,82	0,85
fletadores	1	10,25	13,82	0,515	1	10,33	13,82	0,53

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Determinación de la composición en aminoácidos de las  
proteínas de la "Macrocystis Pyrifera" y su variación estacional

Roberto Ramón Folgueras

1294  
ef.2

Tesis presentada para optar al  
Título de Doctor en Química

Año 1963

a mi PADRE

en memoria de mi querida MADRE

Quiero expresar mi agradecimiento al padrino de la tesis, Dr. Adolfo Montes, al Dr. Andrés D. Fortunato por haberla guiado con sus consejos, fruto de la gran experiencia que posee en el tema y, en general, al personal de la cátedra de Bromatología y Análisis Industrial por la colaboración prestada para la realización del presente trabajo.

En la gran mayoría de los trabajos realizados sobre algas no se ha tenido en cuenta la variación estacional de composición de las mismas. Es por ello, y como un aporte más a la literatura, que se tratará de determinar en el presente trabajo la composición cualitativa en aminoácidos de la *Macrocystis Pyrifera* y su variación estacional.

Es ésta un alga gigante del orden de las Laminariales, llega a tener 100 metros de longitud, que crece en nuestro país en el vasto litoral patagónico, desde la Provincia del Chubut hasta Tierra del Fuego, es decir donde la temperatura del agua no sobrepasa los 20°C.

Desde el punto de vista de la clasificación botánica las algas pertenecen al grupo de las Talófitas, dentro de las cuales forman la sección Algae que a su vez comprenden varias clases, órdenes y familias (1).

La *Macrocystis Pyrifera* se arraiga en rocas del litoral por medio de prolongaciones del "talo", denominación que se le da al vegetal completo, en forma rizoidal.

Morfológicamente el "talo" de las algas superiores se divide en:

- a) órgano de flotación o bulbo (especie de raíz adherida a la roca);
- b) estipa o varilla (especie de tallo);
- c) lámina o fronda, que constituye el órgano de reproducción, absorción, elaboración y acumulación de sustancias nutritivas.

En algunas especies se encuentran además los flotadores, órganos en forma de sacos que se hallan implantados en la base de la fronda, constituidos por una pared membranosa en cuyo interior se encuentran gases, lo cual hace que se mantengan flotando cerca de la superficie del agua.

La composición química de las distintas partes del talo es cuantita-



tivamente diferente y también difieren las características de algunos de los componentes comunes a ellos. Ver el cuadro II para el caso del nitrógeno amínico en hojas, flotadores y planta entera.

Los valores que se incluyen a continuación fueron determinados en los Laboratorios del Departamento Químico del INTI y corresponden a *Macrocystis Pyrifera*:

cenizas	36,8 %
manitol	3,0
ácido algínico	21,0
proteínas	7,5
fibra cruda	7,2
potasio	11,7
sodio	4,2
cloruros	13,7
azufre	1,0
fósforo	0,3
calcio	1,1
magnesio	0,8

En cuanto a la clasificación sistemática teniendo en cuenta su pigmentación se las divide en: azules o cyanofyceae, verdes o chlorofyceae, rojas o rhodofyceae y pardas o phacofyceae (2).

Las algas pardas son por su desarrollo, abundancia y distribución las más importantes y las que encuentran mayor utilización en la economía del hombre.

Las algas están distribuidas a lo largo de las costas de los continentes. El desarrollo de las diferentes especies está condicionado a diversos factores entre los cuales podemos mencionar la temperatura mínima media de las aguas superficiales, las corrientes marinas, el grado de salinidad del agua, la existencia de materiales nutrientes específicos para determinada especie, y en menor grado las condiciones climáticas y geográficas de la zona.

De lo cual se concluye que, en términos generales, las posibilidades de desarrollo son similares a las de los vegetales terrestres. Por lo tanto, la utilización de las algas marinas está en relación directa con las características geográficas de cada zona y con la posibilidad de cosecha.

### LAS ALGAS EN LA ALIMENTACION

Desde el punto de vista alimenticio las algas utilizándose directamente en la alimentación humana o en la de los animales terrestres, así como también para abonar la tierra.

Constituyen el recurso biológico del mar de mayores perspectivas dada la gran variedad de usos a que pueden destinarse. Hay unas 2.500 especies de algas sedentarias que bordean la costa de los continentes, las cuales tienen unas 400 aplicaciones directas o indirectas en la economía del hombre.

Si bien en la alimentación del hombre se utilizan las algas desde tiempos muy remotos, este consumo ha sido siempre reducido. El Japón y otras islas del Pacífico tienen las cifras de consumo más elevadas, pero ello es debido principalmente a la elevada densidad de población y a la escasez de otros productos nutritivos.

En cuanto a la explotación, Japón marcha también a la cabeza, ya que según datos estadísticos de la F.A.O. la producción bruta media en el período comprendido entre 1930 y 1943 fué de 408.570 toneladas correspondientes, en especial, a algas pardas y rojas. Se explotan intensamente las algas y utilizan en la alimentación en las costas de China, Filipinas, Indochina, Hawaii, etc.

Se consumen al estado fresco, desecadas o como extractos preparados con diversos condimentos, o bien como productos obtenidos por fermentación.

En Europa el consumo de algas como tal alcanza expresiones muy reducidas, salvo en Noruega, donde la harina de algas pardas mezclada con harina de cereales se utiliza en la fabricación del pan; y en las costas de Escocia, Irlanda, Francia e Islandia donde se consumen diversas especies en sopas, ensaladas, como legumbres o condimentos.

En el hemisferio Sud el consumo es también reducido, teniendo importancia local en la alimentación de las poblaciones costeras de Nueva Zelandia, Australia y Chile. En este último país la Durvillea, alga que contiene cerca de 40 % en alginatos, se vende con el nombre de "cochayuyo".

El contenido en proteínas y aminoácidos de las algas ha sido investigado. Así, Smith y Young (3) determinaron cuantitativamente la distribución de aminoácidos combinados en plantas enteras de cinco especies distintas de algas marinas por cromatografía, luego de extracción con etanol al 75 %.

Coulson (4) estudió también las proteínas extraídas de algas marrones, verdes y rojas, especialmente del "rhodymenia palmata" (5), en la cual determinó los aminoácidos por cromatografía bidimensional.

En Japón, Mitsuzo Takagi determinó los puntos isoelectrónicos de las proteínas encontradas en la "ulva pertusa" (6) y, además, las cantidades de tirosina, triptófano, treonina y serina (7) existentes en diversas especies de algas marrones, verdes y rojas, encontrando mayor proporción de dichos aminoácidos en las algas marrones.

La arginina y su extracción como sal de sodio fué estudiada por K. Tabei (8).

Los iodoaminoácidos de las algas marinas determinados usando  $I^{131}$  fué motivo de un estudio realizado por Scott (9).

En cuanto al uso de las algas en la alimentación de animales podemos citar que en las islas Orkney o Iceland las ovejas se alimentan exclusivamente de algas marinas la mayor parte del año. En algunos países se está difundiendo el uso de harina de algas mezclada con harina de pescados y cereales para la alimentación de animales domésticos.

También se han realizado experiencias con cerdos, vacas, gatos y ovejas incorporando a la dieta de estos animales algas pardas durante meses, sin que se produjeran alteraciones en la salud ni en la producción de lana o leche. Experiencias posteriores revelaron que deben utilizarse algas con contenido moderado de iodo, materias minerales y fibra cruda.

La incorporación de aminoácidos esenciales por medio de algas al alimento de granjas fué tratado por Lyman y otros (10).

También se realizaron experiencias en ratas que demostraron un mayor crecimiento debido a la lisina y treonina incorporada a su dieta por medio de algas. Así Houdley, Ing y Krauss (11) encontraron que la "chlorocella pyrenoidosa" es una fuente más rica en treonina y lisina que la proteína de

soya purificada, e iguala en contenido con la cascina, locho en polvo, huevo o hígado desocado.

En nuestro país se ha efectuado recientemente una experiencia destinada a estudiar las posibilidades de emplear algas como suplemento en la alimentación del ganado ovino. Fué realizada en el Instituto de Biología Animal dependiente del INTA (12) y utilizan la *Macrocystis Pyrifera* (vulgarmente "cachiyuyo") para alimentar en forma experimental borregos Corriedale. Los alimentos a los que se incorporó *Macrocystis Pyrifera* en proporción no mayor de 1/3, fueron consumidos sin mayor dificultad; no provocaron anormalidades digestivas ni alteraciones en los procesos de reproducción y las lanas conservaron su longitud de mecha, uniformidad de finura, ondulaciones, resistencia y flexibilidad.

En cuanto a la capacidad fertilizante de las algas está dada por el contenido de nitrógeno, potasio y fósforo.

Durante las dos guerras mundiales, y como consecuencia de la escasez de fertilizantes potásicos, se desarrolló en la costa de California (EEUU) una interesante industria de abonos utilizando las algas pardas gigantes del Pacífico, especialmente *Macrocystis Pyrifera*.

Otro uso interesante de las algas es la obtención de ácido algínico, un ficocoloide que parece existir exclusivamente en las algas pardas. En sucesivas publicaciones varios autores demostraron que se trata de un polímero del ácido manurónico (13) (14).

Gracias a su estado coloidal los alginatos solubles (de metales alcalinos y de magnesio) actúan como emulsificantes, estabilizantes, coloideos protectores y humectantes.

En la industria de la alimentación se han encontrado numerosas aplicaciones a los alginatos, como por ejemplo: formación de películas protectoras para la conservación de frutas, verduras, carnes y fiambres (sustitutos de tripas para embutidos); aglomerante de carne picada o carne sintética a partir de proteínas vegetales; estabilizante de productos lácteos; coloide protector en la fabricación de helados; preparación de hilos para hilar y comprimir fiambres y embutidos; etc. A esto respecto existen numerosas patentes de diversos países.

## PARTE EXPERIMENTAL Y DISCUSION

La parte experimental consistió en trabajar sobre muestras de *Macrocystis Pyrifera* recogidas en Puerto Desoado a fin de poder determinar las variaciones de sus aminoácidos en las distintas épocas del año.

El estudio de los aminoácidos en algas marinas presenta numerosas dificultades técnicas debido a la gran cantidad de hidratos de carbono y sales minerales y a la pequeña proporción de nitrógeno que contienen.

Se utilizaron las algas que previamente fueron secadas al aire en el lugar de cosecha y enviadas a Buenos Aires. Aquí se secaron en estufa a baja temperatura (35-40°C); trituraron en un molino a martillos, se socaron nuevamente a 35-40°C en estufa y molieron en un pequeño molino a bolas de porcelana.

El trabajo se dividió en tres partes:

1) Determinación de nitrógeno total por Kjoldhalización y nesslerización posterior de acuerdo a la técnica de Tompson y Morrison (15). Las variables más importantes a tener en cuenta son: la preparación y el mantenimiento del reactivo de Nessler, basado en la modificación de Koch y Mc Meekin sobre el reactivo de Folin Nessler (16) (17) (18); las condiciones durante la digestión de la muestra (16) (19) (20); la temperatura de la muestra durante la digestión (19) (20); y la alcalinidad de la muestra antes y después de la nesslerización (16) (17) (18) (21).

2) Determinación de nitrógeno amínico empleando la técnica de Schroeder Kay y Lills (22) basada en los primitivos trabajos de Popo y Stevens (23). Estos utilizaban cloruro cúprico 0,16 molar, fosfato trisódico, solución buffer de bórax, suspensión de fosfato cúprico, timolftaloína, tiosulfato de sodio, solución standard de iodato de potasio y almidón como indicador. Es importante aquí el tiempo que media entre la mezcla de reactivos y la centrifugación del fosfato cúprico; se ensayó de 1 a 30 minutos encontrándose que el tiempo óptimo era 5 minutos. Cada una de las muestras fué so-

metida a hidrólisis ácida y alcalina para luego realizar la determinación de nitrógeno amínico.

3) Investigación de los aminoácidos constituyentes por cromatografía sobre papel. Las muestras para llevar a cabo la cromatografía también se sometieron a la hidrólisis ácida y alcalina seguida de un tratamiento adecuado, denominado "desalting" (24), que consiste en eliminar las sales que luego interferirían en el desarrollo de los cromatogramas.

Primeramente se realizaron desarrollos ascendentes usando como solvente butanol-ácido acético-agua (40:10:50) y ninhydrina como revelador, pero no se conseguía una neta separación de los aminoácidos. Luego se ensayó la cromatografía bidimensional utilizando como solvente I butanol-ácido acético-agua (40:10:50) y como solvente II fenol-amoníaco-agua preparado de acuerdo a Underwood y Rocklans (25). Los papeles se desarrollaron hasta 2 cm del borde y se secaron a temperatura ambiente durante más de 24 horas, hecho sumamente importante (26) ya que en caso contrario el fondo se colorea al tratarlos con ninhydrina. De esta manera se elimina también el amoníaco, que puede conducir a graves errores pues tanto los hidratos de carbono como el ácido ascórbico producen con la ninhydrina en presencia de amoníaco manchas similares a las de los aminoácidos (27). De cualquier manera este método tampoco dió resultados satisfactorios.

Se encontró entonces que la cromatografía descendente utilizando papel recortado según Matthias (28) daba cromatogramas satisfactorios, ya que la mayoría de los aminoácidos se separaban bien. El solvente empleado era butanol-ácido acético-agua (40:10:50). Las manchas encontradas se revelaron con una solución de ninhydrina al 0,1 % preparada de acuerdo al método N° 3 de Block, Durrum y Zweig (29). En los casos de posibles dudas debidas a la similitud de  $R_f$  de dos manchas distintas se recurrió a correr dichas muestras con un solvente distinto, etanol al 77 % (v/v), preparado de acuerdo al ítem 40 de Block (30). Se usó también como revelador la solución de ninhydrina.

### DETERMINACION DE NITROGENO TOTAL

Para la determinación de nitrógeno total se sigue la técnica que recomiendan Tompson y Morrison (15) para muestras vegetales.

Se parte de 100 ó 200 mg de alga seca sin tratamiento alguno que se colocan en un pequeño balón Kjeldhal; se agrega 5 ó 10 ml (según la cantidad de alga pesada) de ácido sulfúrico 3 N y se inicia el calentamiento colocando el balón de tal forma que resulte un ángulo de 45° con la llama viva. Cuando el volumen se reduce a unos 2 ml aparecen humos blancos y es entonces cuando comienza la digestión de la muestra; durante la misma la llama se reduce de tal modo que los vapores sulfúricos se condensan en el bulbo del Kjeldhal. El tiempo de digestión es de 10 minutos.

Se deja enfriar a temperatura ambiente y se agrega 2 gotas de agua oxigenada al 30 % exenta de nitrógeno; se calienta nuevamente hasta que cesa el desprendimiento de oxígeno (1-2 minutos) y se vuelve a agregar agua oxigenada, siempre en porciones de 2 gotas por vez; se calienta otra vez y así, alternativamente, hasta que el líquido se vuelve completamente claro. El total de adiciones varía entre 10 y 24 gotas de acuerdo a la muestra. Una vez que la muestra ha sido transformada en una solución clara y está fría, se diluye con agua (6-7 ml) y se neutraliza con hidróxido de sodio al 5 %. Esta solución ligeramente alcalina se lleva a volumen en matraz aforado de 25 ml con agua destilada.

El método original indicaba que se deben tomar 20 de esa solución para la nesslerización, pero en la práctica se encontró que resultaban soluciones muy concentradas para trabajar con el espectrofotómetro, ya que al agregar el reactivo de Nessler se producía turbidez.

Para poder hacer lecturas adecuadas debieron hacerse diluciones a partir de la solución neutralizada (25 ml), que variaron según los casos y luego, de allí, se tomaron los 20 ml necesarios para la nesslerización.

### NESSLERIZACION

Los 20 ml de la solución se colocan en un tubo testigo de 50 ml y se mantienen a 20°C. Se hace burbujear aire, lentamente, a través del líquido; por las paredes del tubo se deja correr 1 ml del reactivo de

Nessler preparado de acuerdo a (15) seguido de 5 ml de hidróxido de sodio al 5 %; se hace correr nuevamente aire a través del seno del líquido durante 30 segundos. No es necesario que la solución nesslerizada se mantenga a 20°C luego del agregado del hidróxido de sodio.

El color se determinó exactamente 20 minutos después del agregado de álcali, midiendo extinciones por medio de un fotómetro espectral Carl Zeiss, modelo PMQ II.

En todas las determinaciones se utilizó cubota de 1 cm y filtro 440. Los blancos y los standards se hacen en similares condiciones.

Como estas soluciones no cumplen la Ley de Beer fué entonces necesario confeccionar una curva con cantidades determinadas de sulfato diamónico, y de allí se extrapolaron los valores que se obtenían para cada lectura de las muestras problemas.

Usando esta técnica no se han notado para la *Macrocyctis Pyrifera* las dificultades que tuvieron Channing y Young (31) (32) en la determinación de nitrógeno de las algas.

Para confirmar la exactitud de los resultados obtenidos se realizaron determinaciones de nitrógeno total por el método micro Kjeldhal según A.O.A.C. en su sexta edición del año 1945, página 763, siendo los valores numéricos los siguientes:

noviembre 1953:	1,88 %
enero 1954:	1,11
abril 1954:	1,66
agosto 1954:	1,50

Nótese la equivalencia con los respectivos valores insertos en el cuadro I.

#### DETERMINACION DE NITROGENO AMINICO

Se llevó a cabo mediante la titulación iodométrica de las sales de cobre de los aminácidos según el método de Pope y Stevens (23) puesto a punto por Schroeder, Kay y Mills (22). Dichos trabajos indican que en la mayoría de los casos dos moléculas de un aminoácido reaccionan estequiométricamente con un ion cúproco para formar una sal azul de cobre.



Se realizan hidrólisis ácida y alcalina partiendo en ambos casos de 1 gramo de alga seca y molida.

La hidrólisis se lleva a cabo en un ampolla evacuada de aire y cerrada a la llama y se trata, según el caso, con 10 ml de ácido clorhídrico 6 normal ó 10 ml de hidróxido de bario al 14 % (33).

La ampolla se corró y se hizo la hidrólisis en estufa a 110°C durante 24 horas. Cumplido el período se dejan enfriar a temperatura ambiente y luego se sumergen en baño de hielo y sal para evitar que estallen al romperlas.

El contenido se filtra resultando de color amarillo pajizo las alcalinas y de color caramelo las ácidas; luego se neutralizan usandó timolftaleína como indicador ó hidróxido de sodio al 30 % ó ácido clorhídrico 6 normal según el caso.

Tanto los hidrolizados ácidos como los alcalinos, una vez neutralizados, se contrifugan; el residuo se lava dos veces con agua destilada caliente. El líquido sobrenadante más el proveniente de los lavados se lleva a volumen (25 ml).

A esta altura del procedimiento es necesario tomar en consideración los posibles aminoácidos presentes.

Si existieran solamente aminoácidos capaces de dar una sal soluble de cobre tomaríamos 5 ml de la suspensión de fosfato cúprico lavado y 5 ml de la solución problema, pipetoándolos en un tubo de centrífuga de 15 ml, siguiendo la técnica que se detalla más adelante.

Pero como es lógico sospechar la presencia de aminoácidos que formen una sal de cobre insoluble o parcialmente soluble, como ocurre con la leucina, metionina, fenilalanina y triptofano, será necesario entonces modificar el procedimiento para obtener dicha sal soluble de cobre, agregando a la solución problema una cantidad conocida de glicina.

La presencia de glicina produce una sal soluble, aparentemente a través de la formación de una sal doble.

Por lo tanto, a una porción de la muestra problema se aplica el método descrito para sales solubles de cobre y a otra porción, la modificación propuesta por agregado de glicina siguiendo la técnica siguiente:

a una parte alícuota (2,5 ml) de la solución preparada se agrega 2,5 ml de glicina 0,04 molar y 5 ml de una suspensión de fosfato cúprico lavado preparado según Schroeder, Lay y Mills (22) y colocan en un tubo de centrífuga de 15 ml; la mezcla se deja estar 5 minutos, agitando ocasionalmente; se tapa el tubo y el exceso de fosfato cúprico se elimina centrifugando durante 5 minutos. Del líquido sobrenadante se pipetea 7 ml en una solución de 5 gramos de ioduro de potasio en 32 ml de solución de ácido acético preparada según (22), a la cual se le titularon con tiosulfato de sodio los vestigios de iodo que pudiera contener, y el iodo resultante se titula con tiosulfato de sodio 0,005 normal preparado y standardizado según (22) usando almidón como indicador.

La cantidad de cobre en solución hallada en el segundo método (agregado de glicina) se sustrae al cobre total en solución y de esta forma sabemos la cantidad de cobre que se ha combinado estequiométricamente tanto con los aminoácidos solubles como con los insolubles.

Es necesario aclarar que la cistina permanece insoluble aún con el agregado de glicina.

Los valores numéricos correspondientes a la hidrólisis ácida y a la alcalina están dados por el cuadro II.

#### DETERMINACION DE AMINOACIDOS POR CROMATOGRAFIA SOBRE PAPEL

Se utilizan muestras de algas tal cual, sin tratamiento previo, secas y molidas a las que se las somete a una hidrólisis ácida y otra alcalina tal como lo recomienda Cramer (33) y fué elaborado por Zahn (34).

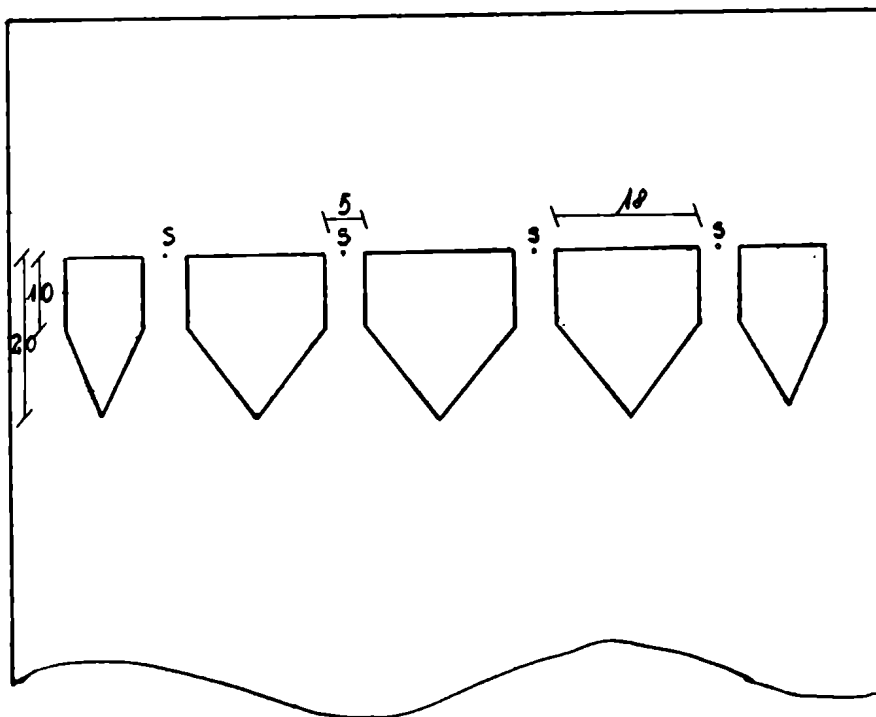
Las hidrólisis se llevaron a cabo en una ampolla evacuada de aire y cerrada a la llama y se usó 1 gramo de alga y 10 ml de ácido clorhídrico 6 normal ó 10 ml de hidróxido de bario al 14 % para las ácidas y alcalinas, respectivamente. La temperatura de hidrólisis fué 110°C y el tiempo 24 horas, al cabo del cual se deja enfriar primero, a temperatura ambiente, y luego se sumergen en un baño de hielo y sal para evitar que estallen al abrirlas. Se filtran y llevan a volumen en matraz aforado de 25 ml.

Una vez obtenidos estos hidrolizados fué necesario encontrar un método que permitiera eliminar las sales que interferirían en la cromatografía sobre papel.

Se adoptó, por dar resultados muy satisfactorios, el método de "desalting" que recomienda Block (24) ampliado por el trabajo de Lissitsky (35) consistente en tomar una determinada cantidad ( 5 ml o más, de acuerdo a la concentración) de la solución resultante de la hidrólisis, ponerlos en un papel de filtro y secarlos en corriente de aire caliente.

Una vez seco el papel se corta en pequeños trozos y se desengrasa con dicloroetano caliente; esta extracción es necesario hacerla, por lo menos, tres veces. Después que los papeles están secos se realiza una extracción con propanona ácida (1 % de ácido clorhídrico concentrado) durante una hora, en la proporción de 20 ml de propanona ácida por cada mililitro de muestra problema. Luego de ese tiempo la solución se filtra y destila en vacío hasta sequedad. El residuo se toma entonces con 1 ml de isopropanol al 10 %. De esta forma se obtiene las muestras para someterlas a la cromatografía sobre papel.

El papel utilizado en la cromatografía fué el Whatman N° 1 y se cortaron tiras de 11x46 cm adoptándose la siguiente configuración (28):



Las manchas se aplicaron con micropipetas en los puntos señalados con "s" teniendo en cuenta las siguientes precauciones: durante las aplicaciones el papel Whatman se coloca sobre un vidrio perfectamente limpio, ya que cualquier líquido que tuviera en su superficie sería absorbido inmediatamente por el papel; es necesario que la mancha tenga el menor diámetro posible, y para ello la gota se secará inmediatamente de ser colocada, ya sea por medio de una lámpara de rayos infrarrojos o por una corriente de aire caliente. (36).

El solvente utilizado fué butanol-ácido acético-agua (40:10:50), mezcla que debió ser renovada frecuentemente por sufrir esterificación en pocas semanas (37).

Es necesario tener en cuenta las variaciones de los Rf debidas a los cambios en el volumen del solvente y de la cámara. Se ha encontrado así, que de la medida de la cámara depende el volumen crítico del solvente. Por encima del volumen crítico del solvente los valores de los Rf están al mínimo, aunque el volumen del solvente esté aumentado; mientras que por debajo del volumen crítico del solvente los valores de los Rf están al máximo.

En general se recomienda permanecer por encima del volumen crítico del solvente para tener valores constantes de Rf; pues por debajo del máximo volumen crítico ocurre una vaporización; el solvente se enriquece en agua y de aquí que los valores del Rf de los aminoácidos solubles en agua tiendan a aumentar (38).

Otro factor a tener en cuenta por su influencia sobre los valores de Rf es la temperatura a la cual se efectuó la corrida (38).

También es importantísimo conseguir la saturación de la cámara antes del corrimiento; se obtuvo ello colocando 250 ml del solvente en la parte inferior de la cámara y 70-80 ml en la vasija superior. El volumen de la cámara era de 14 dm<sup>3</sup>.

Para realizar el trabajo de cromatografía fué necesario preparar soluciones patrones, de concentración conocida, de aminoácidos puros para, de esta forma, obtener Rf comparables.

Los aminoácidos ensayados fueron: ácido glutámico;  $\beta$ -alanina; l-arginina; l-cistina; glicina; dl-histidina; dl-isoleucina; l-leucina;

l-lisina; metionina; dl-oxiprolina; l-prolina; dl-serina; l-tirosina; l-treonina; dl-triptofano y dl-valina.

Dichas soluciones, todas de concentración  $10^{-4}$ M (salvo el ácido glutámico:  $5 \cdot 10^{-4}$ M), se prepararon según la técnica de Block (39) que aconseja favorecer la solubilización del aminoácido por agregado de ácido clorhídrico 6 N, gota a gota, hasta total solubilización; se agrega luego 10 ml de alcohol isopropílico y se lleva a 100 ml.

A partir de estas soluciones de aminoácidos puros se hacen cromatogramas descendentes colocando dos gotas por cada uno de ellos (atención: dejar secar bien entre gota y gota); se deja correr durante 24 horas.

Aquí se observó que los mejores resultados se obtenían secando el papel al cabo de ese tiempo y corriendo nuevamente por otras 24 horas. Ahora sí, se secan los papeles en corriente de aire caliente y se pulverizan con solución de ninhydrina preparada según Block (29).

De esta forma se consigue revelar todos los aminoácidos con excepción de prolina y oxiprolina, para los que se adopta la siguiente técnica (40). Se colocan las manchas como de costumbre y se desarrollan a la par en el solvento butanol-ácido acético-agua durante 48 horas. Se secan en corriente de aire caliente y no se adopta el revolado múltiple, sino que se cortan las tiras y se revelan por separado del siguiente modo: revelado de prolina: se pulveriza el cromatograma con una solución de isatina al 0,2 % en acetona; se seca al aire y coloca durante 10 minutos en estufa a  $70-76^{\circ}\text{C}$  saturada con vapor de agua; en presencia de prolina aparece mancha verde.

revelado de oxiprolina: el mismo cromatograma en que se ha denotado la presencia de prolina se pulveriza con una solución recientemente preparada de 1 gramo de p-dimetilaminobenzaldehído, 90 ml de acetona y 10 ml de ácido clorhídrico concentrado. El papel se seca al aire durante 30 minutos y aparecerá mancha color verde.

Una vez en poder de estos cromatogramas no se determinaron  $R_f$  absolutos teniendo en cuenta la distancia recorrida por el frente del solvente y la recorrida por la solución problema, sino  $R_f$  relativos referidos a un aminoácido que en lo sucesivo sirviera como término de comparación para todos los demás.

Se eligió para tal fin la alanina por tener un Rf conveniente y se determinaron los Ra (Rf referidos a la alanina), es decir, la relación que existe entre las distancias recorridas por la sustancia problema y la alanina. De esta forma se eliminan las variables velocidad y tiempo de corrimiento, ya que permanecen constantes para cada cromatograma.

Para comprobar la autenticidad del método se hicieron mezclas diversas de aminoácidos y se cromatografiaron, pudiéndose identificar perfectamente cada uno de ellos.

Se trabajó luego, y siempre on base al mismo método, con las muestras problemas.

En cada hoja de papel se colocó las dos gotas de alanina y tantas gotas de sustancia problema como concentración tuviese (en general de 8 a 10 gotas) teniendo siempre la precaución de dejar secar entre gota y gota.

Un detalle a tener en cuenta es el de colocar los cromatogramas a correr inmediatamente de ser aplicadas las manchas, ya que en caso contrario, por ejemplo demora de 12 horas, se producirá una posible evaporación del isopropanol y las manchas obtenidas después del revelado aparecen de tonos muy débiles.

Al utilizarse la solución de ninhidrina debe tenerse la precaución de que sea recién preparada, ya que pasado más de seis días suministra manchas de color no muy intenso, disminuyendo el mismo al aumentar el envejecimiento de la solución.

Los resultados obtenidos por este procedimiento fueron satisfactorios (ver fotografías 1 y 2), salvo en los casos en que los Ra eran muy similares, ver CUADRO III, como por ejemplo en los casos de valina y metionina, histidina y arginina, ácido glutámico y treonina, glicina y serina, y presentaban dudas.

Fue necesario entonces ensayar otro solvente, usándose etanol al 77 % (30) permitiéndonos, de esta manera, eliminar nuestras dudas ya que los aminoácidos cuestionados presentan Ra perfectamente diferenciables (ver CUADRO III y fotografías 3 y 4).

Para el etanol al 77 % se siguió exactamente el método utilizado

para butanol-ácido acético-agua, pero se encontró que el tiempo de corrimiento óptimo era de 18 horas, pues tiempos mayores provocaban manchas difusas y los resultados no eran reproducibles. Como revelador se usó también la solución de ninhydrina preparada según Block (29).

Las fotografías 5 y 6 representan corrimientos usando etanol al 77 % como solvente.

En el CUADRO IV se resumen los aminoácidos que han podido ser identificados tanto en la hidrólisis ácida como en la alcalina. Es muy importante tener en cuenta esto, ya que algunos de ellos son destruidos en el proceso de hidrólisis ácida y otros en el alcalino y, por lo tanto, no aparecen en el revelado del cromatograma.

DETERMINACION DE NITROGENO TOTAL  
(método de Tompson y Morrison)

	% Nitrógeno total
octubre 1953	1,75
noviembre 1953	1,87
enero 1954	1,12
febrero 1954	1,56
marzo 1954	1,50
abril 1954	1,64
mayo 1954	1,60
julio 1954	1,44
agosto 1954	1,50
hojas	1,68
planta entera	1,60
flotadores	0,85



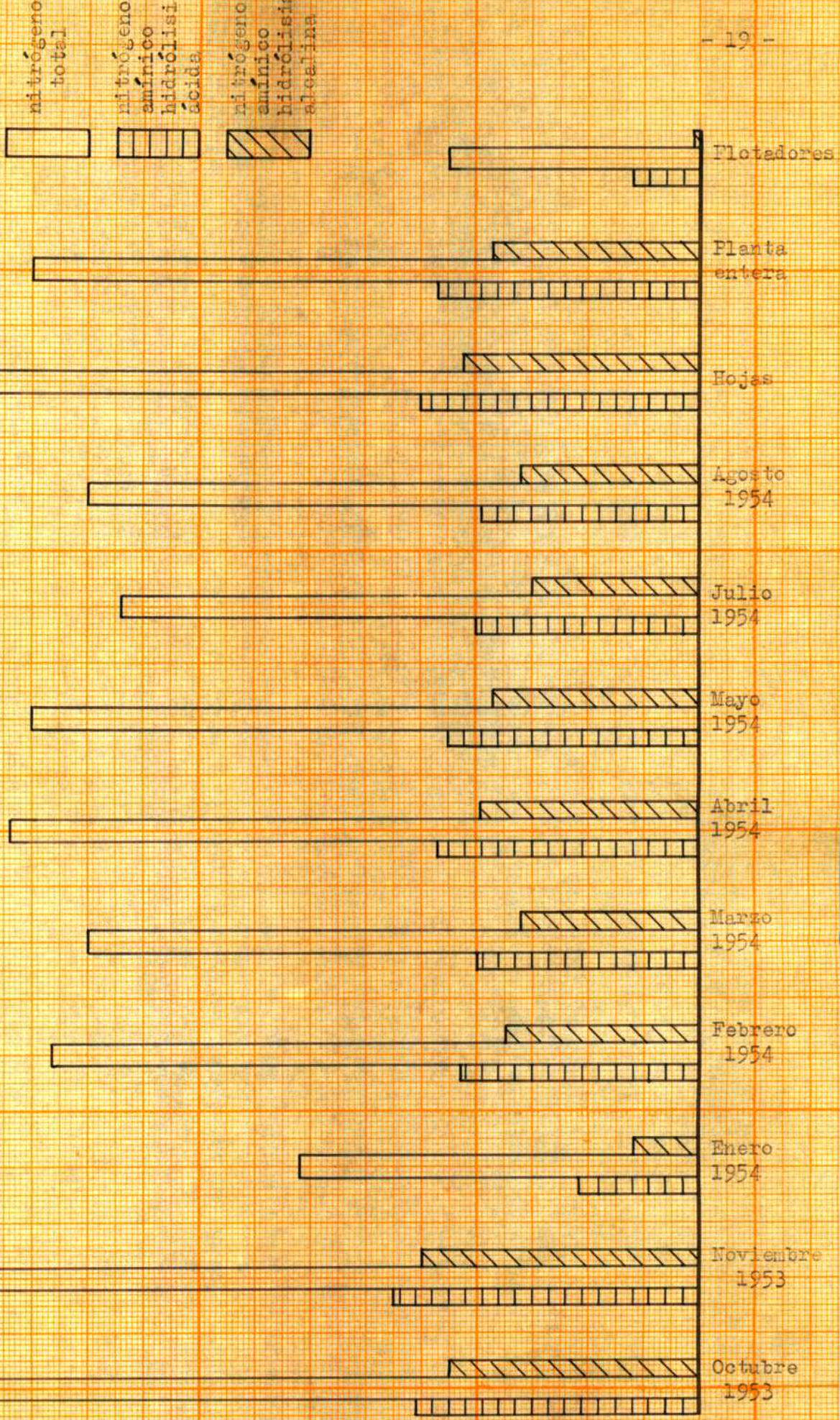
DETERMINACION DE NITROGENO AMINICO  
(método de Pope y Stevens)

	Hidr. ácida	Hidr. alcalina
octubre 1953	0,91	0,85
noviembre 1953	0,95	0,90
enero 1954	0,62	0,52
febrero 1954	0,83	0,75
marzo 1954	0,80	0,72
abril 1954	0,87	0,79
mayo 1954	0,85	0,77
julio 1954	0,80	0,70
agosto 1954	0,79	0,72
hojas	0,90	0,82
planta entera	0,86	0,77
flotadores	0,52	0,41

CUADRO II



COMPARACION DEL NITROGENO TOTAL Y AMINICO





Ra DE AMINOACIDOS PUROS

	Ra (')	Ra (")
Acido glutámico	0,735	0,861
l-Alanina	1,000	1,000
l-Arginina	0,348	0,477
l-Cistina	0,184	-
Glicina	0,620	0,843
dl-Histidina	0,353	0,719
dl-Isoleucina	1,900	-
l-Leucina	1,920	-
l-Lisina	0,238	-
Metionina	1,550	1,263
dl-Serina	0,575	0,902
l-Tirosina	1,380	-
l-Treonina	0,720	1,043
dl-Triptofano	1,780	-
dl-Valina	1,520	1,343

(') Solvente: butanol-ácido acético-agua (40:10:50)

(") Solvente: etanol 77 %

AA - Hidrólisis ácida - mayo 1954  
 en pág 22 - 6 manchas  
 en foto agregada = 1 mancha  
 IIIa - mayo 1954 - 6 en Aa, 9 en Ab, 11 en el cuadro -  
 en ambos casos no balanceada

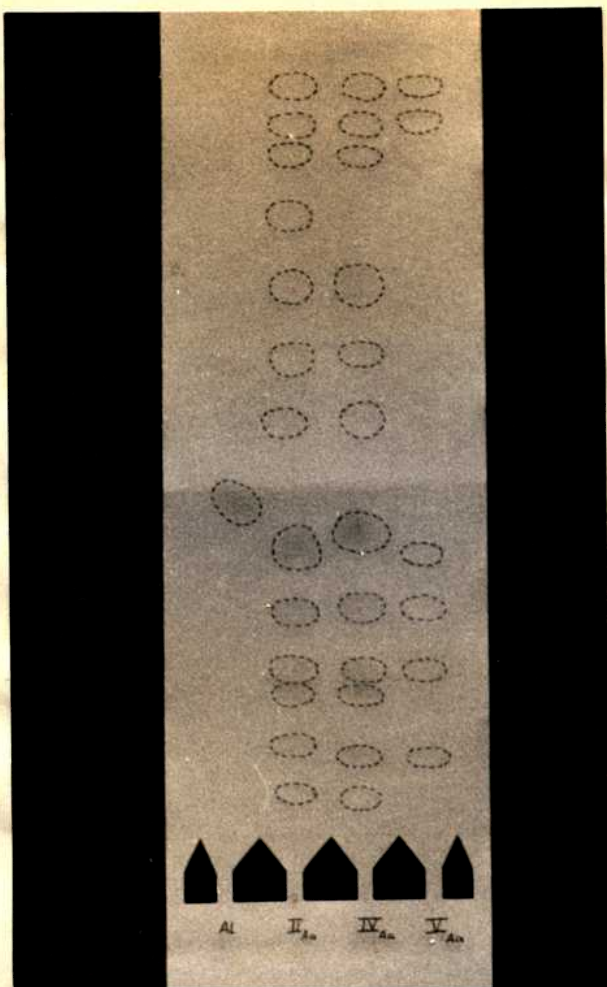
Estadística:

XII Aa - 4 en fot. (no *Balanina*)  
 XII Ab - 7 en fotog 6 (pág 24) (*Balanina*?)  
 en cuadro 11

(I)  
 (II)

VARIACION ESTACIONAL DE AMINOACIDOS EN "MACROCYSTIS PYRIFERA"

	octubre 1953	noviembre 1953	febrero 1954	marzo 1954	abril 1954	mayo 1954 • ~	julio 1954	agosto 1954	hojas	planta entera	flotadores
Acido glutámico	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+
<i>β</i> -Alanina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
l-Arginina	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
l-Cistina	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
Glicina	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
dl-Histidina	-	-	? +	+	-	-	-	+	-	-	-
dl-Isolucina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
l-Leucina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
l-Lisina	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
Motionina	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
dl-Serina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
l-Tirosina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
l-Treonina	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
dl-Triptofano	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
dl-Valina	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+

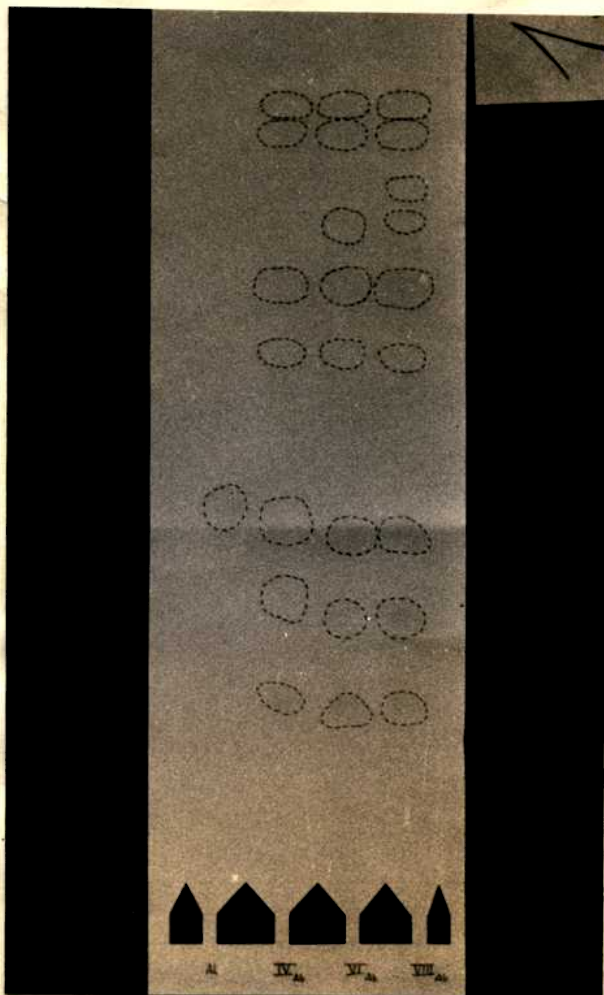


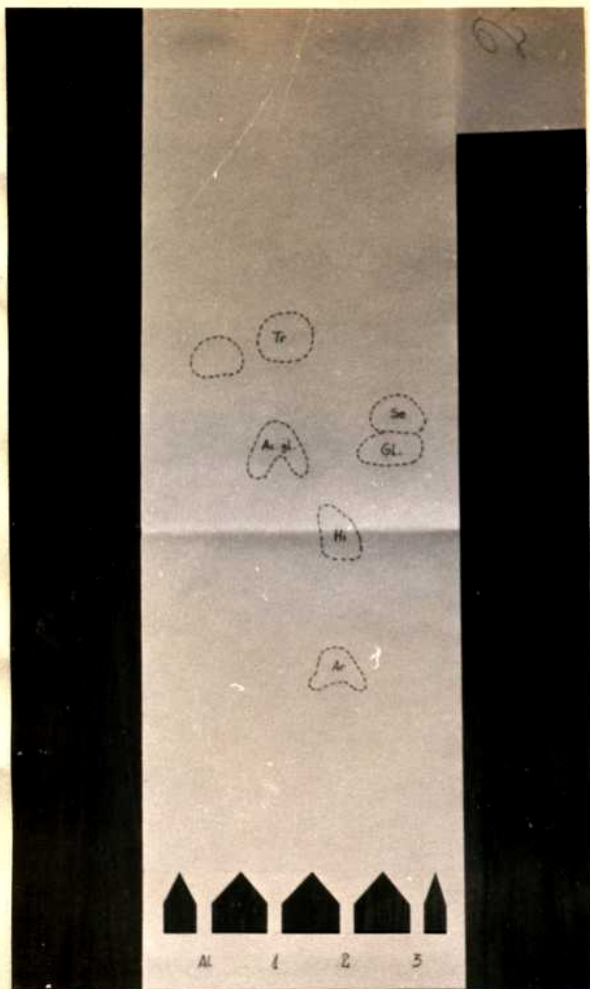
Fotografia 1

.II<sub>Aa</sub>:noviembre'53 (h. alc.) ? *va cuad.*  
 IV<sub>Aa</sub>:febrero'54 (h. alc.)  
 V<sub>Aa</sub>:marzo'54 (h. alcalina)  
 Butanol:Ac. acético:Agua  
 (40:10:50)

Fotografia 2

IV<sub>Ab</sub>:febrero'54 (h. ác.)  
 VI<sub>Ab</sub>:abril'54 (h. ácida)  
 VIII<sub>Ab</sub>:julio'54 (h. ác.)  
 Butanol:Ac. acético:Agua  
 (40:10:50)

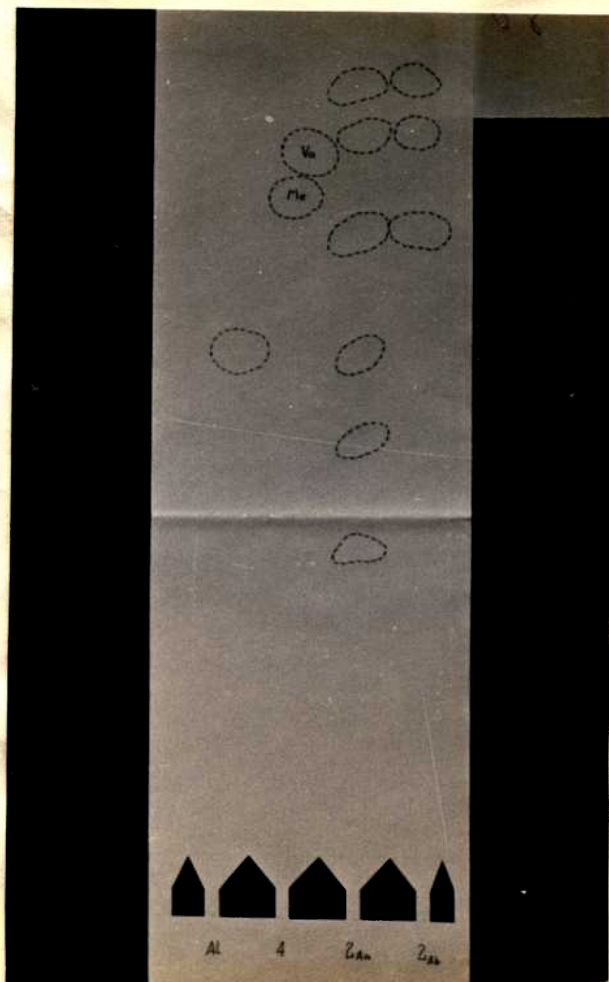




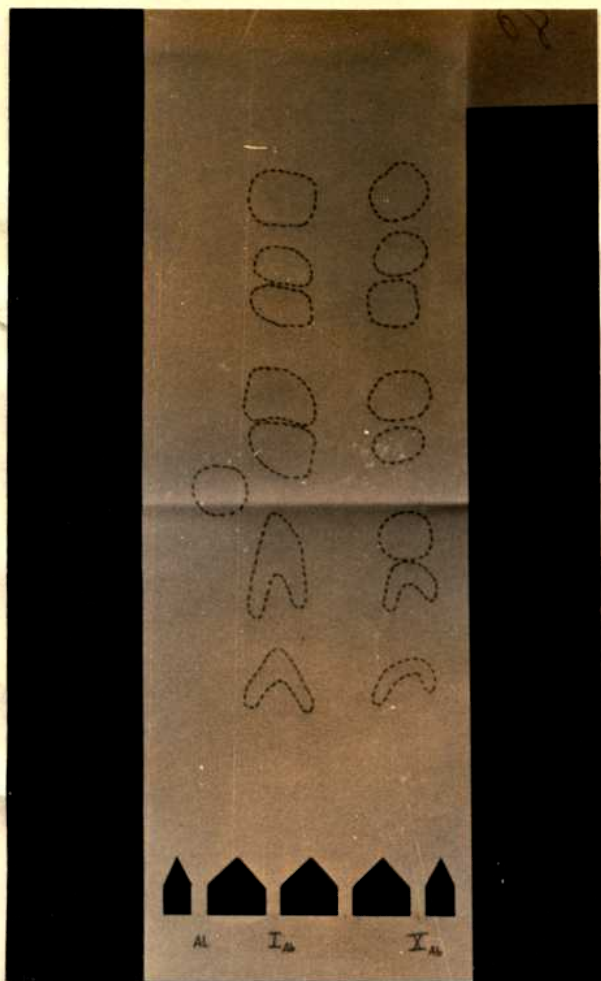
Fotografía 3

1:treonina-ác. glutámico  
2:histidina-arginina  
3:serina-glicina  
Etanol 77 % (v/v)

Fotografía 4  
4:valina-metionina  
Etanol 77 % (v/v)





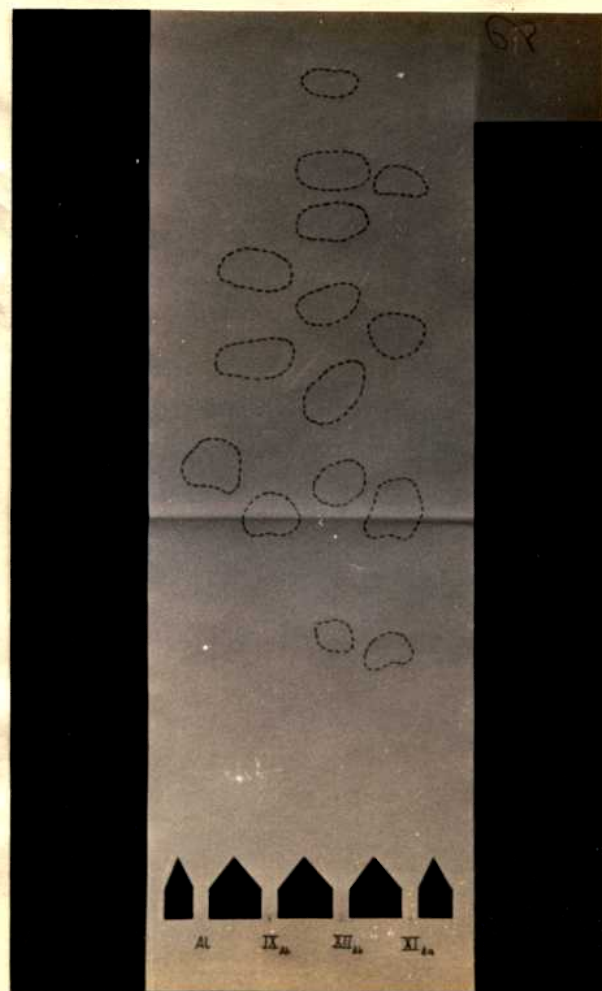


Fotografia 5

I<sub>Ab</sub>: octubre '53 (h. ácida)

X<sub>Ab</sub>: hojas (h. ácida)

Etanol 77 % (v/v)



Fotografia 6

IX<sub>Ab</sub>: agosto '54 (h. ácida)

XII<sub>Ab</sub>: flotadores (h. ácida)

XI<sub>Aa</sub>: planta entera (h. alc.)

Etanol 77 % (v/v)



## CONCLUSIONES

En el presente trabajo se trató de poner a punto un método de determinación cualitativa de la composición de aminoácidos en algas marinas y de aplicar ese método al estudio de la variación estacional de algunas algas que crecen abundantemente en el litoral marítimo de nuestro país.

En el primer aspecto, si bien los métodos descritos en la literatura son suficientemente claros y explícitos, era necesario resolver por un método sencillo la eliminación de las sales que interfieren en la cromatografía sobre papel y que en las algas marinas, sobre todo las pardas, representa un importante porcentaje de su composición (30. a 40 %).

De los métodos encontrados en la literatura se ensayó como el más viable el de Block (24) que elimina las sales del producto de la hidrólisis de proteínas previamente deshidratadas, por extracción de los aminoácidos con acetona clorhídrica.

Los resultados obtenidos fueron muy satisfactorios, ya que la extracción fué total y desaparecieron las interferencias propias de la presencia de minerales.

En el segundo aspecto, o sea la variación estacional de composición de las algas, se ha visto que hay un marcado aumento del nitrógeno total y del amínico en los meses de primavera.

? En cuanto a la composición en aminoácidos de las proteínas la determinación cualitativa no permite extraer muchas conclusiones.

Un resultado muy interesante es el de que los aminoácidos glucogénicos, o sea aquellos que representan etapas intermedias en la formación de los hidratos de carbono, tales como la treonina, serina, alanina y tirosina, no faltan en ningún mes del año. ?

En lo que respecta a los aminoácidos considerados esenciales se concluye que en general se presentan todos en los distintos meses del año, a excepción de la histidina que solamente lo hace en algunos.

Es de destacar que la falta de un aminoácido en un mes aislado del ?

año puede ser aparente, pues posiblemente se deba a destrucción del mismo en las respectivas hidrólisis.

La prolina y la oxiprolina no han dado positivas en ninguna de las muestras investigadas, de lo cual concluimos que las mismas se hallan ausentes de la composición de las algas marinas ó, por lo menos, que las cantidades que se encuentran son tan pequeñas que no es posible identificarlas por métodos cualitativos. ?

Esto ratifica los resultados obtenidos en un trabajo anterior realizado por la Srta. María A. Rongine.

Roberto L. Linares

Roberto R. Rongine

BIBLIOGRAFIA

- (1) Chapman V. J.: Seaweds and their uses, London (1950).
- (2) Dangeard C.: *Traité D'Algologie* (1937).
- (3) Smith D. y Young G.: *J. Biol. Chem.*, 217, 845-53 (1955).
- (4) Coulson C. B.: *J. Sci. Food Agr.*, 6, 674-82 (1955).
- (5) idem (4): *Chemistry and Industry*, 997-98 (1953).
- (6) Takagi M.: *Bull. Fac. Fisheries, Hokkaido Univ.* 1, N° 1, 35-43 (1950).
- (7) idem (6): *4*, N° 1, 86-91 (1953).
- (8) Tabei K.: *J. Home Econ. (Japan)* 3, N° 1, 20-22 (1952).
- (9) Scott R.: *Nature* 173, 1098-99 (1954).
- (10) Lyman C., Kuiken K. y Hale F.: *J. Agr. Food Chem.*, 4, 1008-13 (1956).
- (11) Houdley J. M., Ing R. y Krauss R.: *Science*, 124, 536-37 (1956).
- (12) *Diario "La Prensa"*: Buenos Aires, enerh 5 de 1963.
- (13) Hirst Jones y Jones: *Nature* 143, 357 (1939).
- (14) Schoeffel y Link: *J. Biol. Chem.*, 100, 397 (1933).
- (15) Tompson y Morrison: *Anal. Chem.*, 23, 1153 (1951).
- (16) Koch F. y Mc Meekin T.: *J. Am. Chem. Soc.*, 46, 2066 (1924).
- (17) Vanselow A.: *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, 12, 516 (1940).
- (18) Wicks L.: *J. Lab. Clin. Med.*, 27, 118 (1941).
- (19) Miller G. y Miller E.: *Anal. Chem.*, 20, 481 (1948).
- (20) Peters A.: *J. Biol. Chem.*, 39, 285 (1919).
- (21) Leitch J.: *J. Franklin Inst.*, 245, 355 (1948).
- (22) Schroeder W., Kay L. y Mills R.: *Anal. Chem.*, 22, 760 (1950).
- (23) Pope C. y Stevens H.: *Bioch. J.*, 33, 1070 (1939).
- (24) Block R.: *Aminoacid Handbook*, pág. 17, C. C. Thomas-Publishers.
- (25) Underwood J. y Rockland L.: *Anal. Chem.*, 26, 1553 (1954).
- (26) idem (25): 26, 1557 (1954).
- (27) Klinger W.: *Naturwiss*, 42, 645 (1955).
- (28) Matthias W.: *Naturwiss*, 41, 17 (1954).
- (29) Block R., Durrum E. y Zweig G.: *A manual of paper chromatography and....*, pág. 123, Academic Press Inc., N. York (1958).
- (30) idem (24): pág. 91.

- (31) Channing D. y Young G.: Chem. and Ind., 519 (1952).
- (32) Channing D. y Young G.: J. Chem. Soc. (London), 2431 (1953).
- (33) Cramer F.: Papierchromatographie, pág. 64, Verlag Chemie, GMBH, Weinheim, Bergstr. (1954).
- (34) Zahn H.: Textilpraxis, pág. 127 (1951).
- (35) Lissitsky S.: Bull. Soc. chim. Biol., 36, 655-57 (1954).
- (36) idem (29): pág. 55.
- (37) idem (33): pág. 28.
- (38) idem (29): pág. 61.
- (39) idem (24): pág. 72.
- (40) idem (24): pág. 80.

PARTE GENERAL:

Fortunato A. D.: Ciencia o Investigación, 12, 501 (1958).

Rongine M. A.: Tosis doctoral, F.C.E.N. Bs. As. (1955).

Gianella A.: Tosis doctoral, F.C.E.N. Bs. As. (1956).

Cramer F.: Papierchromatographie, Verlag Chemie, GMBH, Weinheim, Bergstr. (1954).

Block R.: Aminoacid Handbook, C.C. Thomas-Publishers.

Block R., Durrum E. y Zweig G.: A manual of paper chromatography and... Academic Press Inc., New York (1958).