UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DETERMINACION CUALITATIVA DE ACIDOS AMINADOS ENCONTRADOS EN CINCO ZACATES UTILIZADOS COMO BASE EN LA ALIMENTACION DEL GANADO BOVINO, EN LA ZONA NORTE DEL ESTADO DE VERACRUZ, POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE MEXICO
BIBLIOTECA CENTRAL
U. N. A. M.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

PASCUAL FRANCISCO PEREZ HERNANDEZ

MEXICO, D. F 1968

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

EL PRESENTE TRABAJO, SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE CROMATOGRAFIA DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA Y FARMACOLOGIA, DE LA ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, CON LA DIRECCION DEL SR. M. V. JAVIER GARCIA DE LA PEÑA.

A MIS PADRES.

A MIS HERMANOS.

A MI ESPOSA.

C O N T E N I D O

I - INTRODUCCION

II - MATERIAL Y METODOS

III - RESULTADOS

IV - DISCUSION

V - CONCLUSIONES

VI - RESUMEN

VII - BIBLIOGRAFIA

SIENDO VERACRUZ UNO DE LOS ESTADOS EMINENTEMENTE GANADEROS, DE LA REPUBLICA MEXICANA, QUIERO COOPERAR AUNQUE DE MANERA SOMERA, EN EL MEJOR APROVECHAMIENTO DE LOS RECURSOS NATURALES CON QUE CUENTA LA ZONA DE LA HUASTECA VERACRUZANA.

EN LOS ESTUDIOS MAS RECIENTES, RELACIONADOS CON LA NUTRICION DE LOS ANIMALES, NOS INDICAN QUE EL GASTO QUE ENTRAÑA LA ALIMENTACION, CONSTITUYE UNO DE LOS FACTORES QUE MAS PESA SOBRE LOS COSTOS DE PRODUCCION DE LAS EXPLOTACIONES ZOOTECNICAS.

CONOCIENDO EL MEDIO Y LA RIQUEZA DE SUS FUENTES NUTRICIONALES CON QUE SE CUENTA EN LA REGION Y QUE SON DE VITAL IMPORTANCIA EN EL PROGRESO DE LA GANADERIA, ES POR LO QUE ENCAMINE ESTE SENCILLO TRABAJO, EN EL ANALISIS DE ALGUNOS ZACATES DE MAYOR DIFUSION UTILIZADOS COMO FUENTE DE ALIMENTACION DENTRO DEL MEDIO ANTERIORMENTE CITADO, PARA DAR UNA IDEA AUNQUE GENERAL DEL CONTENIDO DE LA PARTE FUNDAMENTAL DE LA PROTEINA, QUE ES LA FORMA DE AMINOACIDOS.

I - INTRODUCCION

A) - GENERALIDADES SOBRE CROMATOGRAFIA

B) - PROPIEDADES DE LOS AMINOACIDOS

C) - DESCRIPCION DE LOS ZACATES

A) - GENERALIDADES SOBRE CROMATOGRAFIA 7-13-10

A principios del presente siglo, el investigador ruso Tswett desarrolló un método de absorción para la separación de pigmentos de plantas. A esto le dió el nombre de "cromatografía" debido a las bandas coloreadas formadas en el absorbente. Más tarde, otros investigadores ampliaron este método de varias maneras é incluso lo aplicaron a substancias incoloras.

La gran ventaja de la cromatografía para fines analíticos se encuentra en la posibilidad que proporciona, de aislar los constituyentes de mezclas complicadas de substancias químicas afines, separación que de otra manera sería difícil o casi imposible. La separación de dos o más substancias se puede llevar a cabo por medio de la cromatografía, por que los absorbentes y disolventes pueden ser variados en un margen muy amplio, así que las combinaciones adecuadas se pueden encontrar facilmente para los problemas de investigación. La cromatografía en placa delgada ofrece nuevas posibilidades de llevar a cabo separaciones, incluso de pequeñísimas cantidades de material.

Procesos cromatográficos

En todos los procesos cromatográficos entran en acción fuerzas de absorción, partición o intercambio iónico, y a menudo las tres juntas. Sin embargo, una u otra de éstas puede predominar. En cada separación cromatográfica se presentan por lo menos dos fases. En la clasificación usual de los procesos cromatográficos la cual los divide en cromatografía de partición y de absorción, el sistema consiste en pares de fases sólidas, líquidas y gaseosas, de la siguiente manera:

Sólida/líquida	-	Cromatografía por absorción
Líquida/líquida	-	Cromatografía por partición (Cromatografía en papel).
Sólida/gaseosa	-	Cromatografía por absorción (Cromatografía de gases o cromatografía en fases vapor).
Líquida/gaseosa	-	Cromatografía por partición.

Cromatografía por absorción.

Este proceso se conoce desde el siglo pasado. Sin embargo, Tswett fué el primero en usarlo sistemáticamente para separación y análisis. Los nombres de H. Brockmann; G. Hesse, R. Kuhn, A. Tiselius, L. Zechmeister, entre otros, van asociados al desarrollo posterior de esta técnica a la cual dieron suma importancia en la química preparativa. En este proceso clásico, la separación se lleva a cabo por absorción de varias substancias (principalmente óxido de aluminio) seleccionadas y preactivadas, que se usan en forma de polvo fino, el cual se introduce en tubos verticales de vidrio. La mezcla por analizar, convenientemente disuelta, se hace pasar por gravedad, presión o succión a través del tubo; con lo cual la substancia más afin al absorbente permanece en la parte superior de dicho tubo, y la substancia con menor afinidad queda más abajo. Las bandas así formadas se identifican por medios convenientes.

Cromatografía por partición.

Esta cromatografía fué inventada por los investigadores ingleses Martín y Synge, por lo cual obtuvieron el premio Nobel. La separación de una mezcla, se basa en los diferentes grados de solubilidad de los constituyentes en dos disolventes que no sean completamente miscibles. Esto depende de la diferencia en el coeficiente de partición, y puede compararse a una serie de extracciones sucesivas en un embudo de separación.

En la cromatografía por partición, las propiedades del medio como absorción, carecen de importancia ya que solamente sirven como vehículo para las dos fases líquidas. Las substancias que se usan para llevar el tubo son, por ejemplo, gel de sílice, polvo de celulosa o bajo ciertas condiciones, alúmina. Estos compuestos, junto con el líquido con el que se han humedecido (generalmente agua, constituyen la fase estacionaria; el disolvente, el cual contiene las substancias que van a ser separados y se pasa a través de la columna, constituye la fase móvil. La separación de las substancias se efectua por la partición contínua entre las fases móvil y estacionaria, en lugar de llevarse a cabo por absorción en el vehículo. Las substancias que se van a separar corren a través de la columna con una velocidad deficida y aparecen separadamente disueltas en el extremo inferior.

En el método de contracorriente, o método de partición de Craig, se logra una separación ideal puesto que no se usa ningún vehículo, sino un dispositivo que consiste en tantas celdas de vidrio como sea posible, estas celdas contienen los dos disolventes. En este aparato, la partición de la substancia se logra igual que en una serie de extracciones sucesivas y en una serie de embudos de separación. El factor determinante para la separación es el coeficiente de partición que resulta de la solubilidad en las dos fases.

Cromatografía en papel.

En este método, que se basa principalmente en el proceso de partición, se usa el papel filtro como vehículo para la fase estacionaria y para el disolvente móvil, el cual es impulsado por fuerzas capilares. En la gran cantidad de pequeñas celdas formadas por las micelas del papel, la separación se efectúa por partición, exactamente de la misma manera que las extracciones sucesivas del método de contracorriente. Algunas veces, la fuerza de absorción é intercambio tienen lugar en la separación.

Cromatografía de gases.

En esta cromatografía se separa los gases o vapores de líquidos en un gran tubo de separación. Esta separación puede ser por partición, si el tubo está lleno con líquido, o por absorción y desorción el vehículo mismo. Los gases obtenidos se miden tomando en cuenta sus diferentes propiedades físicas (conductividad térmica).

Cromatografía heteropolar o por intercambio iónico.

De hecho ésta es una cromatografía por absorción. Sin embargo, en la cromatografía por absorción, la separación se efectua usando únicamente una superficie con fuerzas no polares, en cambio en la cromatografía por intercambio iónico, se usan fuerzas electroquímicas o polares. Estas fuerzas polares dependen del pH. En la cromatografía por intercambio iónico el vehículo reacciona con la substancia por fuerzas químicas, entonces ocurre un intercambio entre el vehículo y los aniones o los cationes de la solución. Las soluciones alcalinas absorben mejor las bases, y las soluciones ácidas absorben mejor los ácidos, por lo tanto es conveniente usar en cada caso iones de la misma carga para un intercambio iónico. El pH del medio tiene un papel muy importante para el efecto de intercambio.

La cromatografía por absorción, por partición y por intercambio iónico usan el vehículo en tubo vertical de vidrio, por lo tanto estos tres tipos de cromatografía están comprendidos en la cromatografía en columna.

11.- Cromatografía en placa delgada 23-24

Comparado con la cromatografía en columna, la técnica de cromatografía en papel tiene sus ventajas y desventajas; sus dos principales ventajas son: 1o. se trabaja con pequeñas cantidades de muestra y 2o. se puede usar para una doble resolución, porque es bidimensional; su principal desventaja es que el papel tiene una actividad absorbente, por lo cual su aplicación el aresolución de substancias lipofílicas es limitada. Muchos autores han obtenido magníficos resultados relacionando las ventajas de ambos métodos si usan un absorbente adecuado para cromatografía en columna en una placa delgada.

Brown sugirió el uso de películas delgadas de absorbente, contenidas entre dos placas de vidrio o dos hojas de papel filtro, pero generalmente, los resultados fueron poco satisfactorios porque las películas resultan demasiado delgadas para ser uniformes o son tan gruesas que equivalen a columnas con las consiguientes desventajas

Williams (25) desarrolló una técnica de emparedado que usó en pruebas preliminares para el descubrimiento de condiciones mejor aplicadas después en cromatografía en columna. La técnica usada fué la siguiente: se coloca el absorbente suelto sobre una placa de vidrio y se cubre con una segunda placa de vidrio que tenga un pequeño orificio en el centro; se coloca una solución del material por investigar en el absorbente, empleando para ello el orificio, y el cromatograma se desarrolla agregando disolvente gota a gota. Estas pruebas rapídas y económicas (adecuadas para compuestos coloridos), permiten determinar fácilmente la combinación de disolventes más apropiada al sistema.

Ismaloiv y Sharaiber (12) y más tarde Crowe (4) investigaron la posibilidad de usar una capa de absorbente pulverizado. El polvo suelto se coloca en un recipiente inclinado y se comprime con una cuña, formando una

capa delgada en un extremo y gruesa en la base. Después de que la muestra se ha puesto sobre el polvo en la base de la capa, se desarrolla el cromatograma por adición de disolventes que corren hacia el borde delgado de la capa.

La técnica fué posteriormente mejorada por Mottier y Patterat (18). En el método de Mottier se activa una pequeña cantidad de alúmina y se coloca sobre una placa de vidrio, el exceso de absorbente se elimina con una segunda placa de vidrio dejando una capa de alúmina sin irregularidades. El espesor de las capas se determina por el grueso de dos bordes de hule colocados alrededor de la placa. La capa resultante tiene suficiente adherencia para inclinarse 25° y cuando está humeda puede aspirarse. Mistryukov sostiene que el proceso funciona mejor cuando se usa vidrio esmerilado como soporte.

Davidek y colaboradores, prefieren el uso de una varilla de vidrio en lugar de la placa, para hacer la eliminación del esceso de absorbente, el espesor de la placa se regula por bandas de hule colocadas alrededor de la varilla.

Además del cuidado necesario para manipular placas de vidrio con polvo suelto, la tensión superficial del disolvente rompe la continuidad de la capa del absorbente. La solución a estas dificultades (y así el nacimiento de la Cromatografía en capa delgada), fué encontrada por Meinhard y Hall (17), quienes fueron capaces de producir una capa cohesiva de absorbente, agregando almidón al polvo para que actue como aglutinante Bush desarrolló un sistema equivalente partiendo de la cromatografía en papel. En este proceso se sumerge papel Whatman No. 4 en una solución caliente de sulfato de aluminio al 30% que se precipita por adición de hidróxido de sodio 2N. Entonces se deja escurrir durante 15 min. y se guarda en una atmósfera saturada de amoníaco. Después de 16 horas el papel se remoja en una solución de cloruro de calcio al 0.02% durante 24 horas, mientras tanto se extraen los vapores de amoniáco del recipiente. Una vez seco el papel, está listo para usarse. El papel impregnado con alúmina es adecuado para la cromatografía por absorción de esteroides.

La preparación de papel impregnado de absorbente es una operación larga, la cual como se verá más tarde, se compara muy desfavorablemente con la rapidéz y simplicidad con que pueden prepararse las capas delgadas. Una desventaja más es que el papel tiende a descomponerse a la temperatura necesaria para activar el absorbente. Dieckter y colaboradores han eliminado estas dificultades sustituyendo el papel de celulosa por vidrio.

Meinhard y Hall desecharon la idea de que un polvo suelto resultara satisfactorio y buscaron producir una capa con cohesión que se pegara a una placa de vidrio. Encontraron que con alúmina y almidón, como agente aglutinante, las capas tendían a romperse cuando se secaban, esta dificultad se

superó agregando celita a la mezcla; así, celita (3.5 g), almidón de amioca (0.3 g) y alúmina activa (6.2 g) se mezclan en seco, se agrega agua (18 ml) y la mezcla se calienta en un baño de agua y se agita hasta que coagule (cerca de dos minutos). Después que el coágulo se ha enfriado, se tritura con agua (2.5 ml) para formar una crema espesa. La crema se aplica sobre placas de vidrio libres de grasa, produciendo una capa de 2 mm de espesor, aproximadamente, hay que estar seguros que la capa esté uniformemente distribuída y que tenga una superficie tersa. Después de que las capas se han secado a temperatura ambiente, están listas para usarse. Estas placas son estables al humedecimiento producido por la mayoría de los disolventes.

La técnica se llamó cromatografía de superficie. Otros investigadores que han contribuído a su desarrollo han sugerido otros nombres; cromatografía en película delgada, cromatografía en placa delgada, cromatografía en columna abierta y cromatografía en placa.

A pesar de las desventajas de la cromatografía en placa delgada con polvo suelto, aún se usa especialmente con alúmina como absorbente.

En la discusión de los detalles de la técnica, es conveniente dividir el proceso en sus distintas fases de operación, las cuales pueden resumirse brevemente de la siguiente manera:

Una placa de vidrio se cubre con una suspensión acuosa de un polvo absorbente, en tal forma que se adhiera al vidrio una película uniforme.

Después de que la placa ha sido secada para eliminar el agua y activar el absorbente, se gotea sobre la película una solución de la muestra por analizar, la placa se coloca en un tanque cerrado que contenga un disolvente conveniente. El disolvente asciende por capilaridad, separando los componentes de la mezcla, si estos son incoloros pueden ser localizados, ya sea usando una película a la que se le haya incorporado un indicador, o bien rociando la película con un reactivo cromógeno apropiado.

Esto es la base del proceso, los refinamientos en la técnica requeridos para las identificaciones y separaciones de ciertas mezclas y de soluciones de baja concentración serán descritas posteriormente.

Aparato.

El equipo necesario para llevar a cabo una cromatografía en placa delgada consiste en:

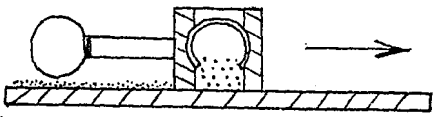
Placa de vidrio
Aplicador de acero inoxidable o aluminio
Micropipeta
Tanque de elución cerrado herméticamente
Desecador
Atomizador
Estufa eléctrica

Tanto el tamaño y las formas de las placas de vidrio y de los aplicadores empleados para extender la mezcla han sido constantemente modificados con el objeto de obtener una capa de absorción perfectamente tersa y de espesor uniforme. Algunos de estos aplicadores presentan la ventaja de poder graduar el espesor de la película.

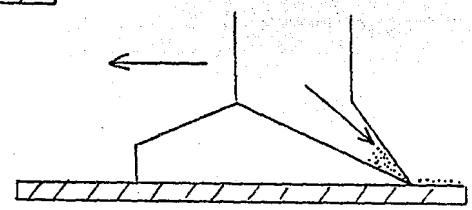
Sin embargo, todo el equipo necesario en esta técnica es de costo elevado, lo cual constituye una desventaja en la aplicación rutinaria de la cromatografía en placa delgada.

A continuación, se ilustran algunos modelos de los aparatos utilizados por diferentes investigadores (23-2-14).

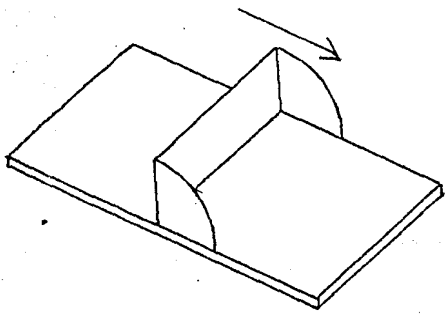
Aplicadores usados por:



Stahl (23)



Barbier (2)



Machata (14)

Absorbentes.

a). - Elección del absorbente apropiado.

Aunque casi cualquier absorbente que conviene para la cromatografía en columna (con partículas de 70μ) puede usarse para cromatografía en placa delgada, se obtiene mejor resultado cuando el tamaño de las partículas varía de 1 a 5μ, siendo conveniente una pulverización y ruptura, por ejemplo por sedimentación antes de su empleo. Es muy común el uso de la gel de sílice en este tipo de cromatografía. La gel de sílice, alúmina y otros absorbentes preparados expresamente para cromatografía en placa delgada de acuerdo con las indicaciones de Stahl, pueden obtenerse facilmente en el comercio.

La alúmina G es ligeramente básica y su empleo no es muy conveniente usando una solución apropiada en lugar de agua destilada para preparar la suspensión.

Comparadas con la gel de sílice neutra, una capa ácida tiene una afinidad ligeramente mayor por los compuestos neutros, mientras que la afinidad de la capa básica por este tipo de compuestos es ligeramente menor.

La alúmina puede formar película más activa que la gel de sílice, siempre y cuando su actividad sea adecuada. Mientras que la gel de sílice puede ser activada con relativa facilidad, la alúmina requiere temperaturas entre 250 y 500°.

El control de la variación de absorción mediante la variación del contenido de agua es muy difícil, una manera sencilla para cambiar la activación consiste en mezclar los disolventes.

No es esencial que la suspensión de la gel de sílice sea hecha en agua, se han obtenido buenos resultados empleando acetona, cloroformo, metanol diluído, etc.

También pueden usarse como absorbentes otras sustancias, tales como sulfato de calcio, polietileno y celulosa en polvo. Esta última no requiere aglutinante ni activación; se dispersa en acetona y normalmente se aplica sobre las placas de vidrio. Tan pronto como se evapora la acetona, se puede correr la cromatografía. Otros derivados de la celulosa, como el acetato, el fosfato y la carboximetilcelulosa se han empleado con buenos resultados. Existen productos comerciales como "Magnesol", "Perlón" en polvo y resinas cambiadoras de iónes.

b). - Influencia del tamaño de la partícula.

Se ha encontrado que el tamaño de la partícula del absorbente afecta en varias formas las propiedades de la película, influye sobre la velocidad con que se corre la cromatografía y sobre el desarrollo de la misma.

Se obtienen resultados satisfactorios cuando las partículas miden de 0.5 a 5 adhiriéndose a la placa de vidrio aún sin aglutinantes.

Las partículas muy pequeñas (< 1) forman las capas lentamente, m mientras que la formación de la película es más rápida a medida que aumenta el tamaño de las partículas (hasta 5).

c). - Agentes aglutinantes.

Las partículas del absorbente del tamaño conveniente para la cromatografía en placa delgada (1 a 5) se adhieren al vidrio facilmente, pero son removidas por la acción de los disolventes.

Al agregar un agente aglutinante en la película, disminuirá la tendencia del disolvente de quitar el absorbente del vidrio. Los aglutinantes más empleados son: el almidón, el sulfato de calcio, etc.

Algunos investigadores han usado el alcohól polivinílico, debiendo agregarle unas gotas de etanol para evitar la formación de espuma.

El almidón forma capas más gruesas, pero presenta varios inconvenientes. No todos los tipos de almidón dan buenos resultados y es una desventaja tener un compuesto orgánico incorporado a la película, además la gel del sílice comercial ya contiene sulfato de calcio, siendo muy fácil su empleo.

Las películas que contienen sulfato de calcio como agente aglutinante son muy sensibles a la abrasión y ligeramente a la acción lavadora de los disolventes

d). - Activación del absorbente

Cuando se forma una suspensión acuosa del absorbente que se aplica sobre el vidrio, la capa es inactiva y no puede ser utilizada hasta que se ha eliminado totalmente el agua.

Una vez preparada la cromatoplaca, debe dejarse secar al aire, más o menos durante veinte minutos, antes de someterse a un calentamiento, pues de otra manera se puede provocar la cuarteadura de la película y una adhesión imperfecta del absorbente.

La gel de sílice se activa bien, calentando la placa a 105-110° durante 30 minutos, sin embargo se ha observado que se obtienen buenos resultados dejando secar y reposar las placas a temperatura ambiente y presión atmosférica durante una noche.

La alúmina require temperaturas más altas para activarse (250°) más tiempo y es difícil obtener una activación constante.

Como la activación de la película es influenciada por la cantidad de humedad que contiene, la capa activada debe protegerse del vapor de agua y de los vapores del laboratorio; puede absorber más de 10% de su peso de humedad al exponerla al aire.

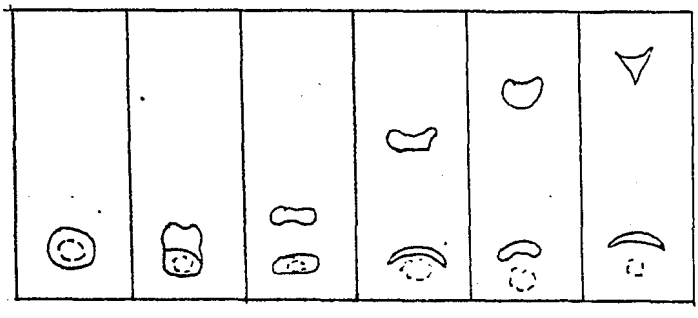
Las cromatoplacas preparadas pueden almacenarse en la estufa a 100° o en un desecador común y corriente que contenga gel de sílice. En ningún caso, deben guardarse las placas por más de cuatro días.

APLICACION DE LA MUESTRA.

a). - La primera condición para efectuar un buen cromatograma es que el tamaño de las gotas que se aplican en la placa sean lo más pequeñas posible.

Una solución de la muestra por analizar se aplica sobre la película de la muestra y se lleva a cabo en una corriente suave de aire con objeto de aumentar la velocidad de evaporaración del disolvente y así mantener el tamaño de la gota al mínimo. El disolvente usado para poner la muestra en la película debe ser capaz de evaporarse rapidamente, pero no tan rapidamente que permita que el compuesto se separe de la solución.

Si la solución se aplica a la película, tocando el absorbente con la punta de la micropipeta, invariablemente se hace un agujero en la película, esto da lugar a que se produzca una mancha no circular que se distorsiona de una manera característica, (como se muestra en la siguiente figura); esto se debe a que el eluyente debe subir rodeando el agujero, en vez de subir uniformemente, así el eje central del camino se desarrolla más lentamente que el área vecina, los compuestos viajan cerca del frente del disolvente y aparecen como manchas triangulares, pero los compuestos que permanecen cerca del punto de aplicación aparecen alargados. La aplicación de muestras sobre las placas requiere mucho cuidado y experiencia para evitar daños a la película.



Formas de la mancha cuando se ha lastimado la película. Nótese que las manchas de las substancias que corren menos son diferentes de las substancias que corren más.

Las muestras deben ser colocadas a 15 mm., aproximadamente, de uno de los catos de la película y de preferencia, aunque no es indispensable, en una línea que forme ángulos rectos con la dirección en la cual ha sido aplicada la capa del absorbente, de esta manera, la elución se hace a lo largo del "grano", si la capa ha sido adecuadamente preparada, no debe tener ningún grano, así es que esta precaución normalmente es innecesaria.

Las posiciones del punto de partida del cromatograma se deben marcar con una aguja, haciendo pequeños orificios en la gel de sílice, también es conveniente marcar el frente, esto es el punto más lejano hasta donde se dejará llegar el disolvente. En el comercio, pueden obtenerse modelos o patrones, con los cuales se pueden colocar varias muestras a intervalos regulares a lo largo de la película y a una distancia conveniente del canto de la placa. También pueden conseguirse guias para marcar el frente.

b). - Peso

Para películas de un espesor aproximado de 250 el peso ideal de la muestra es de 5-15 γ g por gota para un desarrollo lineal y 100-300 γ g, para un desarrollo radial, semi-circular. Si se usan más de 15 γ g, es más difícil obtener una duplicación exacta de las cromatogramas. Por otra parte, no se han encontrado dificultades usando muestras con un peso por gota, sin embargo, pueden usarse hasta 5 γ l, por gota. Todas las muestras deben ser preparadas a partir de soluciones al 1-2% en éter o cloroformo, los problemas líquidos pueden emplearse sin diluir, pero es preferible preparar soluciones para evitar un sobrepeso en la película.

Si la solución de la muestra es muy diluída, es mejor aplicarla a la película en varias gotas pequeñas, lo que permite una mejor difusión del disolvente.

Para un trabajo de preparación, es preferible colocar sobre la película una línea de solución de la muestra en lugar de una serie de gotas, en tal caso pueden usarse para una cromatoplaca de 20 x 15 cm., aproximadamente 4 mg. de muestra, en circunstancias favorables podrían utilizarse hasta 10 mg. Cuando se aplica una línea de solución sobre la película, es necesario tener cuidado para evitar causar incisiones o cortaduras en el absorbente, lo que estropearía el cromatograma, pues la elución no sería completa.

c). - Técnica

Antes del desarrollo del cromatograma, es necesario pulir la capa absorbente.

Cualquier defecto en los cantos de la capa causaría durante la elución irregularidades en la forma del frente del disolvente. Es conveniente rayar márgenes sobre el absorbente, a una distancia aproximada de 5 mm de los

cantos y las márgenes. El punto hasta el cual se intenta correr el disolvente (frente), debe medirse y marcarse antes del desarrollo.

La placa cargada se coloca en un tanque cerrado que contenga un disolvente adecuado, en tal forma que la línea de orígen (punto de partida) quede en el fondo y en posición paralela a la superficie del disolvente. Debe emplearse una cantidad suficiente de disolvente para cubrir aproximadamente 5 mm del canto inferior de la película y para que la atmósfera del tanque esté saturada de sus vapores.

Cuando se usa un solo disolvente, el tamaño y la forma del tanque no tiene importancia, sólo que debe ajustársele una tapa de cierre hermético. Sin embargo, un tanque pequeño tiene la ventaja de necesitar una carga menor de disolvente que uno grande y su atmósfera se satura más rapidamente con los vapores del disolvente. Para el desarrollo de los cromatogramas en placa delgada, pueden utilizarse frascos de reactivos, siempre y cuando tengan un cierre hermético.

Cuando se utiliza una mezcla de disolventes, el tamaño del tanque es importante, especialmente cuando el disolvente contiene una pequeña proporción del componente más volátil.

El último adelanto es el "tanque-S", que consta de una cubierta de vidrio, la cual se ajusta sobre tres cantos (lados) de la cromatoplaca, el último de los cuales constituye una pared del tanque. El lado abierto del conjunto es cerrado herméticamente en forma automática cuando se sumerge en un disolvente. Existe un espacio como de 2 mm entre la cubierta y la película, como el volúmen de este espacio es pequeño, la atmósfera se satura rapidamente.

Los cromatogramas de polvo suelto deben correrse horizontalmente. La técnica ascendente es la más usada, pues es la más conveniente, ya que cualquier otro tipo de desarrollo requiere que el disolvente sea llevado a la capa por medio de un aditamente especial.

Elección del disolvente.

Para obtener buenos resultados, todos los disolventes deben estar secos y puros. El curso del desarrollo de un cromatograma puede alterarse profundamente por pequeñas cantidades de impurezas que pueden encontrarse normalmente en los disolventes, así por ejemplo; los éteres pueden contener pequeñas cantidades de peróxido, en los éteres es común la presencia de ácido libre y alcohól formados por hidrólisis y los hidrocarburos clorados generalmente tienen ácido clorhídrico libre.

La elección de un disolvente para una investigación particular puede facilitarse por la similitud que existe entre la cromatografía en columna y la cromatografía en placa delgada.

La lista siguiente de disolventes comunes, colocados en un orden aproximado de poder eluyente, puede usarse como guía para escoger un

disolvente para cromatografía en placa delgada:

Eter de petróleo (hexano)
Ciclohexano
Tetracloruro de carbono
benceno
Cloruro de metileno
Cloroformo
Eter etílico
Acetato de etilo
1-2 dicloroetano
Acetona
Alcohól isipropílico
Etanol
Metanol
Agua
Piridina
Acido acético

aumento del poder eluyente.

Pueden obtenerse nuevas series completas de disolventes con poderes eluyentes intermedios, mezclando algunos de los disolventes anteriores.

El disolvente más conveniente para un problema particular puede encontrarse haciendo pruebas preliminares y si varios disolventes (anteriores) resultan aceptables, se escoge el más simple, es preferible usar un solo disolvente que una mezcla.

c). - Tiempo y distancia del desarrollo.

Es obvio que el tiempo requerido para el desarrollo dependerá de la distancia que recorrerá el disolvente, es decir del frente del disolvente.

Se ha observado una marcada disminución de avance del disolvente después de los primeros centímetros. Es muy común que se cubran los primeros cinco centímetros con la misma velocidad que en los siguientes dos centímetros.

A medida que se desarrolla el cromatograma, los compuestos se separan gradualmente uno de otro, pero al mismo tiempo las gotas individuales pueden extenderse haciendo difuso el cromatograma. La distancia óptima a recorrer por el disolvente (frente), es aproximadamente de 10 cms, en esta distancia pueden separarse mezclas que tengan hasta veinte componentes.

Hay cinco factores que influyen en la velocidad de avance del disolvente sobre la cromatoplaca. Dos de ellos ya han sido mencionados; el tamaño de la partícula del absorbente y el espesor de la capa. Los otros tres factores son: la atmósfera del tanque de desarrollo, el ángulo de la cromatoplaca y el disolvente.

El grado de saturación de la atmósfera en el tanque controla la velocidad de la evaporación del disolvente de la película y por tanto la velocidad de desarrollo, el tanque tiene que tener cierre hermético. Si el estanque está herméticamente cerrado, pero no está completamente saturado, el tiempo requerido por el disolvente para recorrer una distancia dada (frente) puede aumentar hasta un 50%.

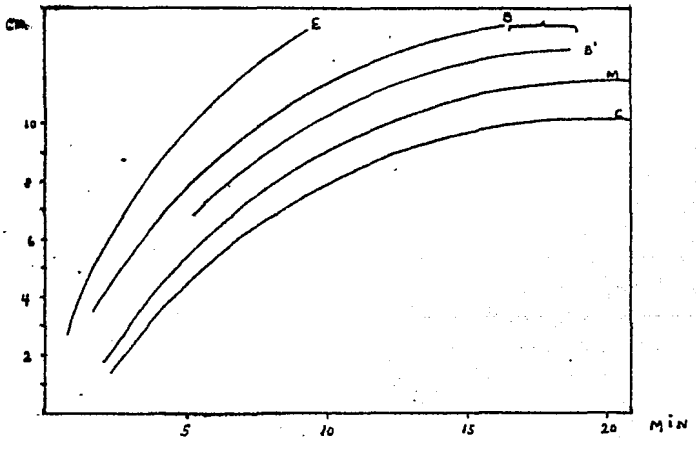
Las cromatoplacas generalmente se colocan verticalmente en el tanque, Sin embargo, si tiene una cierta inclinación en la forma que se afecta la velocidad del desarrollo depende del disolvente empleado. Generalmente las placas inclinadas se recorren más lentamente que las colocadas en posición vertical, aunque con éter el desarrollo es más rápido.

La información existente sobre el efecto del disolvente sobre el tiempo necesario para correr un cromatograma es muy limitada.

La siguiente gráfica fué obtenida usando la misma cromatoplaca y estando saturada la atmósfera del tanque. Se tomaron dos medidas con cada disolvente; la primera fué tomada colocando la placa en posición vertical y en la segunda, la placa tenía una inclinación de 38°. Se observó una diferencia notable en la velocidad del desarrollo solamente con el Benceno. La figura muestra que el desarrollo con éter es dos veces más rápido que el ciclohexsano o con metanol.

Tiempo con diferentes disolventes estando la placa en posición vertical.

E = éter; B = benceno; B = benceno, con la placa inclinada;
M = Metanol; y C = ciclohexano.



Aunque a menudo el desarrollo de un cromatograma requiere más de 30 min., es conveniente emplear el menor tiempo posible para reducir al mínimo la zona de difución.

FACTORES QUE INFLUYEN EN EL VALOR R_f

El valor R_f[20] se define como la relación:

$$\frac{\text{distancia recorrida por el compuesto}}{\text{distancia recorrida por el disolvente (frente)}} \times 100$$

Se multiplica por 100 para dar valores enteros.

El concepto del valor R_f no tiene aplicación en cromatografía en columnapero si en la cromatografía en papel. De la misma manera que en la cromatografía en papel, deben especificarse algunos factores antes de dar un valor determinado como R_f característico en una substancia, una vez tomados en cuenta estos factores, puede repetirse el mismo valor del R_f con una variación de 0.03.

Las variables más importantes son disolvente y el absorbente. Sin ambas explicaciones del valor R_f no tiene ningún significado. Los factores que influyen en la elección del disolvente y el absorbente ya han sido discutidos.

En el comercio pueden obtenerse absorbentes comunes de composición y tamaño de particulas convenientes.

Otros factores que pueden influir en la variación del valor R_f son los siguientes:

a). - Temperatura.

En el marcado, contrastan con los efectos de la temperatura en la cromatografía en papel, en la cromatografía en la placa delgada, pequeñas variaciones en la temperatura durante el desarrollo del cromatograma , las que no tiene importancia. Algunos autores han sugerido, que los valores R dependen de gran parte de la temperatura, sin embargo, la mayor parte de los investigadores han encontrado resultados contrarios Se ha demostrado que no hay variación del valor R_f trabajando a una temperatura de 4 y 28°, 50-70°C La temperatura es un factor importante de la resolución de hidrocarburos no saturados; en este caso se han obtenido mejores resultados a 4° que a 28°C

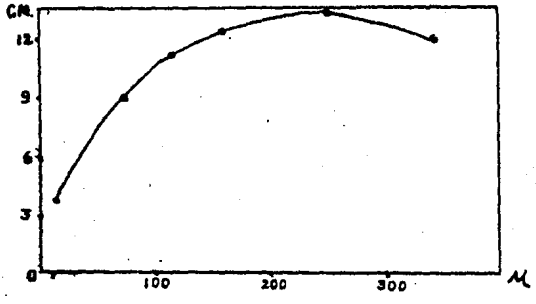
Las diferencias de opinión acerca de los factores de la temperatura, pueden tener origen en el disolvente empleado para el desarrollo. Los factores que afirman la importancia de la temperatura usaron fracciones de la destilación del petróleo que hierven en intervalos amplios de temperatura.

Con los cambios de temperatura la composición del líquido sufre cambios, debido a la vaporización. En este acto, es más notorio, si el tanque de desarrollo no está herméticamente cerrado.

b). - Espesor de la película

La observación de que la distancia recorrida por el disolvente (frente) en un tiempo dado, depende del espesor de la película (como se muestra en la gráfica siguiente), sugirió a Stahl y colaboradores que los valores R podían también depender del espesor de la película.

Influencia del espesor de la película, en un sistema de disolventes compuesto por hexano/acetato de etilo (9:1).



Seher conformó que el valor R depende del espesor de la película y que cuando este sea mayor de 200 el efecto disminuye lo suficiente para no tomarlo en cuenta. Sin embargo, el espesor más comúnmente usado y más recomendable es el de 250.

Para determinar exactamente el espesor final de la capa absorbente es necesario que la película esté completamente seca, pudiendo utilizar una aguja sencible adaptada a un microscopio para hacer la medida.

c). - Distancia recorrida por el compuesto.

Usando chamazuleno, el alcohól y el ácido correspondiente, como una muestra de prueba, hexano/acetato de etilo (9:I) como disolvente, y una película de espesor mediano (120), Stahl (23) y colaboradores, demostraron que los valores R de los compuestos dependen ligeramente de la distancia que han recorrido.

Aunque en condiciones normales, las variaciones no son grandes, debe especificarse la distancia recorrida por el disolvente.

d). - Atmósfera del tanque de desarrollo.

Es lógico que cuando la atmósfera del tanque no está saturada, el disolvente asciende sobre la capa del absorbente y se evapora, por lo tanto, se necesitará mayor cantidad de disolvente para que el frente llegue al punto determinado. Lo anterior significa que los valores R_f son influenciados por el grado de saturación de la atmósfera y el efecto aumentará al disminuir aquél. Algunas veces, el frente del disolvente es cóncavo avanzando más lentamente en el centro que en las orillas. Al principio se pensó que esto era consecuencia de las variaciones en el contenido de agua de la capa absorbente o de un defecto de los cantos, pero ahora se sabe que es causado por el disolvente.

El efecto ha sido observado solamente con mezcla de disolvente y se debe a que la atmósfera del tanque no está saturada con respecto a cada componente de la mezcla disolvente.

Cualquiera que sea la composición del disolvente, no pueden obtenerse valores de R_f reproducibles, si no está saturada con respecto del tanque.

Un tanque de cierre hermético requiere aproximadamente una hora para su saturación, pero si se cubren los lados del tanque con papel filtro mojado en el disolvente, la atmósfera queda saturada aproximadamente en 15 min. En la literatura alemana, este tipo de tanque se conoce como tanque supersaturado.

Desde luego es esencial que el tanque esté adecuadamente cerrado.

Si se corren simultaneamente varias cromatoplacas en el mismo tanque, Brenner y Niederwieser recomiendan que se coloque una hoja de papel filtro impregnado de disolvente en el reverso de cada placa.

Se ha observado que una vez alcanzada la saturación, se puede alterar el equilibrio cuando se abre el tanque para meter la cromatoplaca, esto puede evitarse colocando la cromatoplaca cargada sobre un apoyo elevado en el fondo del tanque (por ejemplo, dos varillas de vidrio paralelas). Se agrega una pequeña cantidad de disolvente, no suficiente para alcanzar el fondo de la placa y el sistema alcanza rapidamente el equilibrio. El volúmen de disolvente necesario para desarrollar el cromatograma se introduce a través de un pequeño orificio o por una esquina del tanque.

Se ha visto que en el desarrollo de un cromatograma, la zona cercana al frente no contiene tanto disolvente como el área que está cerca del origen. El efecto se observa en cualquier tiempo aún cuando la atmósfera del tanque de desarrollo esfe aparentemente saturada y su existencia tenga una relación importante sobre el método de determinación de valores R_f .

Es muy importante un cierre hermético del tanque de desarrollo.

Normalmente el punto hasta el cual se dejará avanzar el disolvente se marca con un corte transversal en la película antes de desarrollar el cromatograma. El disolvente no debe pasar de este punto que generalmente se encuentra a 10 cm., del origen.

Para medir los valores R_f ., el cromatograma se observa cuidadosamente y se retira del tanque de desarrollo en el momento en que el disolvente llega al frente. Cuando se deja el cromatograma en el tanque, contínua el desarrollo hasta que el absorbente está completamente saturado, en consecuencia, este factor es una importante fuente de error en la medida de los R_f , siendo apreciablemente superior cuando hay un sobredesarrollo.

e). - Agente aglutinante.

Stahls y colaboradores encontraron que el aglutinante no es un factor importante en las variaciones R_f cuando el absorbente es la gel de sílice. Sin embargo, con la alúmina, la presencia de almidón tiene un considerable efecto en las propieades del absorbente.

f). - Contenido de agua del absorbente.

Se ha encontrado que en el caso de películas de alúmina de tamaño de partículas común, el contenido de agua afecta la actividad del absorbente y por lo tanto los valores R_f (6).

En las películas hechas con gel de sílice, las variaciones pequeñas en el contenido de agua no tienen importancia.(23)

Para la preparación de capas de gel de sílice de actividad de absorbente constante, Seher recomienda lavar la película activada con cloroformo y secarla durante 20 min al vacio.

g). - Peso

Si se excede el peso óptimo por gota ($< 10^{-4}$ g) esta se extiende y los valores R_f , aumentan progresivamente. Los trabajos realizados con derivados de ácidos grasos han sido llevados a cabo con pesos de 50-200 γg por gota y los investigadores no han obtenido valores R constantes.

Es lógico que al expresar los valores R_f de un compuesto, es necesario especificar las condiciones siguientes: 1) absorbente, 2), disolvente 3), espesor de la película, 4) peso, 5) precauciones tomadas para segurarse que la atmósfera en el tanque esté saturada, 6) distancia recorrida por el disolvente y la definición de frente del disolvente.

Stahl (23) piensa que aún esta información puede no ser suficiente y presentarse variaciones en la actividad del absorbente y sugiere que en cada cromatograma se corra una muestra de una mezcla tipo, solo si los valores R de los componentes de dicha mezcla se encuentran entre cierta distancia, puede considerarse satisfactorio el cromatograma. Estos límites no pueden por supuesto, ser especificados en términos generales por que dependerán del disolvente usado en el desarrollo.

Estas precauciones se requieren solamente para medidas muy exactas.

Aunque generalmente se supone que los valores R_f obtenidos en la cromatografía en la placa delgada no son reproducibles como los valores obtenidos en la cromatografía en papel, Brenner y colaboradores muestran que pueden obtenerse buenos resultados

Cromatografía en placa delgada.

Desarrollo ascendente	0.016
Desarrollo horizontal	0.014

Cromatografía en papel

Desarrollo descendente	0.018
Desarrollo radial	0.014

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE MEXICO
VETERINARIA

Métodos para localizar compuestos incoloros

Después de que se ha desarrollado el cromatograma hasta el límite previsto, se retira la placa del recipiente y se deja evaporar a temperatura ambiente, el disolvente retenido en la película bastando generalmente, para ello un período aproximado de tres minutos y siendo la falta de olor un indicio satisfactorio de su ausencia. Si los compuestos que se han cromatografiado son coloridos, se pueden observar sus posiciones inmediatamente; si no lo son, se necesita determinarlas por algún proceso conveniente de cromagénesis. Algunas veces en particular cuando la placa está sobre cargada, los compuestos incoloros se pueden presentar como manchas blancas. En el primer caso, los procesos útiles para revelar compuestos incoloros, se pueden dividir en tres secciones: en primer lugar, hay substancias susceptibles de localización cuando se examinan las placas bajo luz ultravioleta filtrada; por este método la observación de los compuestos fluorescentes es inmediata, mientras que aquellos que absorben energía ultravioleta se pueden encontrar si se han agregado previamente a la placa agentes fluorescentes. En segundo término, se puede rociar la placa con un reactivo que forme derivados coloridos de las substancias presentes, y por último, los compuestos se pueden localizar por sublimación sobre una superficie fría de vidrio.

a). - Substancias luminiscentes en el absorbente.

Sease (24) encontró que la inclusión de sulfuro de zinc y silicato de zinc en el absorbente, revela las posiciones de compuestos que absorben entre 239 y 390 m, ya que estos extinguen la fluorescencia debida a dichos agentes inorgánicos, luminscentes, la columna se irradia con luz ultravioleta. La fuente de rayos ultravioleta en espectro continuo, es ideal, necesitándose en la práctica, dos lámparas ultravioleta de fácil adquisición en el comercio. Una de ellas emite su máxima energía en la región de onda corta (255 mμ), mientras que la otra lo hacen en la zona de onda larga (365mμ), Kirchner y colaboradores adaptaron la técnica para cromatografía en placa delgada al incorporar 0.15 g de silicato de zinc y 0.15 g de sulfuro doble de zinc y cadmio à 20 g de absorbente. Esta técnica se conoce también como "método de la placa fluorescente y el mecanismo por el cual se localiza en él las sustancias, puede explicarse de la siguiente manera: cualquier compuesto que se encuentre encima del agente luminiscente mezclado al absorbente, disminuirá la intensidad de la radiación ultravioleta incidente sobre la placa en consecuencia, la intensidad de la fluorescencia disminuirá por lo que las zonas de material se presentarán como manchas obscuras sobre un fondo luminoso. Si el compuesto es escencialmente transparente a la radiación ultravioleta, la extinción es baja y la diferencia en intensidad entre la zona y el fondo puede ser absorbente y tiene un máximo de absorción en la región ultravioleta, al irradiarlo con energía en esta longitud de onda, se observará un obscurecimiento máximo de la zona. La absorción máxima de los compuestos orgañicos varía entre los límites de todo el espectro ultravioleta, por lo que se puede obtener información adicional acerca de la naturaleza del compuesto y de ser posible determinar la longitud de onda de la extinción máxima.

Un proceso semejante, debido a Stahl consistió en incorporar un agente fluorescente orgánico a la película de absorbente lo cual llevó a cabo, haciendo la mezcla con una solución acuosa, al 0.04% de fluorescencia sódica, en vez de utilizar agua pura en su composición. Las placas resultantes de color amarillo pálido adquieren una intensa fluorescencia amarilla verdosa a la luz ultravioleta con áreas obscuras en los lugares donde se encuentran los compuestos. La adición de fluoresceína en la gel de sílice dá resultados inferiores a aquellos obtenidos tanto por el rociado posterior de fluoresceína sobre el cromatograma desarrollado (véase el inciso siguiente, como por el uso de agentes fluorescentes inorgánicos. En el comercio, se pueden adquirir absorbentes que contienen indicadores fluorescentes (Fluka).

b). - Aspersión de reactivos.

Las posiciones ocupadas por compuestos incoloros se determinan con suma facilidad mediante la aspersión de un reactivo adecuado sobre la superficie de la placa. En caso de conocer la constitución química de las substancias cromatografíadas, se pueden revelar las placas con un reactivo específico; por ejemplo, para las cetonas, con una solución alcohólica del clor-

hidrato de la 2, 4 dimitrofenil hidracina. Si por el contrario, se desconoce la naturaleza de los compuestos debe usarse un reactivo no específico. En ningún caso debe reaccionar el reactivo usado con la película de absorbente de manera que enmascare las reacciones de las substancias buscadas. Con películas totalmente inorgánicas, tales como "Silicagel G", casi cualquier reactivo puede resultar apropiado, pero si se ha usado almidón como aglutinante, se limita el campo de acción. Cualquiera de los reactivos para cromatografía en papel se puede adaptar a la cromatografía sobre placa delgada. En la discusión que sigue sobre los reactivos, se supondrá que la película está hecha totalmente con materiales inorgánicos.

Aunque el proposito de tratar el cromatograma con un reactivo cromógeno es el de localizar los compuestos que se encuentran sobre de él, no es esta toda la información susceptible de recibirse. Muchos compuestos forman derivados coloridos transitorios de un tono distinto al que resulta finalmente. En adición a estas tonalidades transitorias, las cuales se pueden observar mejor inmediatamente después de que la placa ha sido rociada y cuidadosemente calentada, se tiene como nueva característica útil, la velocidad a la que el color aparece.

El atomizador debe ser capáz de producir una aspersión muy fina, ya que un rocío grueso puede ser la causa del corrimiento en franjas del cromatograma debido a un efecto de elución con la solución rociada, é incluso puede desprender el absorbente del vidrio. Se debe rociar suficiente solución sobre la película, de modo que esta queda perfectamente humedecida pero poniendo cuidado en no mojarla demasiado. Algunos de los reactivos más estables de pueden conseguir actualmente envasados en forma aerosol.

Reactivos generales.

Como reactivos generales se tienen; fluoresceína-bromo (se rocía la placa con solución acuosa al 0. 05% de fluoresceína y aún humeda se expone al contacto de vapores de bromo, la fluorescencia se transforma, entonces en eosina, no fluorescente, excepto en los lugares donde se encuentran los compuestos, esto se debe a que suele ser hidrófobicos, haciendo la reacción menos eficiente por falta del medio adecuado y ayudando el que sean insaturados, pues tendrán mayor avidez por el bromo que la fluoresceína, por este procedimiento quedan manchas verdes sobre fondo rojo obscuro, a la luz ultravioleta, ácido sulfúrico, tricloruro de antimonio (Solución saturada cloroformo libre de alcohól y agua; se aspereja en frio o en caliente, se cal ienta y se deja enfriar obteniéndose distintas coloraciones y florescencias; la colestanona se hace visible al exponer la placa a vapores de cloro por algunos segundos, después del tratamiento anterior), Stahl recomienda una mezcla de sulfato cérico disuelto en agua y ácido sulfúrico Q, P., clouro-moldato de sodio, yodo, agua (los compuestos polares aparecen como manchas translúcidas en fondo opaco al aspejar con una pequeña cantidad de agua: si se humedece más la placa, toda aquella queda translúcida, escepto los compuestos poco plares, que quedan oomo manchas opacas).

Reactivos especiales

Se han descrito varios reactivos que dan buenos resultados con un solo grupo de compuestos en términos generales, sin embargo, son pocos los reactivos que forman derivados coloridos exclusivamente con los miembros de una serie homóloga. Así que sería más acertado referirse a estos reactivos como "reactivos de aplicación limitada". Casi cualquier reactivo usado en la cromatografía en papel puede ser usado en la cromatografía en placa delgada y así se tienen reactivos para ácidos alcaloides, animas, animoácidos, cetonas y aldehidos, peróxidos, azúcares, etc.

Acido sulfúrico.

Cuando se aspereja la placa con ácido sulfúrico concentrado, se calienta a unos 200°C durante 10 minutos, se colabonizan casi todos los compuestos orgánicos, haciéndose visibles como manchas de color negro, café o gris sobre fondo blanco. Con este método, se pueden relevar hasta los hidrocarburos saturados de cadena larga y los ácidos grasos. Kirchner y colaboradores y Demole, sugieren para mejorar los resultados, la adición de 20-50% de ácido nítrico concentrado. Algunos compuestos, entre ellos los esteroides, reaccionan con ácidos sulfúricos concentrados frios, para formar derivados coloridos de tonos brillantes que pronto se obscurecen hasta llegar a un color café terroso, usando ácido sulfúrico al 50% en lugar de ácido sulfúrico concentrado; se puede prolongar el período durante el cual es posible observar estos colores transitorios.

Ninhidrina.

Cuando se calienta la ninhidrina, en presencia de un alfa-aminoácido de péptidos o de proteínas, que contiene por lo menos un grupo amígeno y un grupo carboxílico libre, se forma un compuesto de color azul. Esta reacción colorida se usa en el análisis cromatográfico para identificar a estos compuestos

La prolina y la hidroxiprolina que contienen en su molécula al grupo imígeno (-NH-) en vez del grupo amígeno, forman con la ninhidrina algunos productos de condensación que tienen un color rojo que rapidamente se torna amarillo. El color rojo puede ser empleado para la determinación colorimétrica específica de estos dos aminoácidos. Tal cosa se logra deteniendo la reacción con la nihidrina después de que se han formado los compuestos de color rojo, por medio de su extracción con el benceno, ya que los otros compuestos de ninhidrina aminoácidos son insolubles en este solvente.

Se cree que la reacción con la ninhidrina es más específica que la reacción con el ácido nitroso y se usa en la actualidad para medir el nitrógeno del grupo amígeno alfa en la sangre, en la orina y en otros líquidos (Hamilton, 1943). Cuando se calientan aminoácidos con ninhidrina, se libera bióxido de carbono de cualquier grupo carboxilo adyacente a un grupo amígeno libre. El bióxido de carbono liberado se mide cuantitativamente en el aparato manómetro de Van Slyke y Neill.

c). - Sublimación.

Cuando se calienta un cromatograma que ha sido asperjado con algún reactivo cromógeno, algunos compuestos subliman tan facilmente que no permanecen en la película el tiempo suficiente para formar derivados coloridos, o si lo hacen la reacción es muy débil. Baehler, ha usado la volatilidad relativa de tales compuestos como ayuda para determinar su localización. El cromatograma desarrollado se cubre con una segunda placa de vidrio que se mantiene a una distancia de aproximadamente 1 mm, de la primera por medio de listones o bandas de separación. Cuando se calienta la placa inferior, un bloque metálico y se enfría la superior, mediante un bloque de aluminio enfriado por agua que se coloca encima de ella, los compuestos subliman en la superficie fria y se pueden observar facilmente en cantidades hasta de 0.5 g. Es necesario controlar la temperatura de la película, pues la sublimación no se lleva a cabo de ser esta demasiado baja, y si es demasiado alta, las manchas sublimadas en la superficie fria se difunden. De este modo la temperatura óptima no puede llevarse a cabo cuantitativamente. Como ayuda para controlar la temperatura, el bloque de calentamiento tiene un orificio en el que se inserta un termómetro.

d). - Sensibilidad.

La cantidad mínima de un compuesto que se puede localizar sobre una placa delgada, depende de la naturaleza del compuesto y del reactivo. Utilizando una combinación aparejada, la sensibilidad es por lo menos de 1γ g, y generalmente mejor. Por ejemplo, la cantidad mínima de colesterol que puede ser inequívocamente localizado con ácido sulfúrico, es de 0.08 g. Con combinaciones menos adecuadas la cantidad mínima de material que puede localizarse aumenta (1→ 10→ 20γ g. y con reactivos totalmente inapropiados puede ser imposible la localización de un compuesto en una placa, sin importar cúan grande sea la cantidad. Para compuestos en una placa, sin importar cuan grande sea la cantidad. Para compuestos coloridos tales como el indofenol y el Rojo sudan G, los límites de sensibilidad se encuentran también en una variación de 0.1 - 1.0γ g. El método de la placa fluorescente es bastante menos flexible. En la técnica de sublimación se obtiene la sensibilidad máxima examinando la placa sobre fondo negro con iluminación lateral; la sensibilidad es de poco menos que 1γ g.

C) DESCRIPCION DE LOS ZACATES (1-12)

GRAMA DE LA COSTA

NOMBRES COMUNES - Grama de la costa, Coastal Bermuda.

NOMBRE CIENTIFICO - Cynodon doctylen pers (Híbrido de U.S.A.)

ORIGEN - Es un híbrido que se produjo en Georgia Coastal Plain Experiment Station, Tifton, Georgia. Se obtuvo como resultado de varias cruzas entre selecciones altas de South African Bermuda y Tift Bermuda.

CARACTERISTICAS DE LA PLANTA - Este zacate es una variación de la Grama común, por lo cual las plantas son semejantes en cuanto a su forma, diferenciándose la Grama de la costa por tener más grandes sus tallos, estolones, rizomas y entrenudos. Las hojas tienen un color común. Con frecuencia su crecimiento es tan alto que se puede aprovechar para hacer heno o ensilado.

CUALIDADES DE ESTE ZACATE - La grama de la costa es superior en muchos aspectos que la Grama común, su crecimiento y producción forrajera son mayores, resisten más las temperaturas bajas, su temporada de producción es más larga, es mas resistente a la sequía y produce forrajes verdes cuando la grama común ya se ha secado.

La grama de la costa se adapta bien a suelos arcillosos, así como a los de tipo arenoso, alcalinos y ácidos. Las inundaciones temporales no lo afectan.

ADAPTACION EN MEXICO - Por su mayor resistencia a la sequía y a las inundaciones temporales, así como a los suelos de muy variada textura, es fácil su adaptación a cualquier región ganadera del país, con altitud inferior a 1800 metros y con suficiente precipitación pluvial o agua de riego, pero su habilidad productiva es mayor en climas cálidos y húmedos de las costas del país.

APROVECHAMIENTO - Este zacate se adapta bien al pastoreo por su resistencia al pisoteo del ganado, sin embargo, puede producir heno o ensilaje de buena calidad.

VALOR NUTRITIVO - Tiene una composición bien equilibrada, pues contiene de 2.3 a 3.5% de proteína y una buena proporción de minerales. Es muy apetecido por el ganado.

ZACATE GUINEA

NOMBRES COMUNES - Zacate Guinea, Zacate Privilegio

NOMBRE CIENTIFICO - Panicum maximum

ORIGEN - De Africa

CARACTERISTICAS DE LA PLANTA - Es una gramínea perenne, de gruesos macollos, sus tallos alcanzan de 1.50 a 2 m de altura. Es una planta de clima tropical y subtropical, por lo que la encontramos en Tamaulipas, Veracruz, Campeche, Tabasco, Yucatán, Oaxaca, Guerrero, Morelos, Jalisco, Nayarit, Colima, etc. Crece bien en suelos secos que no sean demasiado pobres de cualquier textura, incluso en suelos arenosos pero no en exceso.

ADAPTACION EN MEXICO - Se ha cultivado desde hace mucho tiempo, en toda la región tropical del Golfo de Mexico, donde ha permitido el establecimiento de prósperas ganaderías, aún cuando ahora se conocen algunos otros zacates con mayor rendimiento con respecto a éste, el zacate guinea crece en una forma más abundante con respecto a otros que se cultivan dentro de la misma zona.

APROVECHAMIENTO - Se puede aprovechar tanto como para el corte como para el pastoreo. Siendo bastante apetecible por el ganado.

VALOR NUTRITIVO - Varía su valor nutritivo en el transcurso del año; principalmente varía el porcentaje de proteína de 2.60 a 3%; todo esto depende de la edad de la planta, teniendo en cuenta que la fibra bruta aumenta después de la floración.

ZACATE MERKERON

NOMBRES COMUNES - Zacate elefante, Zacate gigante, Napier grass.

NOMBRE CIENTIFICO - Pennisetum merkeri

ORIGEN - El zacate Merkerón es un híbrido del zacate elefante y de otras especies del mismo género. Es originario de la zona tropical húmeda de Africa del Sur y Africa Central.

CARACTERISTICAS DE LA PLANTA - Este zacate tiene un aspecto un poco semejante al de la caña de azúcar. Es un zacate de tipo de crecimiento alto, perenne, de macollo y alcanza una altura de 3 a 4 metros, tiene tallos gruesos, jugosos y hojas grandes de 4 a 5 cm de ancho. La recuperación después de cada corte es muy rapída y es posible efectuar cortes de cada dos meses cuando el zacate se encuentra completamente desarrollado. La semilla no es fértil y es necesario para efectuar la siembra hacerlo por medio de material vegetativo.

ADAPTACION EN MEXICO - Este zacate se sembó en La Esperanza, Ver., aunque se adapta a todas las zonas en donde se cultiva el zacate elefante, es decir en la zona tropical húmeda, sobre terrenos húmedos y permeables. Bajo riego puede cultivarse en toda la zona cálida de México y además en toda la zona cálida semi-inundada se puede cultivar de temporal, pero no hay producción en la temporada de sequía.

APROVECHAMIENTO - Se puede aprovechar tanto para el corte como para el pastoreo convenientemente picado, dando un ensilaje muy apetecido por el ganado y de alto valor nutritivo.

VALOR NUTRITIVO - Aunque varía mucho el valor nutritivo de este zacate, en el transcurso del año, se considera que es excelente cuando se aprovecha en la buena epoca. El contenido de proteínas crudas puede variar, para el forraje verde de 1.5 a 3% según la fertilidad de lo suelos, su valor nutritivo es mayor al del maíz forrajero. Este zacate es apetecido por toda clase de ganado. Para el bovino, se obtiene una buena producción de carne y leche.

ZACATE PANGOLA

NOMBRES COMUNES - Zacate Pangola o Pangola grass

NOMBRE CIENTIFICO - Digitaria decumbens stent.

ORIGEN - Es un zacate originario de la zona tropical perenne de crecimiento bajo y rápido que invade el suelo con sus estolones; la vegetación foliacea es muy densa sobre los tallos y los estolones que crecen hasta 50 cm de altura, cuando florece; las semillas generalmente no son fértiles.

ADAPTACION EN MEXICO - A pesar de la falta de observaciones directas, es probable que este zacate para pastoreo se adapte a la zona tropical de la costa del Golfo de México en su parte húmeda. Debe sembrarse sobre suelos negros y húmedos, pero sin exceso de agua. En la zona cálida semihúmeda, es necesario el riego para tener una producción regular. No es resistene al frio, pero soporta temporadas cortas de sequía.

APROVECHAMIENTO - Este zacate se adapta bien al pastoreo por ser muy resistente al pisoteo del ganado, sin embargo, puede proporcionar un heno de buena calidad. Para su mejor aprovechamiento, se necesita dividir el potrero en dos o cuatro lotes cercados para practicar un pastoreo rotativo, en esta forma se pueden introducir animales en gran número durante temporadas cortas. La producción de una hectarea puede alimentar uno y medio a dos animales durante todo el año.

VALOR NUTRITIVO - Con un contenido de proteínas de 2 a 3% y una buena proporción de minerales, este zacate tiene una composición bien equilibrada.

ZACATE PARA

NOMBRES COMUNES - Zacate Pará, Zacate Egipto.

NOMBRE CIENTIFICO - Panicum barbinode.

ORIGEN - Gramínea originaria de Africa, se ha sembrado en Brasil con resultados bastante buenos.

CARACTERISTICAS DE LA PLANTA - Se cultiva en clima tropical y subtropical. Sus tallos rastreros alcanzan de seis a nueve metros de longitud y una altura casi de dos metros. Es resistente a las inundaciones, pero no mucho a la sequía.

ADAPTACION EN MEXICO - Se le conoce en algunas regiones como zacate Egipto. Se cultiva en Tabasco, Chiapas, Oaxaca, Veracruz, principalmente en terrenos bajos y en terrenos o en lugares que se han llegado a inundar por varios meses.

APROVECHAMIENTO - Esta planta resiste bien el pastoreo junto con el zacate guinea; es la base de sustentación de la ganadería tropical de Mexico, en un mismo potrero se les encuentra junto a ambos zacates.
Se puede utilizar como forraje lleno de los animales lecheros y de engorda.

VALOR NUTRITIVO - Es una planta que rinde bastante y que para ganado estabulado se pueden hacer de tres a cuatro cortes al año. Su composición química varía con las épocas del año, sin embargo, tiene un composición proteínica que en término medio se puede decir que es: 2 a 2.5% de proteína.

B). - Propiedades de los Aminoácidos

Las proteínas son de extraordinaria importancia en la alimentación animal, por ser esenciales para la vida, además de carbono, hidrógeno y oxígeno, las proteínas y los demás compuestos nitrogenados de las plantas y animales contienen nitrógeno. La mayor parte de las proteínas contienen también azufre, y algunas de ellas fósforo y hierro.

Las proteínas son compuestos extraordinariamente complejos y cada molécula contiene varios miles de átomos. En las plantas y en los animales existe una gran diversidad de proteínas, que difieren unas de otras por su composición. Cada molécula de proteína está integrada por un número considerable de moleculas de aminoácidos enlazadas unas con otras. Los aminoácidos, compuestos nitrogenados son los materiales de construcción con que se edifican las proteínas. Los más sencillos son de estructura análoga a los ácidos grasos, con la diferencia de que contienen el grupo nitrogenado NH_2 llamado amino. Otros aminoácidos son de estructura mucho más compleja.

Se han identificado por lo menos 23 aminoácidos en las proteínas. Del mismo modo que las letras del alfabeto, pueden combinarse para formar innumerables palabras, la posibilidad de combinación de los aminoácidos para integrar proteínas diferentes, es casi ilimitada.

Tanto en las plantas como en los animales, no sólo el protoplasma de las células vivas, sino también el núcleo que regula la actividad de cada célula, está constituído principalmente por proteínas. En las plantas, la mayor parte de las proteínas suele estar concentrada en los órganos reproductores y en las partes en crecimiento como las hojas. En los animales están constituídos por proteínas, no solo el protoplasma sino también las paredes celulares, por lo tanto, las proteínas constituyen la mayor parte de los músculos, los órganos internos, los cartílagos y el tejido conectivo, así como la piel, el pelo, la lana, las plumas, las pezuñas y los cuernos. Las proteínas forman parte del sistema nervioso é incluso del esqueleto al que dan tenacidad y elasticidad.

Las plantas son capaces de edificar las complejas moléculas de proteínas a partir de los nitratos tomados del suelo por las raíces, para formar las proteínas, el nitrógeno se une con el carbono, el hidrógeno y el oxígeno de los azúcares y otros hidratos de carbono sencillos y generalmente con pequeñas cantidades de azufre, algunas proteínas contienen fósforo. Las plantas leguminosas utilizan directamente el nítrogeno del suelo por las bacterias existentes en los nódulos de las raíces.

En contraposición a lo que ocurre en las plantas, los animales solo pueden formar las proteínas de sus tejidos a partir de los aminoácidos que obtienen al digerir las proteinas de sus alimentos. Para que un alimento proteíco pueda ser absorbido y utilizado por el organismo animal, tiene que descomponerse en aminoácidos por la digestión.

Un hecho importante para la alimentación del ganado, es que los animales poseen una capacidad muy limitada para transformar cualquier aminoácido del que puedan disponer en exceso en otros aminoacidos necesarios para su organismo. Pueden formar algunos de los aminoácidos más sencillos a partir de otros que se hallen en exceso, aunque no son capaces de formarlos a partir de otra fuente. Por lo tanto, son indispensables para su vida y tienen que ser proporcionados en cantidades adecuadas con los alimentos

Las proteínas de ciertos alimentos contienen cantidades insuficientes de algunos de los aminoácidos que los animales necesitan. Para una nutrición satisfactoria del hombre y de los cerdos, aves y otros animales de estomago sencillo, dichos alimentos tienen que combinarse con otros que proporcionen abundantemente estos aminoácidos.

Afortunadamente, las bacterias que digieren la celulosa y otros hidratos de carbono complejos en la panza de los rumiantes, forman todos los aminoácidos a partir de otros compuestos nitrogenados. Por lo tanto, pueden completar las proteínas a partir de alimentos que no podrían ser bien utilizados por los animales de estomago sencillo. Los rumiantes digieren aquellas bacterias en lugares posteriores de su tubo digestivo. De este modo obtienen los aminoácidos que necesitan, aunque los alimentos que consuman contengan ciertos aminoácidos en cantidad que sería insuficiente para los animales de estomago sencillo. Un proceso sencillo y similar se verifica en el intestino grueso y en el ciego del caballo y en muy corto grado en el intestino grueso de otros animales.

Entre las propiedades de los aminoácidos se incluye a la ionización por la formación de "zwitterionen" o anfolitos (electrolitos anfóteros). Los aminoácidos se disocian como ácidos y como bases, dependiendo esto del pH de la solución. Si se coloca un aminoácido en solución en un campo eléctrico, sus moléculas emigrarán a uno u otro polo de acuerdo con el pH de la solución. A cierto pH el aminoácido no se comporta como ácido, ni como base y no emigra ni al ánodo ni al cátodo, a esto se le denomina "punto isoeléctrico". Las moléculas completas de proteínas también tienen un punto isoeléctrico. Habitualmente se expresa el punto isoeléctrico en términos del pH de la solución en el cual ocurre este fenómeno. Se piensa que cuando el aminoácido se encuentra en estado isoeléctrico, se halla disociado tanto como ácido y como base y no parece estar cargado electricamente debido a que sus cargas positiva y negativa son iguales. Cuando se añade ácido, al aminoácido, se comporta como base y cuando se añade álcali, se comporta como ácido.

Contenido en aminoácidos de las proteínas.

Para la determinación del contenido en aminoácidos de una proteína purificada, primero se requiere, por lo general, hidrolizarla hasta tener aminoácidos libres, esto se hace añadiendo ácido y calentándola en un tubo cerrado (la hidrólisis ácida destruye triptofano, razón por la cual se usa la hidrólisis alcalina cuando se trata de estimar este aminoácido). Se ha descrito un método enzimático para la hidrólisis completa de una proteína que emplea solo enzimas proteolíticas (Hill, 1962).

El contenido de aminoácido en el hidrolizado, puede ser medido por métodos químicos o biológicos. El análisis de algunos aminoácidos puede hacerse con pruebas químicas específicas, por ejemplo la reacción de Millon para la tirosina, pero tales métodos requieren cantidades relativamente grandes de la muestra.

En la actualidad, se usan ampliamente los PROCEDIMIENTOS CROMATOGRAFICOS para la separación y determinación de una variedad de compuestos de interés bioquímico incluyendo a los ácidos grasos, a los carbohidratos y a los aminoácidos. Estos procedimientos han sido especialmente valiosos para el análisis del contenido en aminoácidos de las proteínas.

II - MATERIAL Y METODOS DE TRABAJO.

1. - Aparato para Cromatografía en capa delgada (fina) D E S A G A

a) Aplicador ..... Figura 1

b) Marco de trabajo .. " 2

c) Placas portadoras ... " 3

d) Placas de arranque .. " 4

e) Canastilla de secado . " 5

f) Cámaras de elución .. " 6

g) Marco de aplicación . " 7

h) Pipetas serológicas ..

2. - Zacates.

a) Guinea. Panicim - Maximum

b) Grama de la costa - Cynodom-doctylon.

c) Merkerón - Pennisetum purpureum.

d) Pangola - Digitaria decumbens

e) Pará - Panicum purpuracens.

3. - Cristalería de laboratorio.

4. - Gel de Sílice para Cromatografía en capa delgada (fina)

5. - Bomba de presión y vacio.

6. - Estufa.

7. - Centrífuga

8. - Balanza analítica

9. - Potenciómetro de Bekcman

10. - Atomizador vilbis

Figura 1

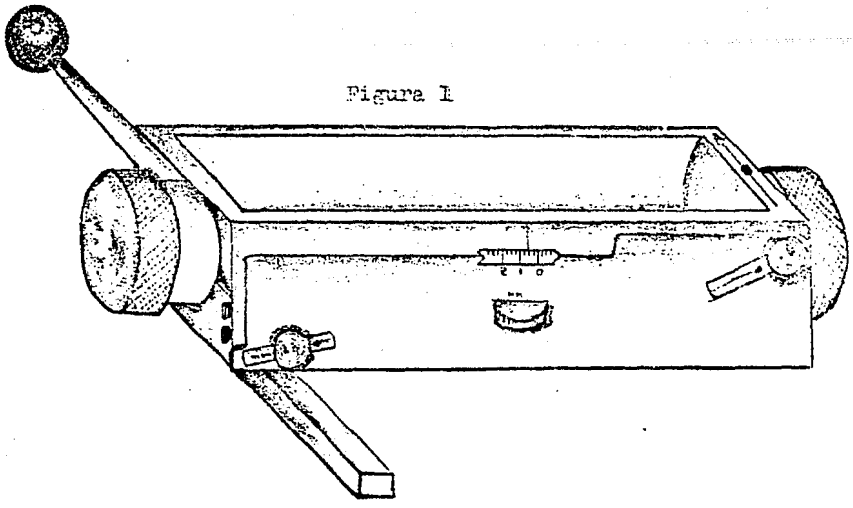


Figura 2

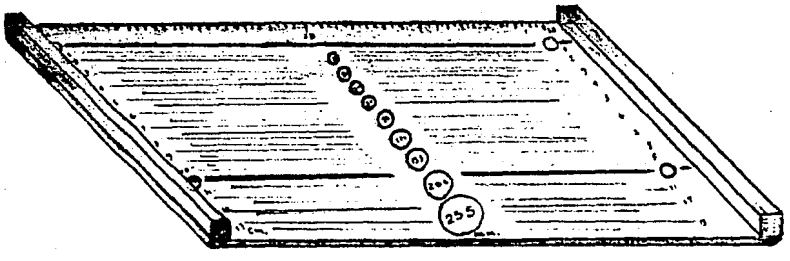


Figura 3

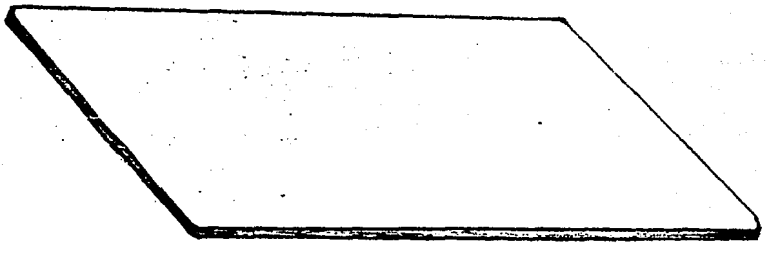
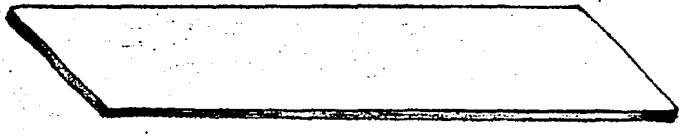


Figura 4.



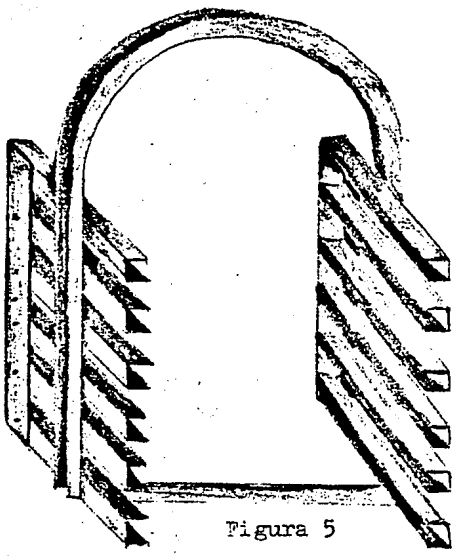


Figura 5

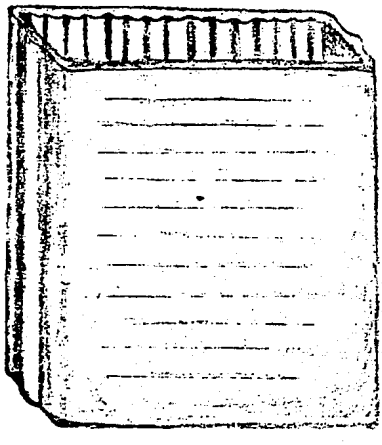


Figura 6

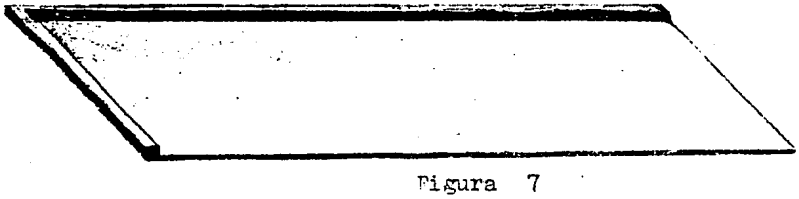


Figura 7

11. - Ampolletas de 10 ml.

12. - Tubo condensador (serpentín)

13. - Parrilla eléctrica

14. - Substancias.

a) Acido clorhídrico

b) Hidróxido de sodio.

c) Enzimas - Pepsina y Tripsina.

d) Agua destilada y carbón animal.

15. - Disolventes.

a) N. Butanol. Acido acético. Agua

(80 : 20 : 29)

b) Fenol. Agua
(75 : 25)

16. - Revelador.

a) Sol. de Ninhidrina . 01 g en 50 Ml de alcohól etílico absoluto, con 10 ml de ácido acético glacial y colidina isomera 3 Ml.

b) Sol. de Nitrato cuprico . 5 g Alcohól Etílico absoluto.

Proporciones A - 50 Ml
B - 3 Ml

17. - Aminoácidos en estado puro E. Merck Barmstadt.

a) Acido aspártico.

b) Acido Glutámico

c) Arginina

d) Alanina

e) Fenilalanina

f) Cistina

g) Glicina.

h) Histidina

i) Isoleucina

j) Leucina

k) Lisina

l) Metionina

m) Prolina

n) Serina

o) Treonína

p) Tirosina

q) Triptófano

r) Valina

METODOS

Se siguieron las técnicas para cromatografía en capa delgada (fina) a partir del hidrolizado de las proteínas de los zacates muestras; lo cual se realizó por tres métodos diferentes:

1. - Hidrólisis ácida:

a) Se pesaron 50 g. de la muestra.

b) Se depositaron en un matráz de bola de 1000 Ml de capacidad.

c) La mezcla por hidrolizar se sometió a reflujo utilizando para esto una fuente de calor (parrilla eléctrica) y un tubo en serpentín.

d) Utilizando como hidrolizante 500 Ml de ácido clorhídrico al 10%.

e) El tiempo de hidrolizado varió en un promedio de 9 a 12 horas, en el que se consideró suficiente para la hidrólisis proteíca de las muestras de zacates.

f) El contenido del hidrolizado fué filtrado para separar los residuos del zacate.

g) Se procedió a decolorar el filtrado valiéndonos de carbón animal. Siendo necesario nuevamente filtrar para separar el carbón.

h) Se concentró el hidrolizado por evaporación hasta una cantidad determinada en la que la concentración de aminoácidos fuera la adecuada para lograr la detección de los mismos.

2. - Hidrólisis alcalína: Para la elaboración de esta hidrólisis se pesaron 50 g de la muestra y depositaronse con una solución de hidróxido de sodio 5N una cantidad de 500 Ml. Siguiéndose todas las faces de la hidrólisis anterior, con la única diferencia de tiempo de hidrolizado que en este caso fué de 12 horas.

3. - Hidrólisis enzimática: a) Acida - Se empleó medio gramo de la muestra adicionada de 5 Ml de la solución preparada en la siguiente forma: con 750 mg de pepsina en 100 Ml de H CL. 10N.

b) Acalína - Se usa medio gramo de la muestra, problema adicionando 5 Ml de la solución de tripsina al 1% en 100 Ml de hidróxido de sodio 5N.

En ambas hidrólisis enzimáticas se tomaron como en las dos anteriores 50 g de muestra por 500 del hidrolizante.

DESARROLLO

1. - Preparación de placas de gel de sílice de un espesor de 250 y 500 micras; estas se realizaron valiéndonos del aplicador y de las placas portadoras. El medio absorbente se preparó pesando 5 g de gel diluídos en 10mL de agua destilada.

Se utilizaron placas portadoras de 20 x 20 cm, las cuales se colocaron sobre el marco de aplicación, generalmente el preparado se realizó en 5 placas simultáneamente ya que es el cupo del marco de aplicación, por lo tanto, se utilizaron 25 g del medio absorbente y 50 ml de agua destilada.

2. - Se probaron cromatogramas utilizando diversos solventes para seleccionar el más adecuado utilizandose como muestras soluciones de aminoácidos puros. Estos cromatogramas se corrieron en forma bidimensional.

3. - Preparación de los cromatogramas. Para ésto se prepararon previamente los tanques de elución saturándolos previamente por un tiempo de 12 horas. Una vez fraguadas las placas y secadas a la temperatura ambiente, se depositó la muestra por correr valiéndonos de una micropipeta en el ángulo inferior izquierdo de la placa de 3 cm de los bordes.

4. - Se desarrollaron cromatogramas de los distintos tipos de hidrólisis para evaluar su composición en aminoácidos.

5. - Preparación del cromatograma patrón - Para establecer el frente real de cada aminoácido se utilizaron soluciones individuales de aminoácidos puros, con una concentración de 1000 gamas.

Una vez establecido el frente real individual de cada uno de los aminoácidos puros se prepararon mezclas de estas soluciones para determinar el desplazamiento de cada uno de los componentes. Se realizaron series de 10 cromatogramas para observar las posibles variaciones de desplazamiento.

6. - Una vez establecido el patrón y seleccionada la hidrólisis conveniente, así como los disolventes adecuados, se prosigió a realizar cromatogramas de las muestras y simultáneamente se corrieron cromatogramas con aminoácidos conocidos, para lograr una determinación más exacta de los aminoácidos presentes en las muestras de zacates.

7. - La distancia recorrida por el disolvente sobre el material absorvente, fué de 15 cm tomando como punto de partida el lugar de aplicación de la muestra, ya que fué esta distancia la que dió mejores resultados.

8. - El tiempo empleado en el desarrollo de los cromatogramas fué de 11 horas ya que para la primera corriente se le dió un tiempo de 2 horas y media, siendo necesario aclarar que en el caso de esta primera corriente, la separación de los distintos aminoácidos no era completa, por lo cuál fué necesario dar una segunda corriente valiéndonos del mismo disolvente y en la misma dirección, por lo cual se empleó el doble de tiempo, más una hora de secado entreambas corrientes, dando por resultado 7 horas en el primer proceso, el tiempo invertido en el recorrido en el segundo disolvente fué aproximadamente de 4 horas, para pasar inmediatamente al revelado; acompletándose todo el proceso en un promedio de 11 horas.

9. - Revelado - Fué practicado con una solución de ninhidrina en la forma siguiente, se pesaron .01 g de ninhidrina y se disolvieron en 50 ml de alcohól etílico absoluto, junto con 10 ml de ácido acético glacial y 3 ml de colidina isómera, utilizándose para todos los patrones. En el caso de los cromatogramas de las hidrólisis muestras, se adicionó una mezcla de nitrato cúprico en alcohól absoluto en la proporción de .5 g en 50 ml y de éstas se tomó 3 ml para mezclarla con la primera. La razón de utilizar la solución de nitrato cúprico en las muestras fué para dar un mayor contraste en los colores de los aminoácidos encontrados en la hidrólisis protéica de los zacates.

10. - Se hizo el análisis químico inmediato de todas las muestras de los zacates para evaluar el porcenta je proteíco de cada uno y en esta forma comparar su contenido cualitativo en aminoácidos.

11. - Como parte complementaria para su valoración bromatológica se practicó el análisis químico inmediato de cada una de las muestras, para determinar su contenido en calcio y fósforo.

III - RESULTADOS.

Los resultados obtenidos en el desarrollo del presente trabajo, se resumen en los cuadros 1 y 2. En ellos están anotadas las relaciones encontradas en los dos diferentes disolventes utilizados en los cromatogramas. Partiendo de aminoácidos puros, cuyo patrón se estableció, se prepararon soluciones de 1000 gamas/ml en una cantidad de aplicación de .01 ml equivalente a 10 gamas de cada aminoácido, utilizando en la primera corriente (R_{f1}) N-Butanol-ácido acético-agua (80:20:20) y en la segunda corriente (R_{f2}) fenol-agua (75:25). Se enumeraron las relaciones de los aminoácidos investigados por cromatografía de las hidrólisis muestras en relación a las existentes en el patrón.

Al realizar la hidrólisis de cada uno de los zacates se pudo comprobar que se obtenían mejores resultados en la hidrólisis ácida de 9 horas y unicamente se incluyeron cromatogramas así obtenidos. Como lo mencionan trabajos de tesis realizados por el método de cromatografía en papel (8-16-20-25), los resultados de hidrólisis alcalina son imprecisos, por este método en Gel de Sílice, el desplazamiento de los diferentes aminoácidos encontrados resultaron manchas mal definidas por lo que no se pudo establecer su Rf, no pudiéndose corregir ni aún haciendo series de placas para buscar una mayor separación. En la hidrólisis enzimática, por los métodos tanto ácido como alcalino, no se vió presencia de aminoácidos al revelado.

En el cuadro 3, se dá el cromatograma patrón con la localización del aminoácido por su nombre, dando los frentes reales en el margen derecho. Se adjunta por cada cromatograma la representación de la placa, en la que se dan los puntos de cada aminoácido y los cuales se numeran para una mejor explicación, la dirección de la acción de los diferentes disolventes se indica en cada uno de los cromatogramas. Se da el cromatograma original del desplazamiento de cada uno de los aminoácidos correspondientes de la hidrólisis de los zacates, los cuales se indican por el nombre en el ángulo superior derecho, cuadros 4 al 8.

En el cuadro 9, se resumen los datos obtenidos de los análisis bromatológicos realizados en los zacates.

Los resultados obtenidos en esta investigación, nos indican claramente el contenido en aminoácidos de las muestras, el cual difiere un poco, como se puede observar en los cuadros generales 1 y 2. Las variaciones que se notan fueron mínimas por el sistema de interpretación de patrón con respecto a la muestra. Podemos ver también, claramente la presencia constante de determinados aminoácidos encontrados en las diferentes hidrólisis de los zacates, entre ellos tenemos: Ac. glutámico (2), alanina (4), cistina (6), prolina (13), así como la ausencia de algunos como, la isoleucina (9), leucina (10) y treonina (15).

Las anotaciones son resultados promedio de cinco hidrólisis de cada uno de los zacates con sus cromatogramas correspondientes.

Revelador: Sol. Ninhidrina .01 g. en 50 Ml. de alcohol Etílico absoluto
10Ml. de ácido acético. 3ml. de colidina isómera.

Rfl .- Butanol. Ac.acético. agua. Temperatura ambiental. Distancia recorrida 15 Cms.
80 : 20 : 20

Tiempo de saturación: 12 horas. Tiempo de desarrollo 11 horas

CUADRO No. 1

Amino Ácidos Puros		Patrón	Guinea	Grama	Berkemón	Pangola	Pará
1	Ac.Aspártico	28.6	———	28.3	28.4	28.4	———
2	Ac. Glutámico	53.3	53.4	53.1	53.3	53.1	53.2
3	Arginina	34.6	34.8	———	34.6	———	34.8
4	Alanina	59.3	59.3	59.0	59.6	58.9	59.0
5	Fenilalanina	68.6	68.8	68.7	———	68.7	68.5
6	Cistina	15.3	15.1	15.2	15.0	15.2	15.0
7	Glicina	41.3	———	41.0	40.8	41.0	41.0
8	Histidina	20.0	———	19.8	20.3	20.0	20.0
9	Isoleucina	58.0	———	57.8	———	———	———
10	Leucina	64.6	———	———	———	64.2	64.5
11	Lisina	49.3	49.5	49.2	49.2	49.4	———
12	Metionina	70.0	70.2	———	70.1	———	———
13	Prolina	33.3	33.4	33.3	33.5	33.7	33.3
14	Serina	38.6	38.8	38.6	38.8	———	38.5
15	Treonina	56.6	———	———	———	———	56.8
16	Tirosina	70.6	70.5	———	70.4	70.0	70.6
17	Triptófano	72.0	72.1	———	———	———	72.0
18	Valina	66.0	66.0	65.7	66.0		———

Cuadro I.

Revelador: Sol. Ninhidrina. 0lg. en 50ML. de alcohol Etílico absoluto
10Ml. de ácido acético. 3Ml. de colidina isómera.

Temperatura ambiental. Distancia recorrida 15 Cms.

Rf2.- Fenol 75: 25 agua.

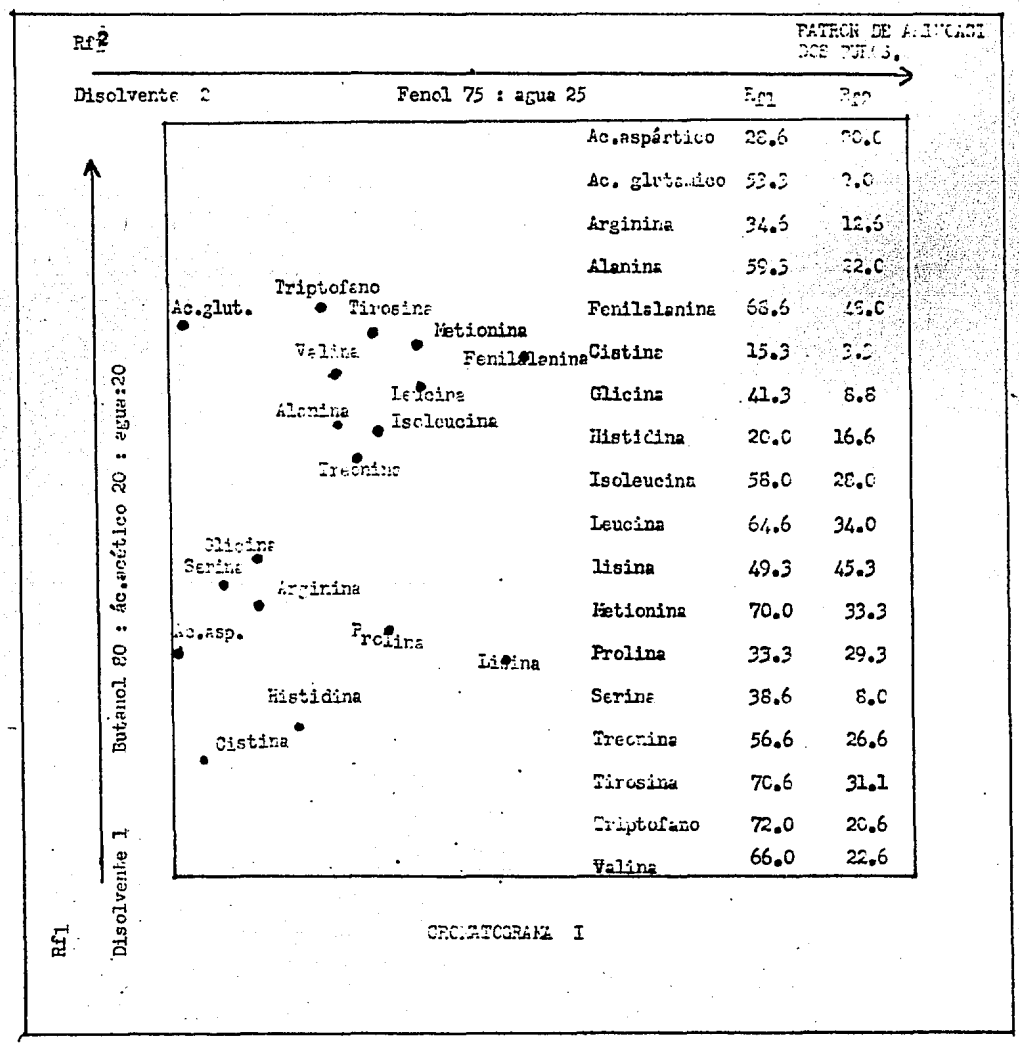
Tiempo de saturación: 12 horas. Tiempo de desarrollo: 11 horas.

CUADRO No. 2

Ac. aminados puros		Patrón	Guinea	Grano	Merkerón	Pangola	Para'
1	Ac. Aspártico	20.0	———	20.2	20.2	20.0	———
2	Ac. Glutamico	02.0	2.10	2.30	2.10	02.0	02.1
3	Arginina	12.6	12.9	———	12.6	———	12.5
4	Alanina	22.0	22.1	22.0	22.4	22.0	21.0
5	Fenilalanina	48.0	47.8	47.6	———	47.7	48.5
6	Cistina	03.3	03.3	03.3	03.3	03.3	03.3
7	Glicina	08.8	———	08.8	08.9	08.8	08.8
8	Histidina	16.6	———	16.6	16.8	16.6	16.6
9	Isoleucina	28.0	———	28.0	———	———	———
10	Leucina	34.0	———	———	———	33.7	34.2
11	Lisina	45.3	45.0	45.1	45.3	44.8	———
12	Metionina	33.3	33.0	———	33.1	———	———
13	Prolina	29.3	29.2	29.4	29.0	28.8	29.6
14	Serina	08.8	09.0	08.1	08.2	———	08.0
15	Treonina	26.6	———	———	———	———	26.4
16	Tirosina	31.3	31.1	———	31.1	30.8	31.4
17	Triptofano	20.6	20.2	———	———	———	20.1
18	Valina	22.6	22.4	22.2	22.6	21.8	———

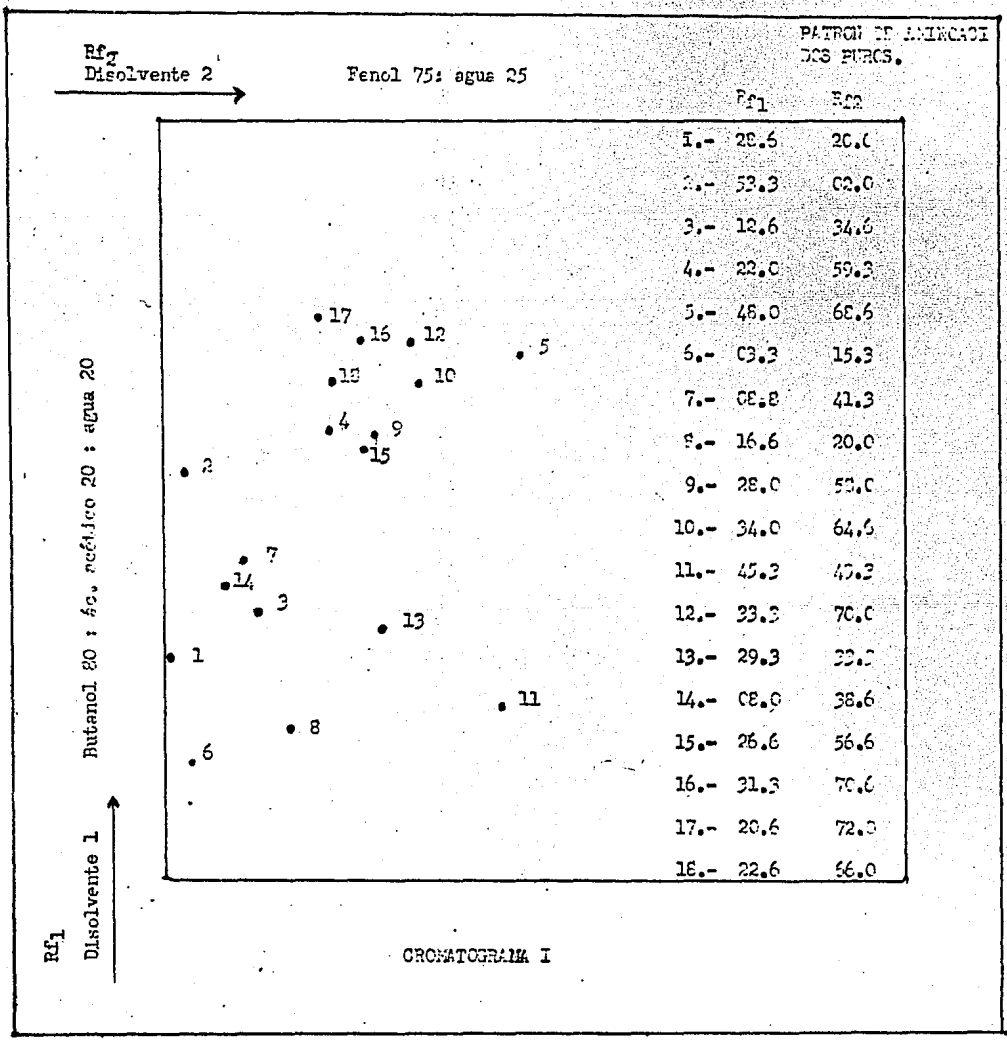
Cuadro 2 .

Temperatura ambiental
Tiempo de saturación : 12 horas
Tiempo de desarrollo : 11 horas
Distancia recorrida : 15 Cms.
Reveladores: A).- 50 Ml. de solución de ninhidrina .01 g. en 50 Ml de alcohol etílico absoluto con 10 Ml. de ácido acético glacial y 3 Ml. de colidina isómera. A).- 50 Ml.
B).- Nitrato cúprico .5 g en alcohol etílico 50Ml. B).- 3 Ml.



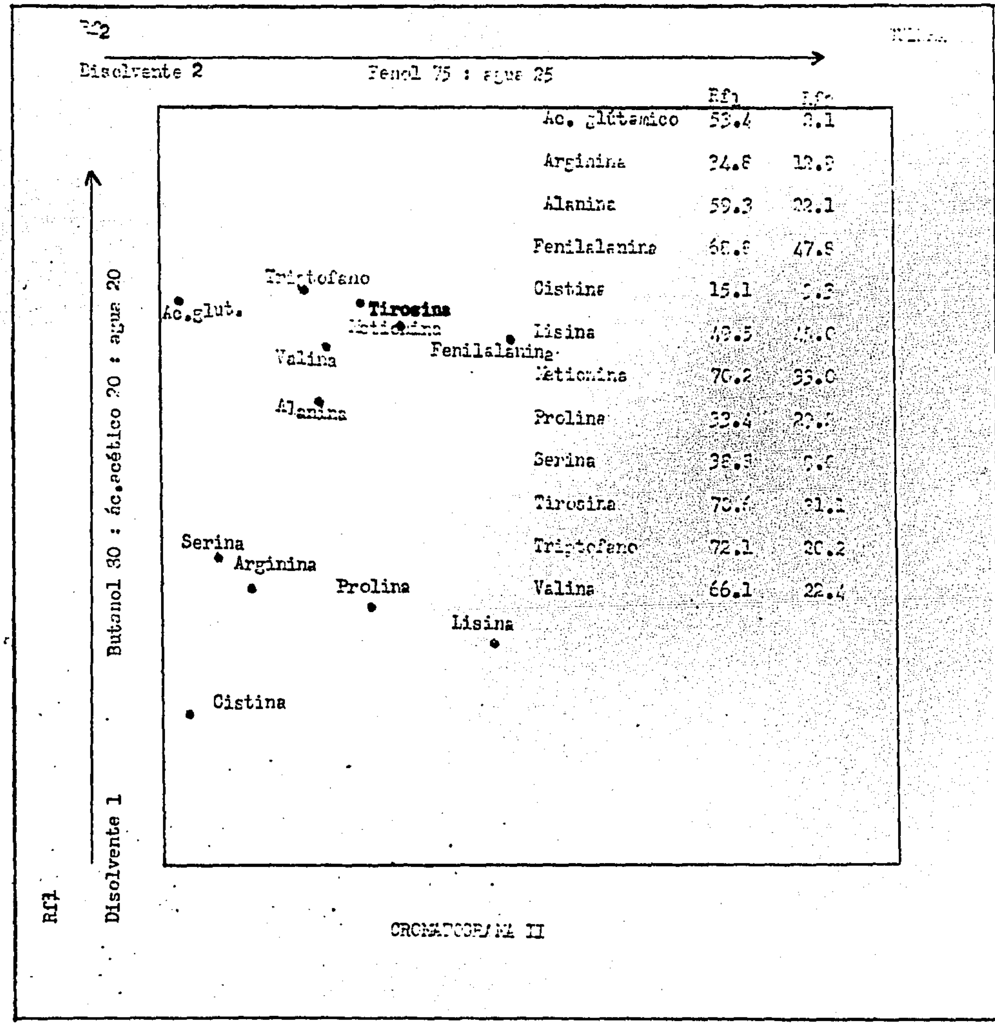
CROMATOGRAMA I

Temperatura ambiental
Tiempo de saturación : 12 horas .
Distancia recorrida : 15 Cms.
Tiempo de desarrollo : 11 horas.
Revelador : A).- 50 Ml. de solución de ninhidrina ,01 g. en 50Ml de alcohol etílico absoluto con 10Ml.de ácido acético glacial y 3Ml.de colidina isómera. A).- 50 Ml.
B).- Nitrato cúprico ,5 g en alcohol etílico 50Ml. B).- 3Ml.



CROMATOGRAMA I

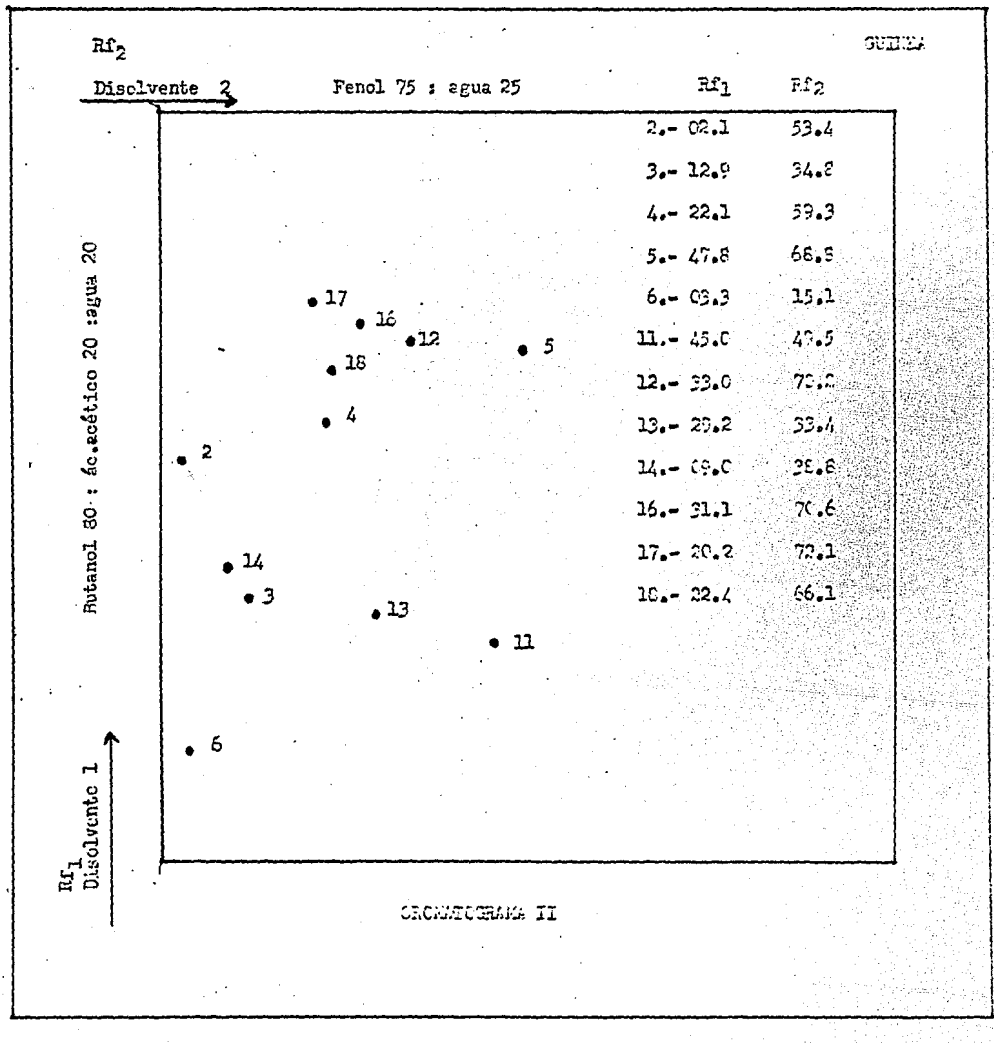
Temperatura [illegible]
[illegible] de saturación : 12 horas.
Tiempo de desarrollo : 11 horas
Distancia recorrida : 35 Cms.
Revelador : A).- 50 Ml. de [illegible] .01 g.en 50Ml de al alcohol etílico absoluto con 10 Ml.de ácido acético glacial y 3Ml. de colidina [illegible]. A).- 50 Ml.
B).- Nitrato cúprico .5 [illegible] alcohol etílico 50 Ml. B).- 3Ml.



	Rf1	Rf2
Ac. glútamico	53.4	[illegible].1
Arginina	24.8	12.[illegible]
Alanina	59.3	22.1
Fenilalanina	68.[illegible]	47.8
Cistina	15.1	[illegible]
Lisina	49.5	[illegible]
Metionina	70.2	33.0
Prolina	33.4	[illegible]
Serina	38.3	[illegible]
Tirosina	73.[illegible]	[illegible]
Triptofano	72.1	20.2
Valina	66.1	22.4

CROMATOGRAMA II

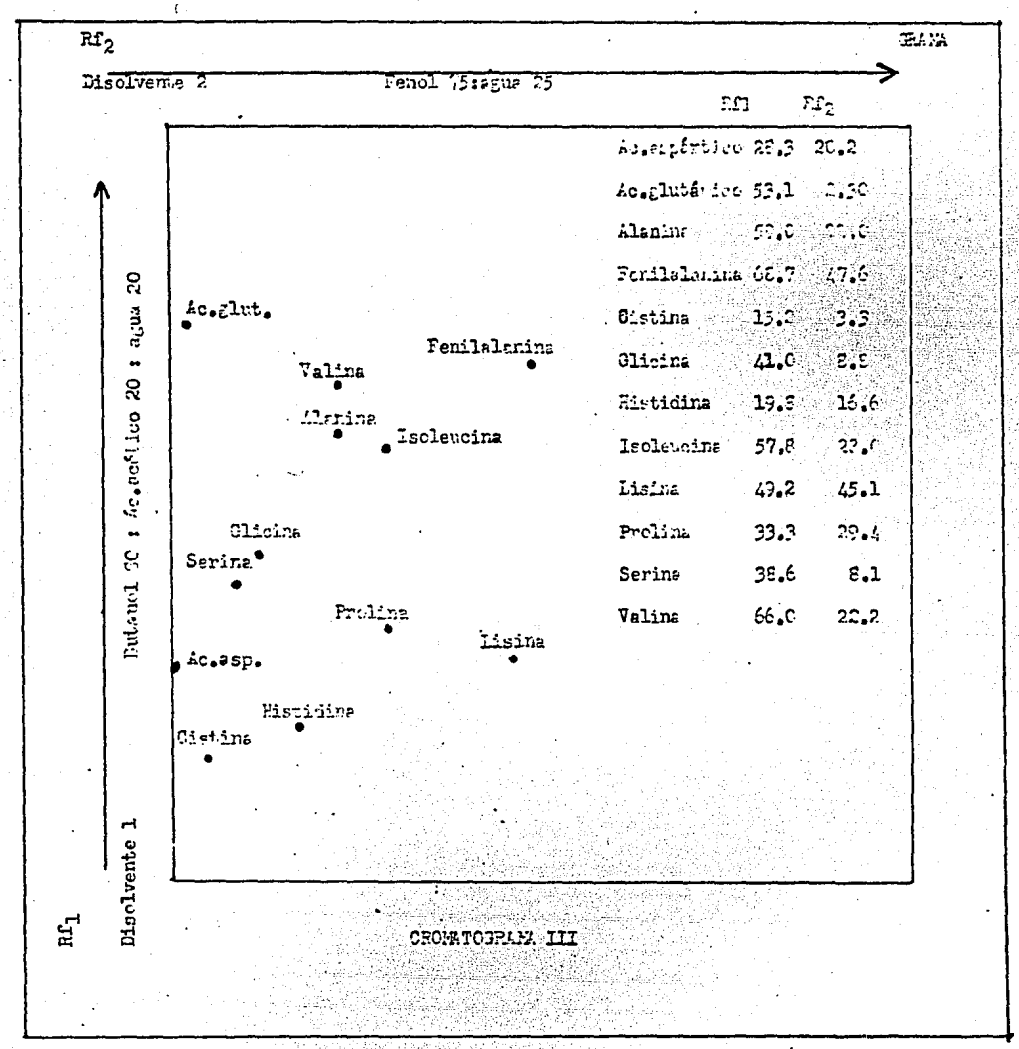
Temperatura ambiental
Tiempo de saturación : 12 horas.
Tiempo de desarrollo : 11 horas.
Distancia recorrida : 15 Cms.
Revelador : A).- 50 Ml. de solución de ninhidrina .Clg en 50 Ml.de alcohol etílico absoluto con 10 Ml.de ácido acético glacial y 3 Ml. de colidina isómera. A).- 50Ml.
B).- Nitrato cúprico .5 g en alcohol etílico. B).- 3Ml.



	Rf1	Rf2
2.-	02.1	53.4
3.-	12.9	34.8
4.-	22.1	59.3
5.-	47.8	66.9
6.-	03.3	15.1
11.-	45.0	47.5
12.-	33.0	72.2
13.-	29.2	33.4
14.-	09.0	28.8
16.-	31.1	70.6
17.-	20.2	72.1
18.-	22.4	66.1

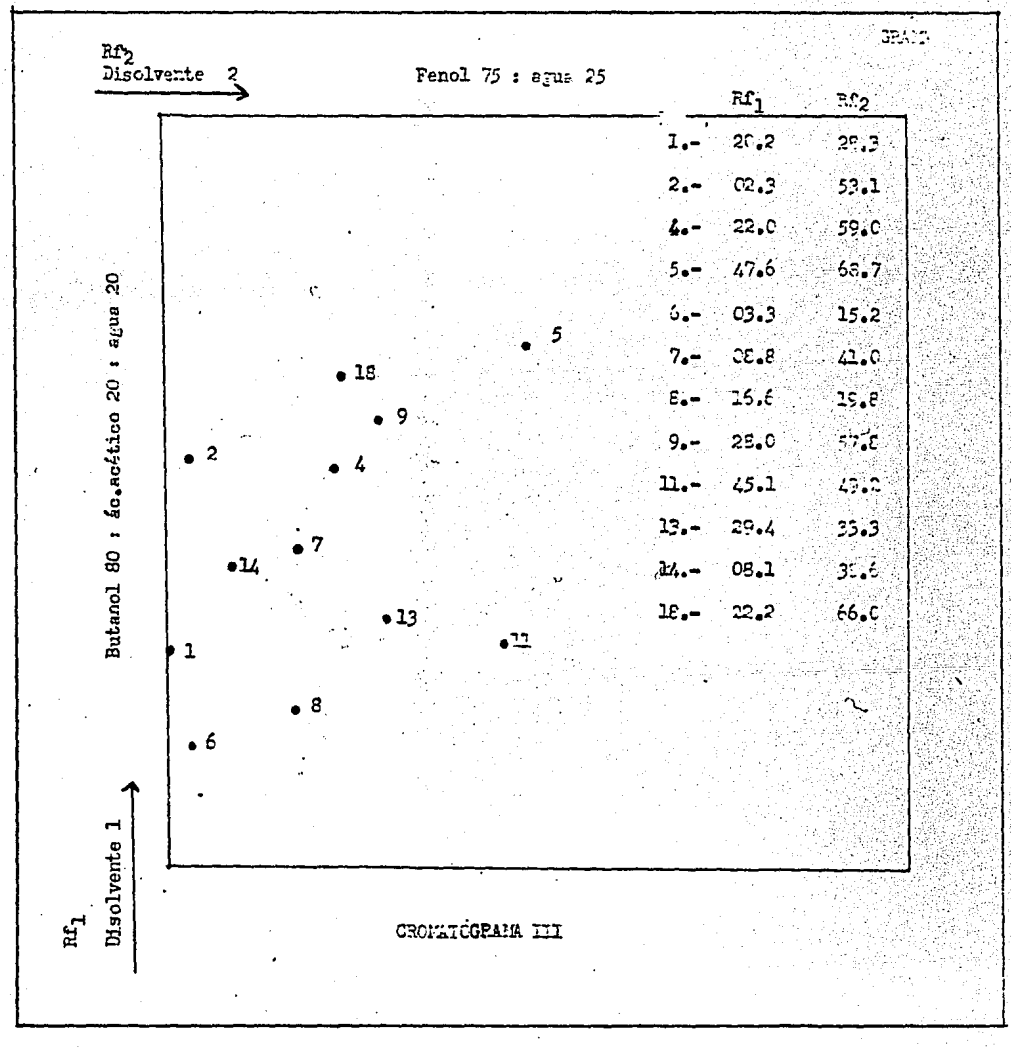
CROMATOGRAMA II

Temperatura ambiental
Tiempo de saturación : 12 horas
Tiempo de desarrollo : 11horas.
Distancia recorrida : 15 Cms.
Revelador : A).- 50 Ml.de solución de ninhidrina .01 g.en 50 Ml.de alcohol etílico absoluto con 10 Ml de ácido acético glacial y 3Ml.de colidina isómera. A) 50Ml.
B).-Nitrato cúprico .5g,en alcohol etílico. B) 3Ml.



CROMATOGRAMA III

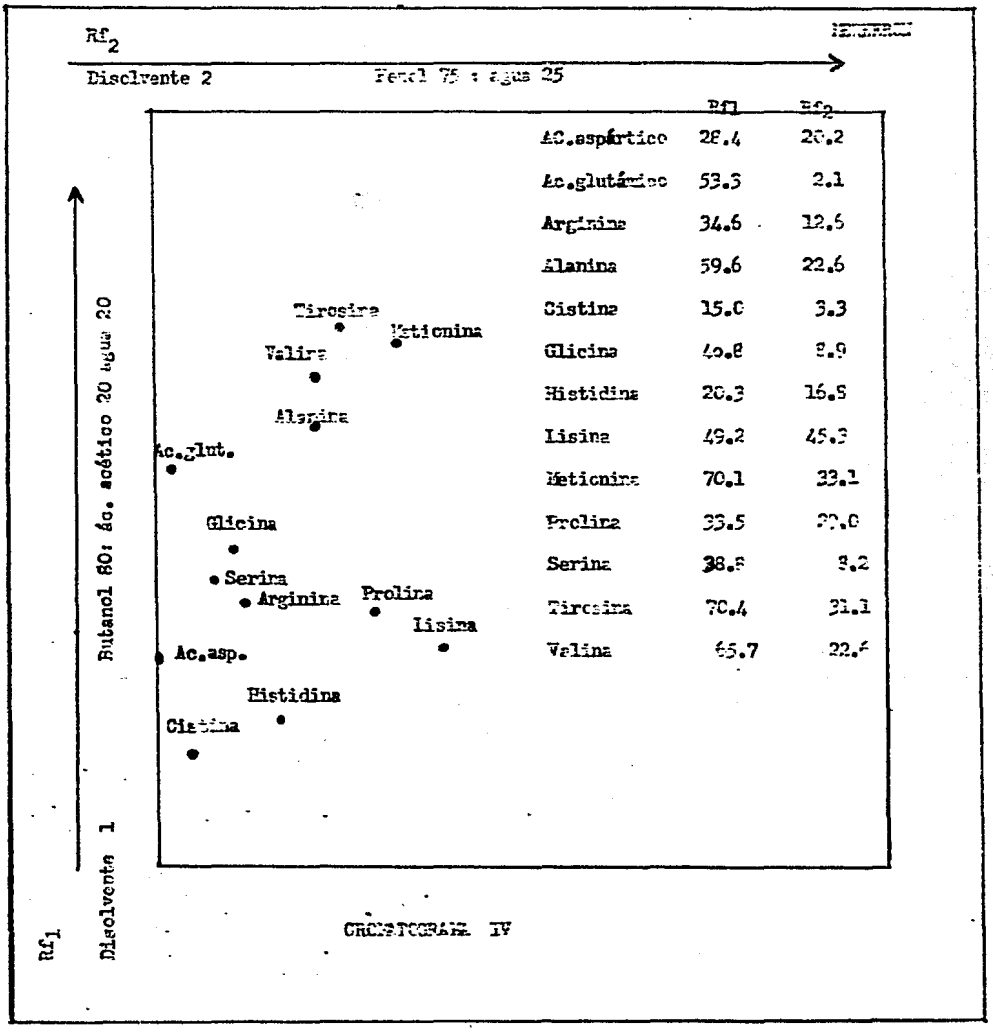
Temperatura ambiental
Tiempo de saturación :12 horas.
Distancia de recorrido:5 Cms.
Tiempo de desarrollo :11 horas.
Revelador ; A).- 50 Ml.de solución de ninhidrina .2Gs en 50 Ml. de alcohol etílico absoluto con 10 Ml.de ácido acético glacial y 3Ml. de colidina isómera. A).- 50 Ml.
B).- Nitrato cúprico .5 g en alcohol etílico. B).- 3 Ml.



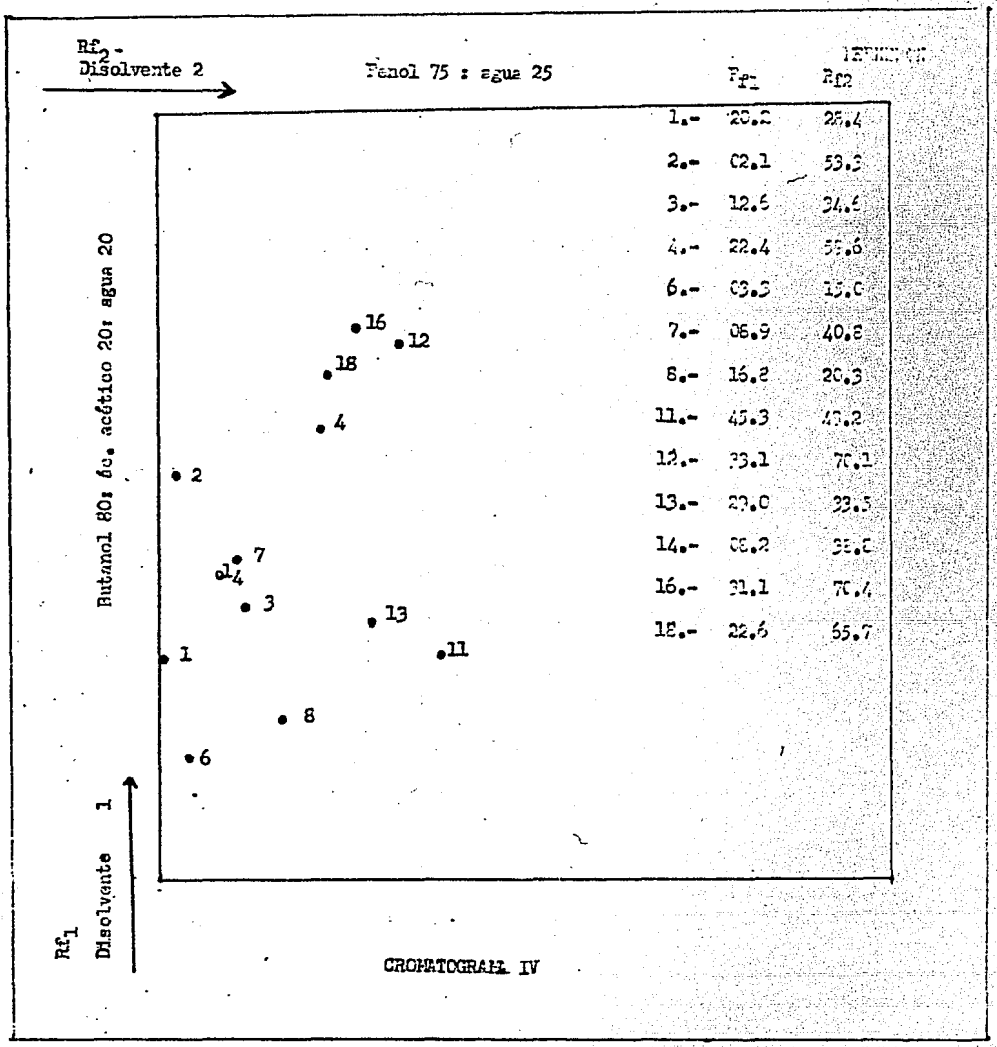
	Rf_1	Rf_2
1.-	20.2	28.3
2.-	02.3	53.1
4.-	22.0	59.0
5.-	47.6	68.7
6.-	03.3	15.2
7.-	08.8	41.0
8.-	16.6	19.8
9.-	28.0	57.0
11.-	45.1	49.0
13.-	29.4	35.3
14.-	08.1	31.6
18.-	22.2	66.0

CROMATOGRAMA III

Temperatura ambiental
Tiempo de saturación : 20 horas.
Distancia de recorrido 15 Cms.
Tiempo de desarrollo : 11 horas.
Reveladores: A).- 50 Ml. de solución de ninhidrina .01 g. en 50 Ml. de alcohol etílico absoluto con 10 Ml. de ácido acético glacial y 3 Ml. de colidina isómera. A).- 50 Ml.
B).- Nitrato cúprico .5 g en alcohol etílico. B).- 3Ml.



Temperatura ambiental
Tiempo de saturación : 12 horas.
Tiempo de desarrollo : 11 horas.
Distancia recorrida : 15 Cms.
Revelador: A).- 50 Ml. de solución de ninhidrina .Cl g en 50 Ml.de alcohol etílico absoluto con10Ml. de ácido acético glacial y 3 Ml. de solidina isómera. A) 50 Ml.
B).- Nitrato cúprico .5 g en alcohol etílico 50 Ml. B) 3Ml .

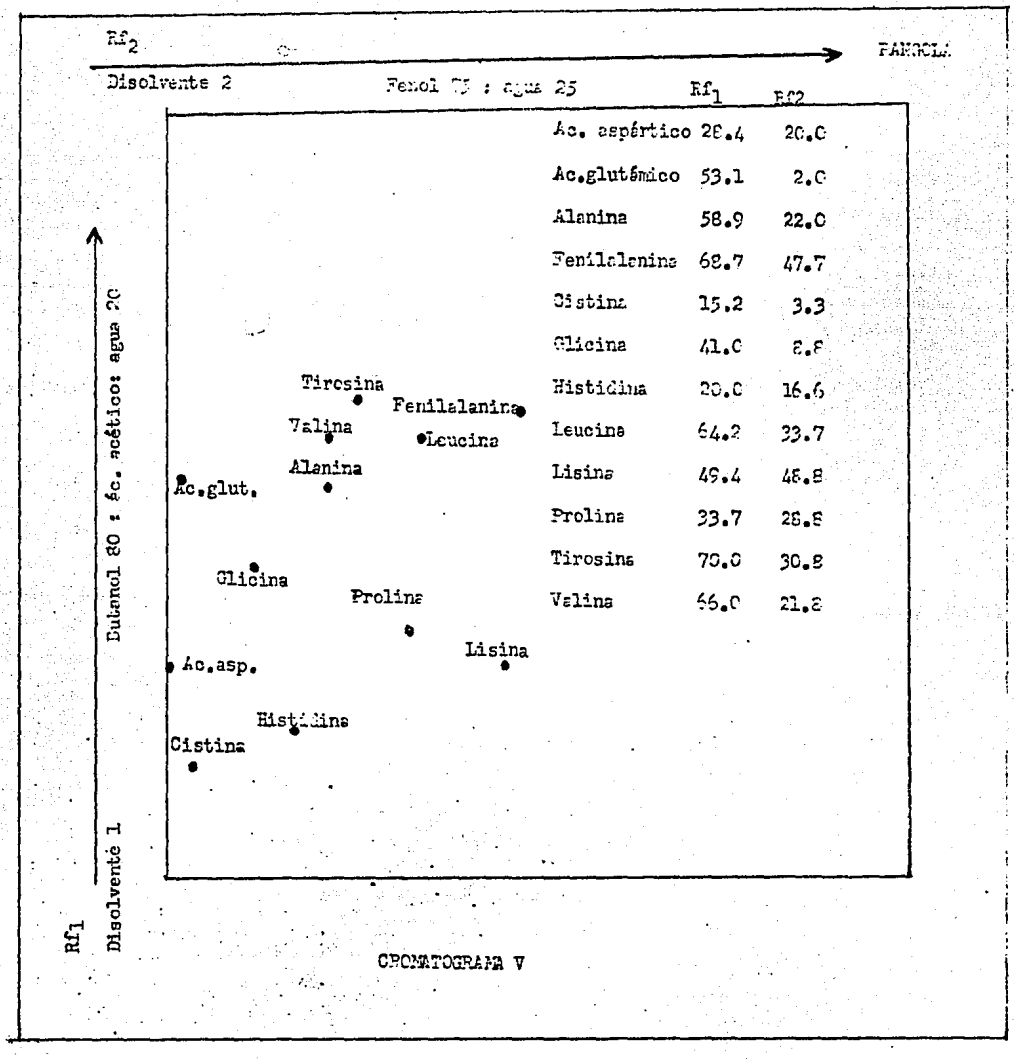


	Rf1	Rf2
1.-	20.2	26.4
2.-	02.1	53.3
3.-	12.6	34.4
4.-	22.4	56.6
6.-	03.3	15.0
7.-	08.9	40.8
8.-	16.2	20.3
11.-	45.3	47.2
12.-	33.1	70.1
13.-	29.0	33.5
14.-	08.2	35.0
16.-	31.1	70.4
18.-	22.6	65.7

CROMATOGRAMA IV

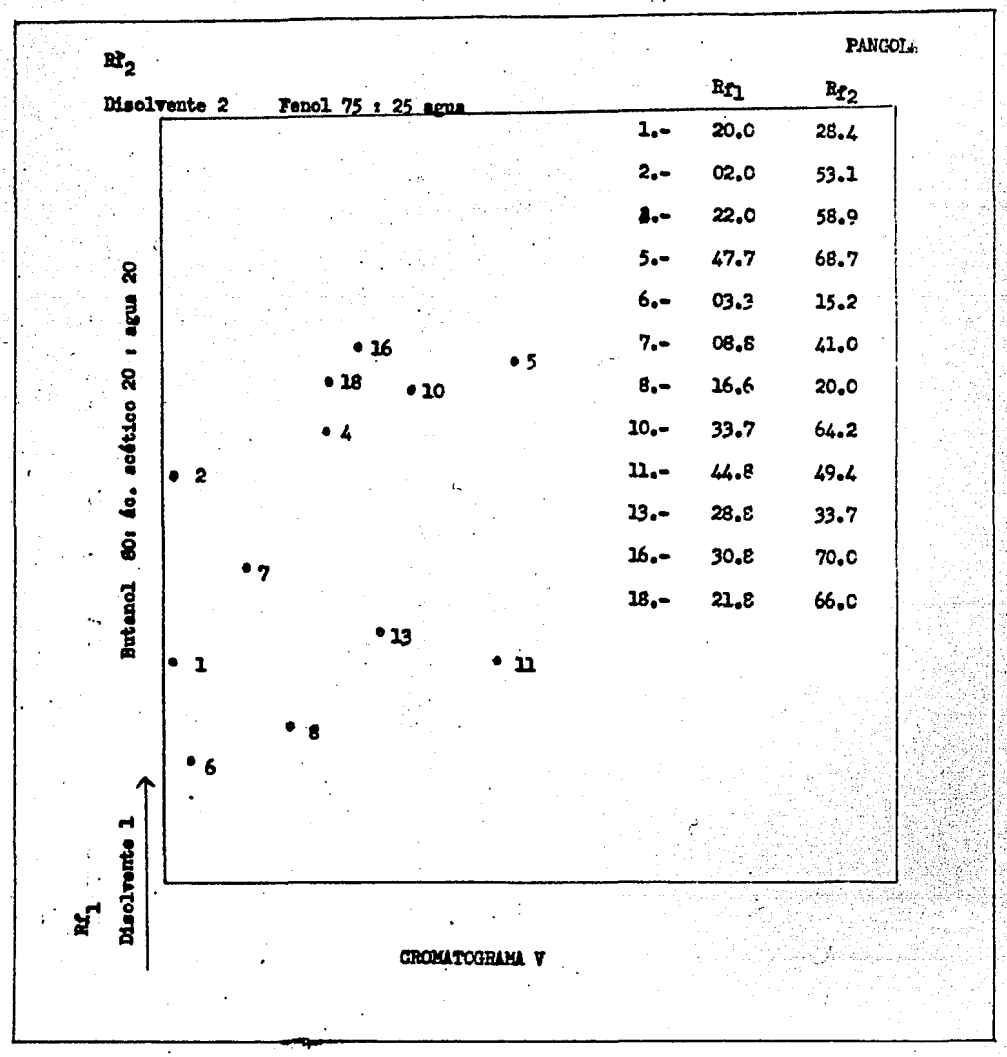
Tiempo de saturación : 12 horas.
Temperatura ambiental
Tiempo de desarrollo : 11 horas.

Distancia recorrida : 15 Cms.
Revelador : A).- 50 Ml. de solución de ninhidrina .01 g en 50 Ml.de alcohol etílico absoluto con 10 Ml. de ácido acético glacial y 3Ml. de colidina isómera.
B).- Nitrato cúprico .5 g. en alcohol etílico 50 Ml.



CROMATOGRAMA V

Temperatura ambiental
Tiempo de saturación : 12 horas.
Tiempo de desarrollo : 11 horas.
Distancia recorrida : 15 Cms.
Revelador : A).- 50 Ml. de solución de ninhidrina .01 g. en 50 Ml. de alcohol etílico absoluto con 10 Ml. de ácido acético glacial y 3 Ml. de colidina isómera. A).- 50 Ml.
B).- Nitrato cúprico .5 g en alcohol etílico 50 Ml. B).- 3 Ml.

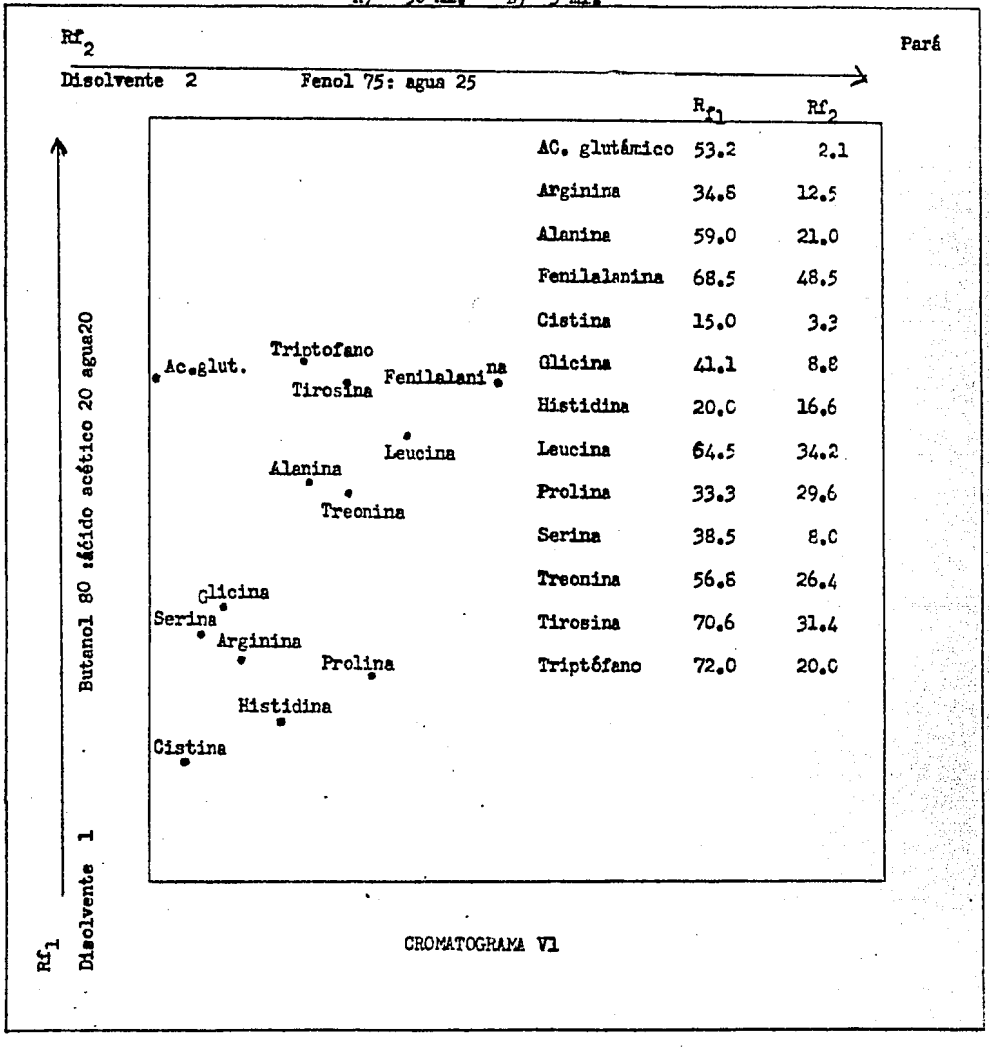


	Rf_1	Rf_2
1.-	20.0	28.4
2.-	02.0	53.1
3.-	22.0	58.9
5.-	47.7	68.7
6.-	03.3	15.2
7.-	08.8	41.0
8.-	16.6	20.0
10.-	33.7	64.2
11.-	44.8	49.4
13.-	28.8	33.7
16.-	30.8	70.0
18.-	21.8	66.0

CROMATOGRAMA V

Temperatura ambiental

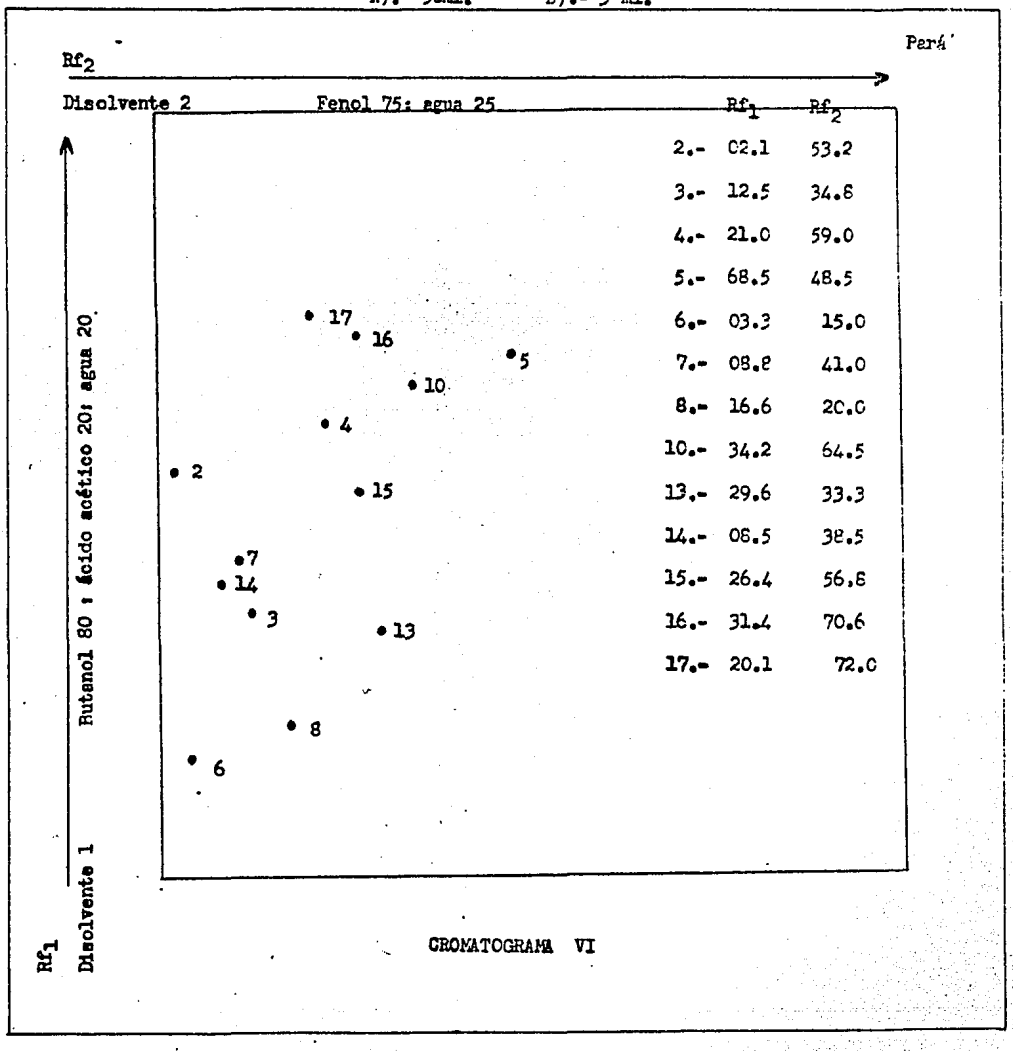
Tiempo de saturación : 12 horas
Tiempo de desarrollo : 11 horas
Distancia recorrida : 15 cms
Revelador : A).- 50 ml. de solución de ninhidrina .01 g en 50 ml. de alcohol etílico absoluto con 10 ml.de ácido acético glacial y 3 ml.de colidina isómera.
B).- Nitrato cúprico .5 g en alcohol etílico. 50ml.
A) 50 ml. B) 3 ml.



CROMATOGRAMA VI

Temperatura ambiental
Tiempo de saturación : 12 horas
Tiempo de desarrollo : 11 horas
Distancia recorrida : 15 cms
Revelador : A).- 50 ml. de Solución de ninhidrina .Cl g en 50 ml. de alcohol etílico absoluto con 10ml.de ácido acético-glacial y 3ml. de colidina isómera.
B).- Nitrato cúprico .5 g en alcohol etílico.50ml

A).- 50ml. B).- 3 ml.



	Rf_1	Rf_2
2.-	02.1	53.2
3.-	12.5	34.8
4.-	21.0	59.0
5.-	68.5	48.5
6.-	03.3	15.0
7.-	08.8	41.0
8.-	16.6	20.0
10.-	34.2	64.5
13.-	29.6	33.3
14.-	08.5	38.5
15.-	26.4	56.8
16.-	31.4	70.6
17.-	20.1	72.0

CROMATOGRAMA VI

Analisis Bromatológico de las muestras de zacates hidrolizados

Cuadro 9 Cifras en promedio %

Contenido	Guinea	Grama	Merkerón	Pangola	Pará
Materia seca %	51.45	21.0	26.09	59.11	66.66
Humedad %	48.55	79.0	73.91	40.89	33.33
Proteína cruda %	5.7	3.5	3.8	4.2	3.2
Estracto etéreo %	2.5	1.2	2.26	1.2	1.02
Fibra cruda %	12.74	6.1	6.43	11.5	14.40
Estracto libre de % nitrogeno	26.36	8.19	12.11	38.81	45.22
Cenisas	4.15	2.3	2.68	3.8	3.10
Calcio	0.15	0.19	0.27	0.10	0.19
Fosfore	.24	.22	.35	.35	.24

IV - DISCUSION

Discusión derivada del método y materiales empleados.

1. - Todos los cromatogramas trabajados por este método de cromatografía en capa delgada (fina), valiéndonos del aparato que en este caso fué utilizado, se trabajaron en forma bidimensional a partir del hidrolizado de zacates obtenidos en la zona Norte del Estado de Veracruz, en la región de la Huasteca.

2. - Los problemas encontrados en el desarrollo de este trabajo, están relacionados al tiempo y tipo de hidrólisis realizada, en este caso, la hidrólisis ácida fué la que dió mejores resultados con un tiempo de 9 hr, en reflujo. Considerando que en tesis anteriores, éstas se realizaron en autoclave a 120°C, resulta más sencillo el método que se usó, porque se pueden obtener mayores cantidades de hidrólisado (3-8-16).

3. - En todas las hidrólisis ensayadas en un principio, se encontró que los aminoácidos empezaban a aparecer en un tiempo de 6h de hidrólisis, pero se encontraban en pequeña cantidad. En 12 horas de hidrólisis, se encontró que la cantidad de aminoácidos era menor por lo que hbo necesidad de realizar todas las hidrólisis en 9 horas obteniéndose los resultados anotados.

4. - En los pocos cromatogramas realizados a partir de hidrólisis alcalina, la presencia de triptófano siempre fué constante, lo mismo sucedió en la hidrólisis ácida de 6 hr y solo se observaron vestigios de este aminoácido en la hidrólisis ácida de 9 hr en el zacate Pará.

5. - Otra situación de analizar por el buen resultado obtenido a lo largo del desarrollo de los cromatogramas realizados, fué el de dar una doble corriente del primer disolvente en la misma dirección, pues se obtenían separaciones de cada uno de los componentes mas precisas. Esto se intentó realizarlo también con el segundo disolvente, pero los resultados no se modificaron en gran forma, por lo cual solamente valiéndonos de la maniobra anterior se hicieron las anotaciones representativas de cada muestra siempre en datos promediales.

6. - El tiempo de saturación de los tanques de elución empleados para los dos distintos disolventes fué de un promedio de 12 hr, pudiéndose recortar este tiempo hasta 4 hr. Para nosotros los mejores resultados se obtuvieron saturando por las noches y realizar los cromatográmas en el transcurso del día.

7. - Se intentaron varias distancias de recorrido para encontrar los mejores resultados, en todos los casos se dejaron recorrer 15 cm considerando el margen dado para el punto de aplicación. Lo ideal sería haber corrido una distancia mayor en otro tipo de placa portadora de un tanque de elución más grande para lograr un desplazamiento más amplio de los diferentes componentes investigados.

8. - El lavado de placas portadoras en solución crómica por 12 hr, mínimo, nos evitó problemas que teníamos al lavarlas simplemente con detergente, ya que aparecían sobre todo en la segunda corriente (fenol 75 - agua 25) grandes manchas sobre los bordes del disolvente, las cuales en ocasiones interferían en la interpretación del Rf.

9. - Los tanques de elución después de ocupado el disolvente, lo restante se eliminaba, volviéndose a saturar sin necesidad de lavar, incorporando nuevo disolvente y en esta forma se mantenía una atmosfera de saturación interna constante, lo cual influyó en los resultados grandemente.

10. - De los resultados obtenidos (cuadro 1 y 2,) podemos apreciar que algunos de los zacates tienen la mayor parte de los aminoácidos investigados y que en ninguno, la constante de aminoácidos es igual. Lo único importante de considerar es que para establecer estos datos, se tomaron en cuenta la presencia de algunos aminoácidos que en ocasiones se presentaban en pequeña cantidad y en otras ocasiones en una cantidad facilmente detectable, para lo cual como fué indicado dentro del capítulo de Métodos, fué necesario establecer promedios, basádos estos en el desarrollo de series de cromatogramas de la misma muestra investigada para afirmar la presencia o ausencia de los mismos.

11. - En ocasiones, las relaciones por situación en el cromatograma, nos la dieron amino-ácidos constantes y de fácil identificación como la prolina que al revelado o en ocasiones sin necesidad de esta, aparecía en forma uniforme y de color amarillo que contrastaba sobre el fondo claro del absorbente, por su situación en el cromatograma, las relaciones con los demás componentes , dos daban la interpretación de cada uno de ellos.

12. - La concentración en que aparecían los amino-ácidos identificados, se puede decir que en poca cantidad variaban, ésto con relación al tamaño y a la forma de la mancha.

13. - Las pequeñas variaciones relacionadas con el RF de las muestras investigadas, son problemas generalmente de temperatura que está relacionada con la hora del día en que se realiza, por no tener medios artificiales para su control en la forma que se trabajó.

14. - La cal idad en el revelado de la mancha depende de la separación de medios extraños que obstaculicen el desplazamiento de los amino-ácidos o su aparición en el cromatograma. Fué necesario eliminar los pigmentos de la muestra empleada con carbón activado, obteniéndose un hidrolizado cristalino.

15. - Las variaciones que se pudieran observar en el presente trabajo son mínimas para el medio en que fué realizado, además sin tener datos de investigaciones realizadas sobre amino-ácidos de origen vegetal identificados por cromatografía en capa delgada sobre gel de sílice.

V. - CONCLUSION

Las conclusiones que se derivan de la presente investigación y de los métodos utilizados son los siguientes:

1. - Los datos obtenidos por cromatografía en capa delgada (fina) revelan con claridad la ayuda en la identificación de aminoácidos presentes en las proteínas de orígen vegetal.

2. - La hidrólisis ácida (Acido clorhídrico al 10%) como se ha indicado en trabajos anteriores, es la más adecuada para la separación de aminoácidos (8-16).

3. - El hidrolizado a reflujo tiene la ventaja de preparar mayor cantidad de muestra hidrolizada en poco tiempo.

4. - La limpieza de placas portadoras en doce horas de solución crómica es imprescindible para obtener buenos resultados.

5. - La ventaja de establecer un patrón constante en el desplazamiento de cada uno de los componentes de la mezcla facilitan la interpretación de los datos investigados.

6. - El secado del medio absorbente entre la acción de un disolvente y otro, es primordial en el desplazamiento uniforme de los diferentes elementos de la muestra.

7. - El medio absorbente se puede variar de acuerdo con las propiedades de las sustancias que se investiguen.

8. - El trabajo combinado utilizando varias unidades de tanques de elución facilita y ahorra tiempo en la investigación.

9. - El desarrollo de cromatogramas bidimensionales dá buenos resultados en la separación de aminoácidos.

10. - Los mejores resultados se obtienen concentrando por evaporación hasta un 25%, el total de hidrólisis obtenida.

11. - El triptófano se destruye por hidrólisis ácida.

12. - El método utilizado por cromatografía en capa delgada es de fácil manejo con una precisión de datos mayor que otros métodos.

13. - El costo de utilización de las substancias es mínimo ya que se trabaja en una pequeña cantidad.

14. - Las muestras analizadas tienen proteínas de buena calidad; en las cuales se identificaron la mayor parte de los aminoácidos necesarios - bles, lo cual resulta importante como fuente nutricional.

15. - La zona del Norte del Estado de Veracruz-Huasteca, cuenta con grandes fuentes proteinicas de orígen vegetal para la alimentación de su ganadería.

VI - RESUMEN

1o. - Se busca la bibliografía con relación al método aplicado y la importancia de los aminoácidos, así como las muestras por analizar.

2o. - Se establecen patrones con solución de aminoácidos puros.

3o. - Se aplica la cromatografía bidimensional, en el estudio de las proteínas vegetales.

4o. - Se comparan resultados obtenidos por diversas hidrólisis de proteina.

5o. - Se investiga el contenido de aminoácidos de cinco zacates del Norte del Estado de Veracruz.

6o. - Se obtienen resultados promedios de cinco hidrólisis investigadas por cada muestra, siendo el total de hidrólisis por las muestras analizadas 25.

7o. - Se estudia su composición biomatológica de las muestras analizadas.

8o. - Se exponen los resultados en una serie de cuadros y cromatogramas.

9o. - Sin tener antecedentes de esta técnica de cromatografía en gel de sílice en aminoácidos de alimentos de orígen vegetal, solo se discuten, pequeños detalles de la investigación.

10o. - Se concluye, que las muestras investigadas son de buena calidad.

VI - BIBLIOGRAFIA

1. - Aguilar, G. Ignacio José - Forrajes y Plantas Forrajeras. Bartolomé Trucco, Editor 1946.

2. - Bardier, M.H. Jaege, H. Tobias, E. Wyss. Helv. Chim, Acta 42. 2440, 1959

3. - Block, R.J. Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis. New York, 1955.

4. - Crowe, M.O. Anal. Chem. 13.845, 1941.

5. - Dukes, H.H. The Phisiology of Domestic Animals. Ithaca New York. Constock Publishing Associates, 1955.

6. - Diecket J. W., R. Reiser, Science, 120, 678 1959.

7. - E. Merck A. G. Lederer. Chromatography. Darmstad Germany 7-30

8. - Garcia, P.J. Contribución a la determinación cualitativa de ácidos aminados en algunos alimentos comerciales para aves y suideos por cromatografía en papel. Tesis Profesional UNAM 1958.

9. - Hawk, B. P. Practical Phisiologycal Chemistry. The Blakiston Co. Inc., 1954

10. - Helftman E. Chromatography. Reinhold Publishing Co. 1960.

11. - H. R. Bolliger M. Brenner H. Gañshirt.
H. K. Mangold H. Seiler, Egon Stahl D. Waldi
Thin Layer Chromatography. New York. Berlin Heideberg 1955.

12. - León Jordán H. Forrajicultura y Pasticultura. Barcelona Madrid. Salvat Editores S. A., 1965.

13. - Lederer E, M. Lederer Chromatography. Elsevier. Pu.Co, 2nd Ed.

14. - Machata G. Microchim. Acta 79, 1960.

15. - Maynard, L. A. y J. K. Loosli. Animal Nutrition Mc Graw-Hill, Publications in the Agricultural Sciences 1956.

16. - Mendoza, R. V. M. Contribución a la determinación cualitativa de ácidos aminados en concentrados proteícos de orígen animal, destinados a la alimentación de aves de corral. Por cromatografía en papel. Tesis Profesional UNAM 1966. Escuela Nacional de Medicina Veterinaria Zootecnia.

17. - Meinhard J. E., N. F. Hall. Anal. Chem. 21, 185, 1949.

18. - Mottier M. M. Potterat. Anal. Chim. Acta 13, 46 1955

19. - Niremberg y Mattaei. Proc. Nat. Acat. S.C.I. 47: 1958

20. - Rincon, O. E. H. Contribución a la determinación cualitativa por métodos croma tógraficos de ácidos aminados en el plasma seminal de bovideos. Tesis Profesional. UNAM Escuela Nacional de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

21. - Rubio, Lightbourn J. Cromatografía en capa delgada de saponinas esteroides. Esc. Nal. de Ciencias Químicas. UNAM 1963

22. - Simmonds, D. H. The amonoacid composition of keratine. Aminoacid analysis of the merino 64s virgen wool. Aust. J. Biol. Sci. 7

23. - Stahl. E. Dünnschicht Cromatography. Springer Verlang, Berlin, Göttingen Heildeber, 1962

24. - Sease J. W., J. Amer. Chem. Soc., 68, 2242 (1947); 70 3630: (1948)

25. - Torre, A. Guadalupe de la Aminoácidos libres y aminoácidos en líquido cefalorraquídeo. Tesis Esc. Nal. de Ciencias Químicas. UNAM 1954.

26. - Truler E. U. Thin Film Cromatography Cleaver Hume Press London 1963.

27. - Williams T. I. Introduction to Cromatography. Blackie London 1946.

28. - Zecheister, L. Progress in Chromatography 1947.

BIBLIOTECA CENTRAL
U. N. A. M.