

IWERSEN CHRISTENSEN, INE

118

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA "BERZELIUS"
(INCORPORADA)

ESTUDIO DE LOS METODOS PAPIROGRAFICOS
APLICADOS A LAS PROTEINAS

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO
DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

INE IWERSEN CHRISTENSEN



QUIMICA

MEXICO

1951



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

À la memoria de mi padre

HISTORIA

La Cromatografía es un método de análisis químico fundado en la adsorción o partición diferencial o selectiva de sustancias químicamente similares en un proceso de contracorriente. (15)

El primero que la usó fué Tswett, un botánico ruso, quien publicó en 1906, la descripción de una nueva técnica para separación de mezclas complejas. (18)

Esta técnica se basa en la partición de solutos entre un adsorbente sólido estacionario y una fase líquida móvil.

Tswett vertía pequeñas cantidades de pigmentos verdes de hojas secas, sobre una columna de vidrio vertical que contenía carbonato de calcio precipitado, y vertía después solvente puro con lo que se separaban una serie de bandas verdes y amarillas. Tswett llamó a este proceso "Método Cromatográfico".

Una vez obtenidas las bandas, separó las diferentes porciones, y así fué como comprobé por primera vez que los pigmentos de las hojas verdes eran cuatro: la clorofila a, la clorofila b, la xantofila y la carotina.

Desgraciadamente la cromatografía no siguió desarrollándose, porque la mayoría de los trabajos de Tswett se publicaron en ruso, y porque el autor por ser botánico apenas fué tomado en cuenta por los químicos de aquel tiempo.

En 1912 Rogowski y más tarde Dheré y Vegezzi, investigaron los pigmentos de las plantas por este método.

Palmer, en 1913, y Palmer y Eckles en 1914, utilizaron columnas de adsorción para la identificación y separación de los pigmentos de la manteca.

Intentaron también la separación de los pigmentos amarillos liposolubles de las plantas, Coward en 1924, y von Lipma en 1926.

En todos estos trabajos, al igual que el de Tswett, sólo se obtuvieron cantidades mínimas de pigmentos.

*Con todo agradecimiento a los Sres.
Químicos, Manuel Mañraza G. y
José J. Bolívar.*

*A la Facultad de
Química Berzelius*

HISTORIA

La Cromatografía es un método de análisis químico fundado en la adsorción o partición diferencial o selectiva de sustancias químicamente similares en un proceso de contracorriente. (15)

El primero que la usó fué Tswett, un botánico ruso, quien publicó en 1906, la descripción de una nueva técnica para separación de mezclas complejas. (18)

Esta técnica se basa en la partición de solutos entre un adsorbente sólido estacionario y una fase líquida móvil.

Tswett vertía pequeñas cantidades de pigmentos verdes de hojas secas, sobre una columna de vidrio vertical que contenía carbonato de calcio precipitado, y vertía después solvente puro con lo que se separaban una serie de bandas verdes y amarillas. Tswett llamó a este proceso "Método Cromatográfico".

Una vez obtenidas las bandas, separó las diferentes porciones, y así fué como comprobó por primera vez que los pigmentos de las hojas verdes eran cuatro: la clorofila a, la clorofila b, la xantofila y la carotina.

Desgraciadamente la cromatografía no siguió desarrollándose, porque la mayoría de los trabajos de Tswett se publicaron en ruso, y porque el autor por ser botánico apenas fué tomado en cuenta por los químicos de aquel tiempo.

En 1912 Rogowski y más tarde Dheré y Vegezzi, investigaron los pigmentos de las plantas por este método.

Palmer, en 1913, y Palmer y Eckles en 1914, utilizaron columnas de adsorción para la identificación y separación de los pigmentos de la mantequilla.

Intentaron también la separación de los pigmentos amarillos liposolubles de las plantas, Coward en 1924, y von Lipma en 1926.

En todos estos trabajos, al igual que el de Tswett, sólo se obtuvieron cantidades mínimas de pigmentos.

Se puede decir que, en 1931, Kuhn y Lederer hicieron revivir la cromatografía con sus investigaciones, separando los carotenos de la zanahoria en dos hidrocarburos isómeros, pasándolos por una columna de óxido de aluminio.

El caroteno cristalino, que por largos años había sido considerado como una sustancia única, fué separado en alfa y beta caroteno. Cada uno de éstos fué obtenido al estado de pureza en cantidad suficiente para poder analizarlos por el método de microcombustión de Pregl.

En el mismo año, Kuhn, Winterstein y Lederer obtuvieron por este método la xantofila cristalizada de las hojas y consiguieron el aislamiento de las xantofilas de la yema de huevo.

Dos años más tarde Kuhn y Brockmann lograron la separación de una tercera fracción de los carotenos, llamada gama caroteno.

Después de éstos, muchos investigadores comenzaron a trabajar con este método cromatográfico, para la separación y purificación de numerosos compuestos; y también la industria puso al alcance de los investigadores, adsorbentes y solventes nuevos, de aplicación en la cromatografía.

El perfeccionamiento de los métodos se debe principalmente a Winterstein, Zechmeister y Brockmann, que trabajaron mucho sobre este tema.

Con el tiempo ya no se usó este método sólo para separar colorantes naturales, sino que se aplicó a toda la química orgánica, analizando y purificando productos sintéticos, separando los diferentes productos de hidrólisis de proteínas, etc., y dando a conocer muchos compuestos nuevos.

En 1937, Schwab aplicó por primera vez la cromatografía a la separación de iones inorgánicos, disueltos en agua, dando a conocer al mismo tiempo las leyes de la adsorción por intercambio de iones.

Desde entonces hasta nuestros días, la cromatografía se ha desarrollado en múltiples direcciones, de tal manera que muy pronto no habrá una rama de la química que no haya empleado satisfactoriamente este procedimiento de separación.

MÉTODOS PAPIROGRAFICOS GENERALES

Uno de los últimos avances en el campo del análisis por adsorción, es la substitución de las columnas de adsorción por el papel filtro. A esta técnica se le ha llamado "Papirografía" o "Cromatografía por partición en papel filtro", debido a que su mecanismo está basado en el principio de partición, siendo el papel una fase inerte que sirve de soporte a dos fases líquidas, una estática y otra móvil.

Originalmente Schönbein, en 1861 había descubierto el por él llamado "análisis capilar", y predijo su futuro como extremadamente útil en los métodos analíticos.

Después de un largo período de silencio, Consden, Gordon y Martin desarrollaron el método de la separación en tiras de papel filtro, separando una mezcla de aminoácidos por este procedimiento. (3a).

El método general consiste en poner una muestra de la sustancia problema que se va a separar, en una pequeña área sobre un papel filtro de grueso y porosidad adecuados.

El borde del papel se sumerge, por el lado donde se aplicó la muestra, en un líquido, que va a ascender o descender por el papel filtro y que a su paso irá dejando en diferentes zonas los constituyentes de la mezcla.

Una vez efectuado el desarrollo, si es un papirograma monodimensional, se deja secar al aire o a la estufa y se revelan las bandas para identificar los diversos componentes.

En caso de tratarse de un papirograma bidimensional, después de la primera separación se deja secar el papel filtro a temperatura ambiente, y luego se hace girar 90°, volviéndolo a sumergir en un solvente adecuado.

El líquido se moverá en dirección perpendicular al recorrido del primer solvente.

El cromatograma bidimensional es conveniente en muchos casos, porque se ha notado que, en la primera dimensión, no siempre se consigue una separación completa, formando dos o más sustancias una misma mancha, debido a que estas sustancias presentan frente a un determinado solvente el mismo Rf, y sólo al hacer el desarrollo en la segunda dimensión, con un líquido diferente al de la primera, la separación es completa.

El valor Rf, antes mencionado, expresa la velocidad de migración del soluto con respecto a la velocidad con que avanza el solvente, y se calcula de la siguiente manera:

$$Rf = \frac{\text{Distancia avanzada por la banda del soluto}}{\text{Distancia avanzada por el frente del solvente}}$$

Se ha visto que los valores Rf son característicos para cada sustancia si el desarrollo se hace bajo las mismas condiciones. Sin embargo, las variaciones del pH, concentración, temperatura, etc., son factores que pueden modificar en gran escala dichos valores.

El desarrollo en todos estos casos se efectúa en cámaras cerradas, en las cuales se debe mantener una atmósfera saturada en equilibrio con el sistema líquido que se esté usando para la separación.

Uno de los mayores problemas, es la colocación de la muestra, que debe ser en un área lo más pequeña posible.

En los cromatogramas monodimensionales se puede poner la muestra en dos o más porciones, una junto a la otra, o bien en forma de raya paralela a uno de los bordes del papel. En cambio en los papirogramas bidimensionales debe ser una sola mancha en una de las esquinas del papel, y para esto se han ideado una serie de pipetas especiales, que facilitan mucho este trabajo (Figs. 1-4).

Si las soluciones que hay que analizar son muy diluidas, se puede poner el papel sobre una plancha caliente para que el líquido que diluye el problema se evapore constantemente, poniendo la muestra sobre el papel por medio de una pipeta capilar de escurrimiento continuo, que está sujeto por unas pinzas a un soporte. (Fig. 7).

Desde los trabajos de Consden y colaboradores hasta ahora, se han ideado muchos aparatos modificados, para precisar y facilitar la obtención de papirogramas, y que describiremos a continuación.

Williams y Kirby, (38) describen un método que dicen es más sensible para la adsorción de aminoácidos. Consiste en una tira de

papel filtro que se suspende con el extremo inferior sumergido en la solución. Todo esto se introduce en una cámara para mantener húmedo el cromatograma.

Se usa papel Whatmann N° 1, poniéndolo en forma de cilindro, sin que cierre completamente y parándolo en una caja de Petri. Con este mismo método se pueden efectuar cromatogramas mono y bi-dimensionales.



Fig. # 1.

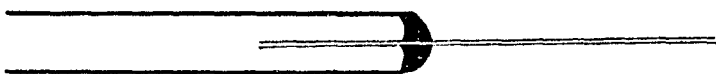


Fig. # 2

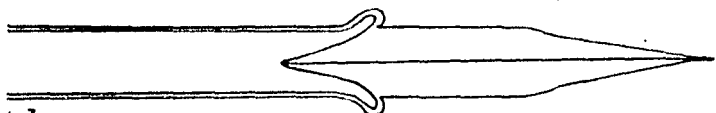


Fig. # 3

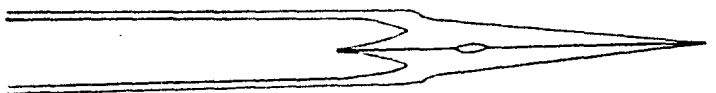


Fig. # 4

Un método sencillo, descrito por Winsten (40), es el siguiente: Se unen dos cristalizadores por una varilla de vidrio. En el inferior se pone la solución que sirve para mantener húmedo el ambiente. En el superior está el solvente y al rededor de ella está una espiral de alambre con objeto de que la tira de papel no toque el recipiente. Se pueden efectuar varios papirogramas a la vez. (Fig. 5).

Steward, Stepka y Thomsen (28), describen un método con el que obtuvieron resultados más exactos. (Fig. 6).

El papel es sostenido por un tubo de vidrio superior, y está encima de otros dos tubos también de vidrio, sin tocar el recipiente de metal.

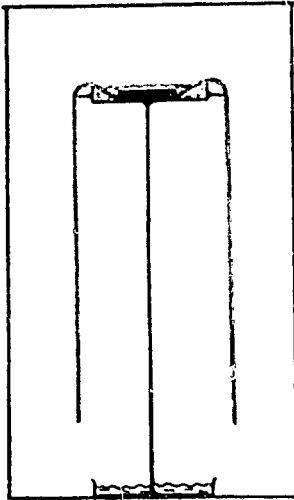


Fig # 5

Longenecker (12) usó un tubo especial para sus cromatogramas.

A Urbach (36) se le presentó el problema de que la histamina de extractos biológicos, adsorbida por métodos cromatográficos en tiras de papel, es tan poca, que no se puede identificar por los métodos usuales, y entonces había que concentrarla. Con este objeto ideó el siguiente dispositivo, (Fig. 7), que además tiene la ventaja de poder aplicar la muestra a varias tiras de papel a la vez.

En el procedimiento de Rockland y Dunn (24), se corta el papel filtro de la manera indicada en la figura N° 8, y con una pipeta pequeña se pone la muestra en A. Se desarrolla el cromatograma haciendo que ascienda el solvente, luego se seca al aire suspendiendo la tira de papel con un gancho de alambre en B.

Para verificar cromatogramas en escala mayor se usa el método de Wolfson y Cohn (41). Para esto se toma un rectángulo de papel

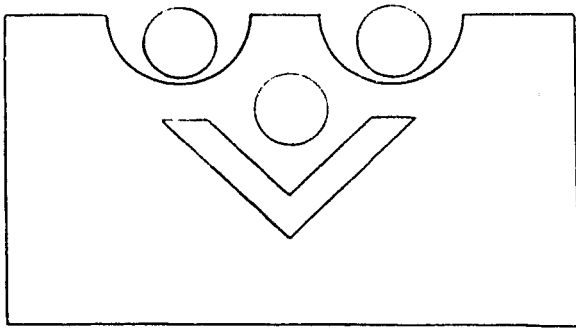


Fig # 6

filtro bastante grande y se le da la forma de cilindro. Se unen los bordes con tiritas de tela adhesiva pero sin que éstos se toquen. De esta manera se pueden obtener cromatogramas ascendentes bidimensionales.

Ma y Fontaine (14) usaron este método, con el cual se pueden verificar cromatogramas mono y bidimensionales. El papel filtro se enrolla en la espiral de metal, y luego se mete el dispositivo en una cámara de vidrio y se coloca el solvente en la parte inferior de la cámara.

Después de los excelentes resultados que se han obtenido separando pequeñas cantidades de substancias, se ha hecho el intento de aplicar la papirografía a cantidades mayores, pero se ha tropezado con dos dificultades:

- 1.—La administración de varios ml de muestra en el papel.
- 2.—La obtención de un papel grueso que adsorba grandes cantidades de soluto.

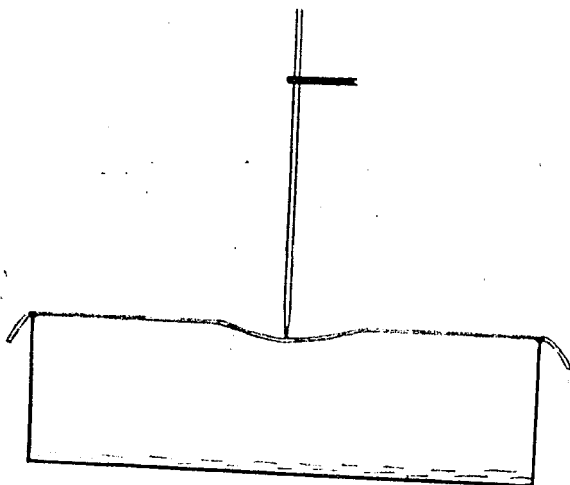


Fig # 7

Yanofsky, Wassermann y Bonner (42), trataron de resolver el problema con el siguiente dispositivo, y usando un papel filtro adecuado.

Longenecker (13) usa una técnica papirográfica en la que las tiras de papel filtro son más angostas que las anteriormente usadas, usando un aparato especial para los cromatogramas ascendentes o por fuerzas capilares, y otro para los descendentes.

Müller y Clegg han ideado un dispositivo para llevar a cabo papirogramas automáticos. Se usa para cantidades pequeñas de



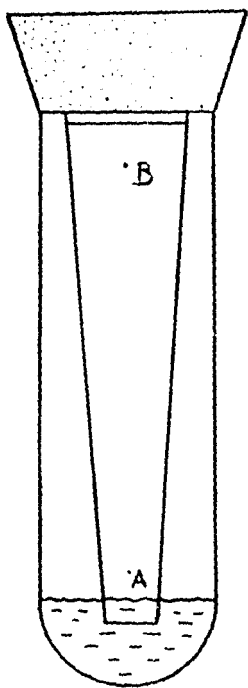


Fig # 8.

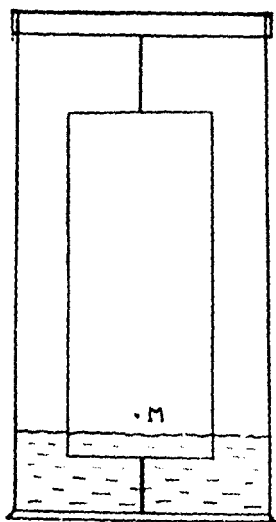
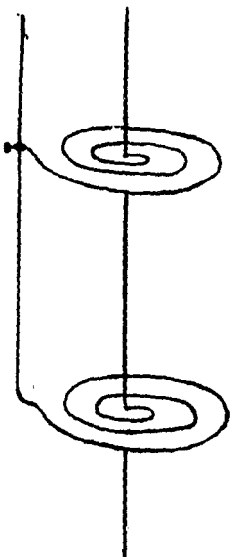


Fig # 9.

muestra. En el papel filtro se pone un margen de cera de la manera ilustrada en la figura núm. 10.

Mitchell y Haskins (20), inventaron una "pila cromatográfica", porque los métodos de cromatografía generales no adsorben suficiente cantidad de soluto en caso de purificar una substancia. Con este objeto se ha usado una pila de discos de papel filtro, y que consiste principalmente de tres partes:

- 1.—El papel filtro cortado en discos.
- 2.—El empacador del papel filtro.
- 3.—Distribuidor del solvente.

Después de efectuado el papirograma, se pueden medir los valores R_f de las diversas substancias con el "Partogrid" de Rockland y Dunn (25).

Este consiste en un papel milimétrico cortado en forma de triángulo y que tiene las rayas pintadas con tinta china lo más exacto posible. Se sumerge el papel en una solución alcohólica de carbowax 400 al 25%, para aumentar su transparencia.

El 0 se pone en lugar de aplicación de la muestra, y se determina la posición de las zonas según el número en que quedaron.

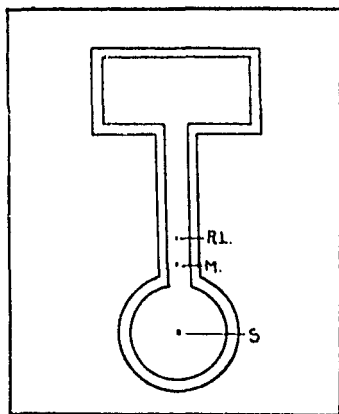


Fig # 10.

METODOS PAPIROGRAFICOS APLICADOS A LAS PROTEINAS

La aplicación de la cromatografía en el campo de las proteínas no ha empezado a desarrollarse hasta en los últimos dos años, dado a la constitución compleja de las proteínas y a la dificultad de obtenerlas puras.

Uno de los primeros trabajos que apareció a este respecto, fué el de Franklin y Quastel en el año de 1949 (7). Ellos trataron de separar varios grupos de proteínas por el método de cromatografía sobre tiras de papel. Primero mezclaban la proteína con hemina, substancia con la que se combina íntimamente y que se usa como marcador de proteínas; y la aplicaban en forma de pequeñas manchas sobre las tiras de papel. Desarrollaban los cromatogramas con soluciones salinas en vez de los solventes orgánicos comúnmente usados, y revelaron después sus papirogramas con una solución de benecidina recientemente preparada, apareciendo las manchas de proteínas de color azul. Todavía húmedo el papel, se tiene que tomar una fotografía, porque después de un rato el fondo del papel se colorea, coloración que se intensifica con el tiempo hasta que ya no destacan las manchas que se habían formado.

Se ha notado que no todas las proteínas tienen la propiedad de combinarse con la hemina, como por ejemplo la albúmina de huevo, pepsina, papaína, etc., y en este caso al revelar el cromatograma con benecidina aparece una mancha que corresponde únicamente a la hemina; la proteína se hace visible más tarde, pues aparece como mancha blanca, porque retarda la formación de la coloración de fondo.

Los autores separaron la gama-globulina aislada en dos fracciones por cromatografía bidimensional, usando como solvente en la primera dimensión un buffer de italato e hidróxido de sodio a pH 5, añadiéndole un 5% de sulfato de amonio o un 2% de ácido

oxálico, y en la segunda dimensión usan una solución de ácido tartárico al 2%.

La albúmina de huevo la hicieron migrar con soluciones de cloruro de sodio 0.1 *M* a diferentes pH, y con una solución reguladora de acetato. El pH lo variaron añadiendo pequeñas cantidades de ácido clorhídrico y de hidróxido de sodio diluidos. Obtuvieron unos valores *Rf* que varían entre 0.60 y 0.75 según el grado de acidez. La identidad de la albúmina la comprobaron por su propiedad de formar precipitinas con un antisuero específico obtenido de conejos inyectados con albúmina.

Franklin y Quastel siguieron trabajando sobre este tema, y publicaron un año más tarde un artículo en el que describen la separación del plasma en varias fracciones por el método de cromatografía bidimensional (6).

El camino que siguieron fué el siguiente: toman 0.5 ml de plasma que mezclan con 0.2 ml de una solución de hemina al 0.3%, que se usa como marcador de proteínas, y además le añaden una substancia activadora de superficie, como por ejemplo los Tween, los Span, etc.

De esta mezcla colocan por medio de una pipeta especial 0.02 ml en una esquina de un papel Whatmann N° 1 de 8" por 8".

A este papel se le da la forma de cilindro, pero de tal manera que no se toquen los bordes. Este cilindro se coloca en un recipiente plano que contenga el solvente, y todo esto se coloca dentro de una cámara cerrada, para conservar húmedo el ambiente.

El solvente asciende, arrastrando la proteína, y un poco antes de llegar al borde superior, se saca y se suspende para secarlo al aire. Una vez seco, se vuelve a rehacer el cilindro pero girando el papel 90°, y sumergiéndolo de la misma manera en un segundo solvente. Se saca, se seca y se revela el papirograma con una solución de benidina.

Los solventes usados por ellos son: en la primera dimensión una solución de suerosa 0.1 *M* y en la segunda tartrato doble de sodio y potasio 0.1 *M*.

De esta manera han tratado de hacer una comparación de los sueros humanos, de conejo, de cuy, de caballo, y de este último comparado con suero de caballo inmunizado contra la difteria.

Se ha visto que los resultados obtenidos añadiendo el activador de superficie son muy diferentes a aquellos en los que no se ha añadido, pues en las primeras se obtiene una mayor cantidad de bandas. Según los autores esto se debe a que el Tween ayuda a que

las proteínas no tiendan a aglomerarse tanto en presencia del activador de superficie.

Mitchell, Gordon y Haskins (21) lograron una separación parcial de tres enzimas en una pila cromatográfica, usando como solvente una solución de sulfato de amonio a diferentes pH y concentraciones, encontrando condiciones óptimas para la separación de cada enzima.

La concentración de las enzimas en las diferentes capas la comprobaron por métodos directos.

Swank, Franklin y Quastel (33) hicieron un estudio sobre los cambios proteicos del plasma de perros, que habían ingerido sustancias grasas y que habían sido inyectados con heparina. Analizaron el suero de sangre extraída a las 0, 3, 6, y 9 horas después de la digestión, y comprobaron que después de nueve horas el plasma ya tiene otra vez su composición normal. Se encontró también, por cromatografía bidimensional, que en el lapso de 0 a 9 horas después de la ingestión de grasas o heparina, hay cambios considerables en la composición proteica del plasma, cambios que también se comprobaron determinando el hematocrito, el tiempo de sedimentación, y otras constantes de la sangre.

El cambio del aspecto de los cromatogramas probablemente no es debido a una alteración completa del complejo protéico, sino que únicamente a que ciertas fracciones sean afectadas en uno u otro modo por los compuestos resultantes de la digestión de las grasas o por la heparina, y que por eso alteran la migración de todas las proteínas sobre el papel.

Para efectuar los cromatogramas usaron la técnica y los solventes de Franklin y Quastel ya mencionados antes.

Gross, Leblond, Franklin y Quastel (8), presentaron en 1950 un trabajo en el que entre otros experimentos obtienen cromatogramas bidimensionales de plasma normal y plasma radioactivo. Los solventes que usan son en la primera dimensión, un regulador de citrato de sodio 0.05 *M*, y en la segunda un regulador de ftalato a pH 7.

Para revelar las proteínas usan la bencidina, y para identificar los compuestos radioactivos ponen el cromatograma en contacto con una película de rayos X.

En todos estos trabajos no se puede decir, que se ha logrado más que una separación parcial, pues todos los cromatogramas están en forma de manchas barridas, y no como manchas aisladas como se ha visto en los cromatogramas de aminoácidos u otros compuestos.

Otra serie de trabajos que se han publicado con respecto a la cromatografía de proteínas, son aquellos en los que se combina el método cromatográfico con el electroforético.

Al principio aplicaron este método a los aminoácidos, obteniendo muy buenos resultados.

Haugaard y Kroner en 1948, hicieron migrar los aminoácidos ácidos, básicos y neutros en un papirograma mono-dimensional humedecido con un buffer de fosfatos y fenol a un pH de 6,2 y aplicando una corriente eléctrica a uno y otro lado del papel. Los electrodos que dieron mejor resultado fueron los de níquel, platino y aluminio, usándose estos en forma de cinta entremetida en los bordes del papel. (9)

Wieland y Fischer (37) separaron por este método el ácido glutámico, la alanina y la histidina en una hora, usando una solución reguladora de acetato a pH 5.

Aplicando este método a las proteínas, Sober, Kegeles y Gutter han separado las diferentes fracciones de la clara de huevo, comparando los resultados, con aquellos obtenidos por estudios electroforéticos de la misma muestra, y vieron que coincidían (27).

Durruum (5) usó el método por él llamado "Microelectroforético" para separar el suero humano en sus diferentes fracciones. Colocaba 0,01 ml de la muestra del suero sobre una tira de papel filtro larga y que está empapada de una solución reguladora de dietilbarbiturato de sodio 0,05 *M* a un pH de 8,6, y vió que aplicando una corriente de 350 voltios por espacio de 180 minutos, la separación de las diferentes fracciones era completa.

Terminando el desarrollo, se seca por diez minutos a 100°, se sumerge luego por espacio de 5 minutos en una solución saturada de HgCl en alcohol de 95°, que contenga 0,1 g % de azul de bromofenol. Se lava en corriente de agua y aparecen unas manchas azules correspondientes a las fracciones del suero.

El nombre que le corresponde a este método es realmente el de "microelectroforesis", y no el de "cromatografía aplicando corriente eléctrica", pues se ha comprobado que el papel sirve únicamente como soporte, y que las proteínas o los aminoácidos se comportan exactamente igual que si estuvieran en una solución de buffer que se está usando, y que se aplicara una corriente eléctrica.

Tiene muchas ventajas este procedimiento, pues se puede hacer todo un estudio electroforético con cantidades mínimas de suero o sustancia problema y en un lapso de tiempo mucho menor.

PARTE EXPERIMENTAL

APARATOS

Los aparatos que se usaron para el desarrollo de los cromatogramas se construyeron en el mismo laboratorio. La cámara para los cromatogramas descendentes en tiras, consiste en un recipiente de vidrio en forma de cilindro que en su parte superior lleva una plataforma sobre la que se colocan una serie de frasquitos de boca ancha que contienen el solvente, y que se tapa con un vidrio plano, aplicando vaselina en los bordes del recipiente.

Este aparato es muy cómodo para hacer pruebas comparativas a diferentes concentraciones, pH, etc., en una misma atmósfera y en las mismas condiciones de temperatura, pues en cada frasquito se puede colocar una solución diferente, y hacer el desarrollo de cada tira independientemente de los demás.

Para los desarrollos bidimensionales ascendentes, se usó una cámara cilíndrica de acero inoxidable, la cual lleva en el fondo un recipiente con el solvente, en el que se coloca el papel enrollado en forma de cilindro. La cámara se tapa con un vidrio plano, aplicando vaselina al borde.

Para los desarrollos bidimensionales descendentes, se usaron cámaras de vidrio especiales, descritas con más detalle en la tesis de F. Noriega, presentada en marzo de 1951.

SOLVENTES Y PAPEL.

Para el desarrollo de los papirogramas se probaron un gran número de solventes, tanto solventes orgánicos, como soluciones fenólicas y soluciones acuosas de sales inorgánicas, orgánicas, azúcares, aminoácidos, etc.

Hemos visto que los mejores resultados se obtienen con las soluciones acuosas de las sales orgánicas.

Para el desarrollo hemos usado principalmente una solución de salicilato de sodio Q.P. en agua destilada a una concentración 0.1 *M*. Se usaron también soluciones de concentraciones desde 0.01 *M* hasta 1.0 *M*. Para hacer variar el pH se añadieron pequeñas cantidades de ácido salicílico o hidróxido de sodio.

Otras soluciones que se usaron, y que dieron resultados semejantes son:

- Acetato de sodio 0.1 *M*.
- Acetato de potasio 0.1 *M*.
- Ascorbato de sodio 0.1 *M*.
- Oxalato de sodio 0.1 *M*.
- Oxalato de potasio 0.1 *M*.
- Citrato de sodio 0.1 *M*.
- Tartrato doble de sodio y potasio 0.1 *M*.
- Dextrosa 0.1 *M*.
- Sucrosa 0.1 *M*.
- Glucosa 0.1 *M*.
- Sacarosa 0.1 *M*.
- Glicina 0.1 *M*.

El papel usado en todos los casos fué papel Whatmann N° 1, por dar este los mejores resultados.

Hay que trabajar siempre con guantes de hule, para que no se contamine el papel con proteínas u otras sustancias que tiene uno constantemente en las manos, y que al revelar dan manchas que pueden conducir a una mala interpretación.

PROTEINAS

Los estudios verificados se hicieron sobre dos muestras diferentes de proteínas.

Una de ellas fué la fracción II + III (3), de un suero antitetánico precipitado por el método de Cohn. Esta fracción consiste principalmente de beta y gama globulinas.

Para usarlas se les disuelve en un regulador, a una concentración doble a la que se encuentran en el suero original. Para evitar malos resultados por una desnaturalización parcial de un día a otro, aun en el refrigerador, se preparó diariamente una muestra nueva.

Otra parte de los experimentos se hizo sobre albúmina de huevo fresca, obtenida de un huevo de gallina recientemente abierto, y aplicándola inmediatamente al papel.

ADICION DE LA MUESTRA

La muestra se tiene en un tubo capilar, del cual se aplica al papel en la marca previamente trazada sobre éste con un lápiz, por simple contacto, luego se seca al aire, dejándolo listo para efectuar el desarrollo.

Para estudios comparativos es preciso que la cantidad de muestra sea igual en cada una de las tiras, y en este caso se usaron unas pipetas capilares graduadas.

Estas pipetas se hicieron empleando termómetros rotos, que se adaptaron, cortándolos y esmerilando uno de los extremos. Se calibraron aprovechando la escala que tenían. Adaptándole todavía en uno de los extremos un tubo de hule, se puede manejar fácilmente y medir exactamente la cantidad de muestra que se desea.

DESARROLLO

Se usó para el desarrollo de las tiras el método de cromatografía descendente, por ser el más fácil en este caso.

En cambio en los cromatogramas bidimensionales se usó el método de ascensión capilar, dándole al papel la forma de un cilindro, pegándolo en la parte superior con una tirita de Durex, pero de tal manera que sus bordes no se toquen. Los cromatogramas, tanto ascendentes como descendentes, después de aplicarle la muestra, se colocan en la cámara, y no se les añade el solvente sino hasta después de algunas horas, con el fin de que se alcance un equilibrio entre el papel y la atmósfera de la cámara que debe estar saturada del solvente que se va a usar en el desarrollo. Una vez estabilizados, se añade el líquido por medio de un embudo especial de cola larga, sin abrir la cámara, y se prosigue el desarrollo.

REVELADO

Después del desarrollo se sacan los cromatogramas de la cámara y se suspenden entre dos placas de vidrio por uno de los extremos, dejándose secar a temperatura ambiente. Para hacer aparecer las manchas de las proteínas sobre el papel se probaron varios reactivos, tales como ácido nítrico concentrado, ácido pícrico, etc., habiendo empleado por último colorantes directos para lana, que actúan en

medio neutro o mejor ligeramente ácido, y que dieron magníficos resultados.

Estos colorantes se usan en la industria generalmente en caliente, e sea hirviendo el material con el colorante por un tiempo definido.

Por este motivo se efectuó el revelado de los cromatogramas en caliente.

Para esto sumergimos el papirograma ya seco, en una charola de acero inoxidable que contenía el colorante disuelto al 0.1% en agua. Se hervía por unos minutos, se sacaba con sumo cuidado y se sumergía enseguida en un baño de agua hirviendo, en el que se mantenía hasta que el papel es había decolorado lo suficiente para ver bien las manchas proteicas.

Este mismo procedimiento se probó con una solución al 1% del colorante, pero en este caso el papel se tiñe demasiado, y el contraste no es tan marcado, como con la solución más diluída.

Las charolas deben ser calentadas sobre unas planchas o parrillas eléctricas, con objeto de que el calentamiento sea uniforme, pues de otra manera la coloración del papel no es uniforme, y pueden aparecer partes más coloreadas y que falsean los resultados.

Como el calentamiento realmente es algo incómodo, y el papel húmedo y caliente se rompe con mucha facilidad al pasarlo de un baño al otro, por lo cual se trató de hacer el revelado en frío. Los resultados son igualmente buenos, solo que hay que dejar el papel más tiempo en contacto con el colorante, lavando después el papirograma bajo chorro de agua.

Los mejores resultados en el revelado se obtuvieron sumergiendo los cromatogramas por un instante en una solución alcohólica al 1% del colorante, y lavando inmediatamente bajo chorro de agua. Las manchas de las proteínas aparecen enseguida al lavar el papel, como partes más oscuras que destacan sobre fondo claro. Entre más se lava el papel con agua, se hace más pronunciado el contraste.

El método del alcohol tiene la ventaja de que el tiempo de coloración es más corto, pues es sólo un instante el que se necesita sumergir el cromatograma en la solución del colorante, y además el alcohol endurece el papel e impide así que se rompa con tanta facilidad.

El colorante que mejores resultados dió, y que se usó en todos los casos, fué el *Azul Brillante para lana BLN*, habiéndose probado también otros, que aunque hacen visibles las manchas, no se consigue un contraste tan marcado.

Los otros colorantes usados son:

Rojo Polar brillante 3 BN.

Violeta al ácido 6 B.

Erioglaucina N.Y.

Azul Polar brillante RAW.

Este método de revelar las proteínas tiene la ventaja sobre los anteriormente usados por otros autores (6 y 7) de que el problema se puede aplicar al papel tal cual, sin necesidad de añadirle hemina como marcador de proteínas, y que puede falsear los resultados.

Además no hay la necesidad de tomar la fotografía de los papirogramas inmediatamente después de revelarlos, pues se conservan indefinidamente con el mismo contraste, y no como en el caso de la bencidina que aparece una coloración de fondo, después de un tiempo, tan intensa, que se pierden las manchas de las proteínas.

EXPERIMENTO N° 1

La fracción II₃ - III de un suero antitetánico se aplicó a una serie de tiras de papel Whatmann N° 1 de 30 cms. de largo por 1 cm. de ancho. El desarrollo se hizo con diferentes soluciones fenoladas.

If I .—Agua saturada con fenol.

If II .—50% agua saturada con fenol y 50% suerosa 0.1 M.

If III .—50% agua saturada con fenol y 50% NaCl 0.1 M.

If IV .—Fenol saturado con agua.

If V .—90% fenol saturado con agua y 10% NaCl.

If VI .—Fenol al 80% con agua.

If VII .—90% fenol saturado con agua y 10% alcohol etílico.

If VIII.—50% fenol saturado con agua y 50% alcohol metílico.

If IX .—50% fenol saturado con agua y 50% Metil-cellosolve.

Las tiras, después del desarrollo, se sacan, se secan a temperatura ambiente y se revelan.

RESULTADOS:

Ninguno de estos solventes o mezcla de solventes dió buen resultado, pues o no migran las proteínas, o migran tan poco y en forma de barrida, que parece una colita adherida al punto donde se aplicó la muestra, no lográndose de este modo una separación de las proteínas.

EXPERIMENTO 1 "A"

Se repitió el experimento anterior, haciendo el desarrollo con la misma serie de soluciones fenoladas, pero añadiéndole a la muestra proteica o sea la fracción II + III tetánica, una pequeña cantidad de NaCN sólido.

RESULTADOS:

Los resultados obtenidos fueron análogos a los anteriores, no encontrándose una diferencia apreciable entre uno y otro.

EXPERIMENTO N° 2.

Se usó la fracción II + III y se hizo caminar con soluciones de metil-cellosolve a diferentes concentraciones.

2m I. —Metil-cellosolve al 80%.

2m II. —Metil-cellosolve al 90%.

2m III.—Metil-cellosolve al 95%.

RESULTADOS:

Las proteínas no migran absolutamente nada con este solvente, lo cual se puede emplear como método de diferenciación entre proteínas y aminoácidos por cromatografía.

EXPERIMENTO N° 3.

Fracción II + III de un suero antitetánico aplicada a tiritas de papel filtro, y desarrollándolas con soluciones acuosas de sales orgánicas y azúcares, a una concentración 0,1 M.

3a I. —Acetato de sodio.

3a II. —Ascorbato de sodio.

3a III. —Oxalato de sodio.

3a IV. —Oxalato de potasio.

3a V. —Acetato de potasio.

3a VI. —Citrato de sodio.

3a VII. —Salicilato de sodio.

3a VIII.— Tartrato doble de sodio y potasio.

3a IX. —Dextrosa.

3a X. —Glucosa.

- 3a XI ---Sucrosa.
3a XII ---Sacarosa.

RESULTADOS:

Ha habido en todos los casos una migración de las proteínas apareciendo una mancha alargada final o semifinal, y también en el sitio de la aplicación de la muestra queda una mancha de proteína. En algunos la mancha se presenta más barrida, cosa que es poco satisfactoria. Las soluciones que presentan la mancha mejor aislada, y con menor coloración en el punto original son: 3a VII, 3a I, 3a V, 3a VIII, 3a XI y 3a X, de las cuales hemos escogido el 3a VII para las demás investigaciones.

EXPERIMENTO N° 4.

Para estandarizar desde un principio las cantidades óptimas que deben usarse para hacer un papirograma en tiras de papel filtro Whatmann N° 1 de 30 cms. de largo, se hicieron pruebas comparativas, desarrolladas al mismo tiempo y bajo las mismas condiciones, pero variando las cantidades de muestra.

Se disolvieron 0,46 g de la fracción II + III de un suero anti-tetánico en polvo, en un regulador de fosfatos a pH 7,2, aforando a 10 ml, resultando una solución de doble concentración original. Con una pipeta graduada, de la que cada graduación corresponde a 5 gamas, se pusieron en una serie de tiras de papel filtro cantidades equivalentes a:

50, 100, 200, 300 y 400 gamas de muestra.

El desarrollo se hizo con una solución de salicilato de sodio 0.1 M, revelando después.

RESULTADOS:

No hubo barrido fuerte en ninguna de las pruebas, sin embargo en las tiras que tenían 50 y 100 gamas de solución protéica, las manchas son muy débiles, no alcanzando a colorearse bien debido a que la cantidad de muestra es demasiado pequeña. La cantidad óptima de muestra está entre 200 y 300 gamas de la solución de fracción II + III, cantidad que se usará en los demás ensayos.

EXPERIMENTO N° 4 "A"

La misma estandarización de las cantidades se hizo para la albúmina de huevo.

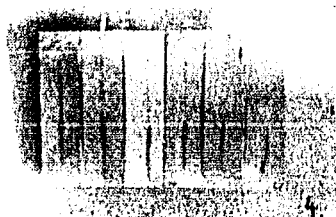
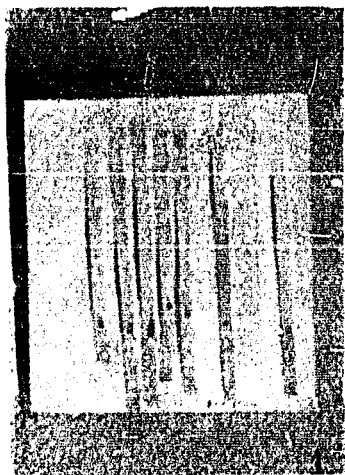
Se tomó la albúmina de huevo fresca sin diluir, y se pusieron sobre tiras de papel, y por medio de una pipeta graduada cantidades equivalentes a:

50, 100, 150, 200, 250 y 300 gamas de albúmina.

El desarrollo se hizo igualmente con una solución de salicilato de sodio 0.1 *M*, y a temperatura ambiente.

RESULTADOS:

Las cantidades óptimas en este caso están entre 100 y 150 gamas de albúmina. Un gran exceso de muestra se encontró en las tiras a las que se les puso 250 y 300 gamas de proteína, pues las manchas aparecen barridas y fuertemente teñidas.



EXPERIMENTO N° 5.

Se usó albúmina de huevo fresca, añadiendo una pequeña cantidad de Tween 20, y aplicándola a tiras de papel filtro de 1cm. de ancho, y haciendo el desarrollo con soluciones de salicilato de sodio a diferentes molaridades:

5s I Salicilato de sodio 0.1 *M*,

5s II Salicilato de sodio 0.2 *M*.

- 5s III ---Salicilato de sodio 0.3 *M*.
 5s IV ---Salicilato de sodio 0.4 *M*.
 5s V ---Salicilato de sodio 0.5 *M*.
 5s VI ---Salicilato de sodio 0.6 *M*.
 5s VII ---Salicilato de sodio 0.7 *M*.
 5s VIII ---Salicilato de sodio 0.8 *M*.
 5s IX ---Salicilato de sodio 0.9 *M*.
 5s X ---Salicilato de sodio 1.0 *M*.

RESULTADOS:

El desarrollo fué casi parejo en todas las tiras, no notándose un cambio apreciable en el tamaño de las manchas o en los valores del *Rf*.

EXPERIMENTO N° 6.

Como en muchos casos los bordes del solvente que avanza sobre el papel son algo irregulares, se trató de añadirle, no sólo a la muestra proteica, sino también al solvente que se va a usar para el desarrollo, un agente de superficie, para evitar que haya errores por esa causa. En este caso se usó la albúmina de huevo fresca añadida de Tween 20, y como solvente para el desarrollo se usó una solución de 500 ml de salicilato de sodio 0.1 *M* con 1 ml de Tween 20, que se mezclaron bien.

RESULTADOS:

Los resultados fueron desfavorables, pues la mancha de proteína se hace más final, y parece que el solvente es detenido en el sitio donde está la proteína, pues el borde presenta en este lugar una hendidura, que hace aparecer el borde todavía más irregular. La única ventaja que se podría sacar, es que la mancha que antes era alargada, ahora está más redonda y mejor delineada.

EXPERIMENTO N° 6 "A".

Otra substancia que se ensayó fué el Span 85, que es el sorbitan trioleato. Se usó albúmina de huevo fresca y como solvente se usó una solución de salicilato de sodio 0.1 *M*, añadiéndole unas gotas de Span 85, agitando fuertemente y filtrando por lana de vidrio, ya que casi no es soluble y se separa en forma de capa sobrenadante.

RESULTADOS:

El borde del solvente quedó perfectamente regular, y la mancha que parece tener un R_f algo menor que con el salicilato de sodio solo, presenta la misma forma que con éste.

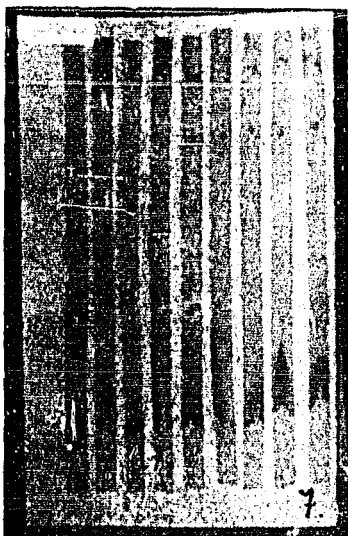
EXPERIMENTO N° 6 "B".

Se ensayó también el Span 20, que se puso en una serie de frasquitos que contenían 15 ml de una solución de salicilato de sodio 0.1 M , en cantidades de 1 a 4 gotas, y uno de testigo que únicamente tenía salicilato de sodio.

El Span 20 tampoco es muy soluble en agua, pero forma una emulsión muy fina y estable, así es que no se filtró.

RESULTADOS:

El efecto del Span 20 es casi nulo, haciendo la comparación con el testigo.



EXPERIMENTO N° 7.

Para ver si con el Tween se podía obtener un efecto menos marcado, en el que la mancha se redujera sin presentar el efecto de detenimiento del borde del solvente en el sitio de la proteína, se hizo este ensayo usando diferentes cantidades de Tween 20.

En 12 frasquitos que contenían cada uno 15 ml de una solución de salicilato de sodio 0.1 M , se añadieron de 1 a 12 gotas de Tween 20, y dejando un frasquito sin Tween como testigo.

RESULTADOS:

Entre mayor cantidad de Tween 20 se añade a la solución de salicilato de sodio, los bordes se vuelven más irregulares, ya que no

sólo presentan la hendidura en el frente de la proteína, sino que todo el borde está en forma de dientes. Se ha observado también que aumentando la cantidad de Tween 20 la mancha proteica se hace más difusa, más alargada, y parte de ella se reparte a lo largo del borde.

Aún con la menor cantidad de Tween 20 que añadimos, o sea una gota en 15 ml. el efecto fué muy marcado.

EXPERIMENTO N° 8.

La Tinovetina B, que es también un abatidor de la tensión superficial, se había usado mezclado con la proteína para que actuara como humectante de la proteína y aceptara así mejor el colorante.

Aquí se usó mezclado con el solvente para ver si se obtenían mejores resultados que con los otros agentes de superficie. Se usó albúmina de huevo fresca con Tween 20, y desarrollando los papirogramas con una solución de salicilato de sodio 0.1 *M* a la que se añaden cantidades variables de humectante. Una serie de frasquitos de 15 ml de capacidad que contienen la solución se les añade de 1 a 12 gotas de una solución de Tinovetina al 5%.

RESULTADOS:

El efecto de la Tinovetina sobre la migración de las proteínas es muy pequeño. Al aumentar la cantidad de humectante se nota que las manchas se hacen más finales.

EXPERIMENTO N° 9.

Cogiendo albúmina de huevo fresca con Tween 20, y haciendo el desarrollo con soluciones de salicilato de sodio a diferentes molaridades y añadiéndoles a cada uno una gota de Tween 20, en frasco de 15 ml:

- 9s I ---Salicilato de sodio 0.1 *M* más Tween 20.
- 9s II ---Salicilato de sodio 0.2 *M* más Tween 20.
- 9s III ---Salicilato de sodio 0.3 *M* más Tween 20.
- 9s IV ---Salicilato de sodio 0.4 *M* más Tween 20.
- 9s V ---Salicilato de sodio 0.5 *M* más Tween 20.
- 9s VI ---Salicilato de sodio 0.6 *M* más Tween 20.
- 9s VII ---Salicilato de sodio 0.7 *M* más Tween 20.
- 9s VIII ---Salicilato de sodio 0.8 *M* más Tween 20.

9s IX :—Salicilato de sodio 0.9 *M* más Tween 20.

9s X :—Salicilato de sodio 1.0 *M* más Tween 20.

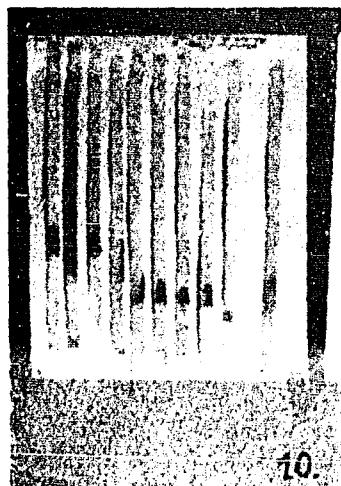
RESULTADOS:

En todos los casos se ve el efecto de Tween 20, sin embargo es mucho más marcado en la solución 0.1 *M*, y va haciéndose menos notable al aumentar la concentración.

En la solución molar la mancha ya se parece bastante a la que se obtiene con una solución molar sin haberle añadido Tween 20.

EXPERIMENTO N° 10

Se tomó albúmina de huevo, y se le añadió una pequeña cantidad de Tween 20. El desarrollo se hizo con una solución de salicilato de sodio 0.1 *M* a la que se le añadió una mezcla de Tween 20 y Span 20, para ver si el efecto de los dos juntos daba buen resultado.



Los mismos ensayos que se hicieron con la solución de salicilato de sodio 0.1 *M* se probaron con una solución de salicilato de sodio 1 *M*. Haciendo el desarrollo comparativamente con la solución sola, con la solución añadida de Tween 20, de Span 20, y de una mezcla de Tween 20 y Span 20. La proteína que se usó fué albúmina de huevo más Tween 20.



RESULTADOS:

El efecto del Tween 20 sobrepasa el del Span 20, apareciendo las manchas igual que si sólo se hubiera añadido Tween.

EXPERIMENTO N° 11.

Los mismos ensayos que se hicieron con la solución de salicilato de sodio 0.1 *M* se probaron con una solución de salicilato de sodio 1 *M*. Haciendo el desarrollo comparativamente con la solución sola, con la solución añadida de Tween 20, de Span 20,

RESULTADOS:

Los resultados fueron desfavorables, pues se obtuvieron unas manchas en forma de barrido desde el punto de aplicación de la muestra hasta el final. En los ensayos que llevan Tween 20 la mancha se bifurca en la parte más avanzada.

EXPERIMENTO N° 12.

La muestra proteica que se usó es albúmina de huevo con una pequeña cantidad de Tween 20, y se hace el desarrollo con soluciones de suerosa Q.P. a diferentes molaridades:

12su I	— Suerosa 0.1 M.
12su II	— Suerosa 0.2 M.
12su III	— Suerosa 0.3 M.
12su IV	— Suerosa 0.4 M.
12su V	— Suerosa 0.5 M.
12su VI	— Suerosa 0.6 M.
12su VII	— Suerosa 0.7 M.
12su VIII	— Suerosa 0.8 M.
12su IX	— Suerosa 0.9 M.
12su X	— Suerosa 1.0 M.

RESULTADOS:

La proteína aparece como mancha alargada semifinal en las concentraciones bajas, en cambio aumentando la concentración, la mancha se hace más final, inclusive se reparte la proteína a la largo del borde del solvente.

En los desarrollos que se hicieron con las soluciones de 0.6 a 1.0 M las manchas proteicas aparecen como con puntilleo, como si se hubiera precipitado la proteína.

EXPERIMENTO N° 13.

Albúmina de huevo fresca más Tween 20 y aplicada en tiras de papel filtro, fué desarrollada con una solución de tartrato doble de sodio y potasio 0.1 M, a la que se añaden diferentes cantidades de Tween 20. En frascos de 15 ml se añadieron cantidades de 1 a 5 gotas de Tween 20.

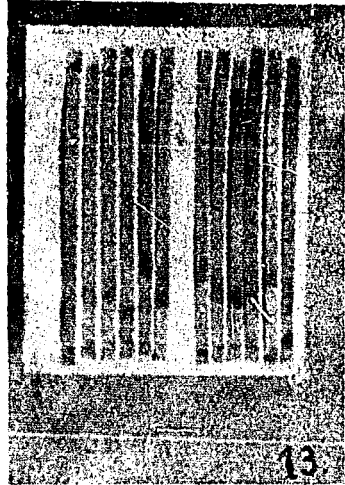
RESULTADOS:

El efecto del Tween 20 es muy marcado en todos los casos, apareciendo las manchas de la misma forma que con la mezcla de salicilato de sodio 0.1 *M* y Tween 20.

EXPERIMENTO N° 14.

Se usó albúmina de huevo fresca con Tween 20, que se aplicó a tiras de papel filtro, y haciendo el desarrollo con soluciones de acetato de sodio a diferentes molaridades:

14ac I	Acetato de sodio 0.1 <i>M</i> .
14ac II	Acetato de sodio 0.2 <i>M</i> .
14ac III	Acetato de sodio 0.3 <i>M</i> .
14ac IV	Acetato de sodio 0.4 <i>M</i> .
14ac V	Acetato de sodio 0.5 <i>M</i> .
14ac VI	Acetato de sodio 0.6 <i>M</i> .
14ac VII	Acetato de sodio 0.7 <i>M</i> .
14ac VIII	Acetato de sodio 0.8 <i>M</i> .
14ac IX	Acetato de sodio 0.9 <i>M</i> .
14ac X	Acetato de sodio 1.0 <i>M</i> .



RESULTADOS:

El desarrollo fué más o menos parejo en todos los casos, no encontrándose una diferencia apreciable entre unos u otros.

EXPERIMENTO N° 15.

Con objeto de experimentar nuevas soluciones, se hizo un desarrollo con soluciones de aminoácidos.

Se usó albúmina de huevo fresca y Tween 20 como muestra proteica y haciendo el desarrollo con soluciones de glicina a diferentes molaridades.

15g I	Glicina 0.1 <i>M</i> .
15g II	Glicina 0.2 <i>M</i> .
15g III	Glicina 0.3 <i>M</i> .
15g IV	Glicina 0.4 <i>M</i> .
15g V	Glicina 0.5 <i>M</i> .
15g VI	Glicina 0.6 <i>M</i> .

- 15g VII .— Glicina 0.7 *M.*
 15g VIII.— Glicina 0.8 *M.*
 15g IX .— Glicina 0.9 *M.*
 15g X .— Glicina 1.0 *M.*

RESULTADOS:

El desarrollo con los aminoácidos es análogo al que se obtuvo con las soluciones acuosas de las sales orgánicas. A medida que aumenta la concentración de la glicina, el valor Rf se acerca más a uno, o sea que se hace más final la mancha.

EXPERIMENTO N° 16.

Con objeto de conseguir valores Rf menores en el desarrollo de las proteínas se ensayaron soluciones más diluidas. Usando albúmina de huevo más Tween como muestra proteica, y haciendo el desarrollo con soluciones de suerosa a bajas concentraciones:

- 16su I .— Suerosa 0.01 *M.*
 16su II .— Suerosa 0.02 *M.*
 16su III .— Suerosa 0.03 *M.*
 16su IV .— Suerosa 0.04 *M.*
 16su V .— Suerosa 0.05 *M.*
 16su VI .— Suerosa 0.06 *M.*
 16su VII .— Suerosa 0.07 *M.*
 16su VIII. — Suerosa 0.08 *M.*
 16su IX .— Suerosa 0.09 *M.*
 16su X .— Suerosa 0.10 *M.*

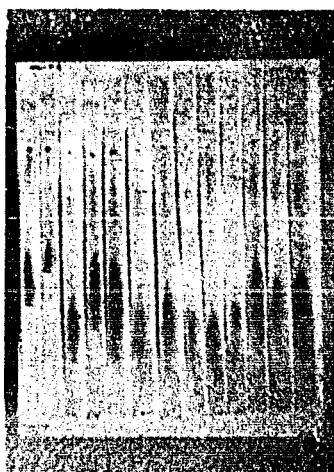
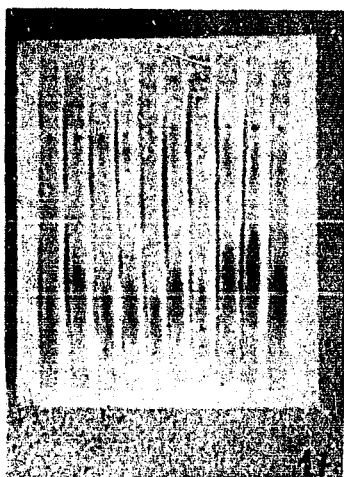
RESULTADOS:

Las proteínas migran perfectamente aún con la solución centésimo molar, notando que la mancha se retiene un poco, o sea que el valor Rf disminuye ligeramente.

EXPERIMENTO N° 17.

Lo mismo que en el experimento anterior se ha ensayado con el salicilato de sodio. Se usó albúmina de huevo más Tween 20, y el desarrollo se hizo con soluciones de salicilato de sodio a diferentes molaridades:

- 17s I Salicilato de sodio 0.01 *M*.
- 17s II Salicilato de sodio 0.02 *M*.
- 17s III Salicilato de sodio 0.03 *M*.
- 17s IV Salicilato de sodio 0.04 *M*.
- 17s V Salicilato de sodio 0.05 *M*.
- 17s VI Salicilato de sodio 0.06 *M*.
- 17s VII Salicilato de sodio 0.07 *M*.
- 17s VIII Salicilato de sodio 0.08 *M*.
- 17s IX Salicilato de sodio 0.09 *M*.
- 17s X Salicilato de sodio 0.10 *M*.



RESULTADOS:

El desarrollo es casi parejo en todos los cromatogramas pero haciéndose la mancha más final a medida que va aumentando la concentración.

EXPERIMENTO N° 18.

Para lograr que las proteínas migren menos de prisa se trató de mezclar una solución de salicilato de sodio, con la que migran casi hasta el final, con metil-cellosolve, con el cual no migran absolutamente nada.

Se usaron frasquitos con 10 ml de una solución de salicilato de sodio 0.1 *M*, y se añadieron a una serie de estos frascos de una a diez

gotas de metil-cellose al 95%. Se pusieron también dos frascos, uno con 75% de salicilato de sodio y 25% de metil-cellose, y el otro con 50% de salicilato de sodio y 50% de metil-cellose. Aparte se puso un frasco con puro salicilato de sodio como testigo.



RESULTADOS:

En los frascos en que se había añadido de 1 a 7 gotas de metil-cellose, el desarrollo es igual al del testigo, o sea que el metil-cellose no actuó apreciablemente. En cambio en aquellos que tienen de 8 a 10 gotas, o que tienen 25% y 50% de metil-cellose, actuó aparentemente en sentido contrario a lo que habíamos pensado, pues las manchas se hacen más finas, y el borde del solvente presenta un pico para dentro en el sitio de la proteína.

EXPERIMENTO N° 19.

Se aplicó albúmina de huevo más Tween 20 sobre una serie de tiras de papel filtro, y se hizo el desarrollo con metil-cellose al 95%, al que se le añadieron de 1 a 5 gotas de Tween 20, pues este último hace migrar las proteínas más de prisa cuando está en solución acuosa.

RESULTADOS:

La migración fué nula, o sea que en este caso el Tween 20 no tiene efecto alguno sobre la migración de las proteínas.

EXPERIMENTO N° 20.

En este experimento se mezcló la albúmina de huevo con una cantidad igual de glicina, y se aplicó por medio de una pipeta a una serie de tiras de papel filtro, y se hizo el desarrollo con soluciones de glicina 0.1 *M*, sucrosa 0.1 *M* y salicilato de sodio 0.1 *M*, y comparando con otras tiras desarrolladas al mismo tiempo y que tenían albúmina sola.

RESULTADOS:

Se observó que la glicina no influye en el desarrollo de las proteínas sobre el papel filtro, pues los resultados de unos y otros fueron análogos.

EXPERIMENTO N° 21.

En todos los papirogramas que se han hecho, se ha notado que siempre queda una mancha de proteína más o menos teñida en el punto de aplicación de la muestra, que puede ser una fracción proteica que no migra con los solventes usados, o que sea parte de la proteína que ya se ha desnaturalizado. Para evitar que hubiera una desnaturalización por efecto de la temperatura se hicieron desarrollos completos en la cámara frigorífica.

Se dejaron las cámaras de desarrollo toda una noche a 0°. La muestra se aplicó a las tiras también a 0° y se prosiguió luego a hacer el desarrollo con soluciones frías de glicina 0.1 *M*, suerosa 0.1 *M* y salicilato de sodio 0.1 *M*.

RESULTADOS:

El descenso de temperatura afecta algo a la migración de las proteínas, pues en algunos casos los valores del *R_f* disminuyen un poco, en cambio la mancha de proteína en el sitio de aplicación de la muestra no desaparece, sino que queda exactamente igual que si se hace el desarrollo a temperatura ambiente.

EXPERIMENTO N° 22.

Se puso albúmina de huevo sobre una serie de tiras de papel Whatmann N° 1, y se desarrollaron con soluciones de salicilato de sodio 0.1 *M* a diferentes pH. Estos valores de pH se obtuvieron añadiendo a la solución de salicilato de sodio original, que tiene un pH de 6.4, pequeñas cantidades de ácido salicílico y de sosa.

Los pH que se ensayaron fueron:

3.6 — 4.3 — 5.2 — 6.5 — 7.6 — 8.5 — 10.1 — 11.4 y 11.8

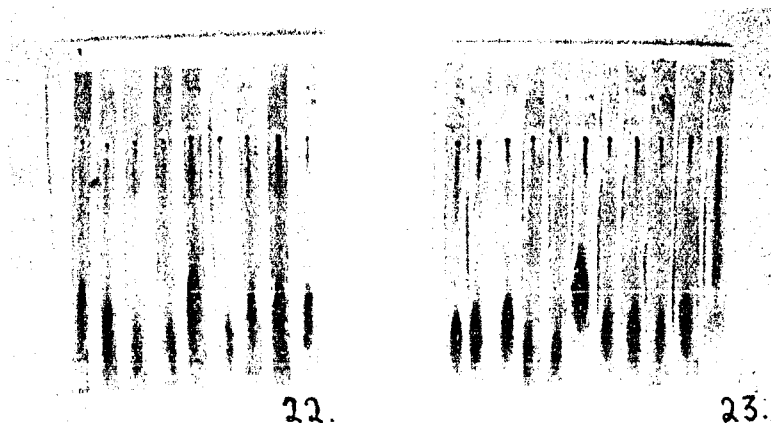
RESULTADOS:

Las variaciones del pH dentro de los límites que se usaron no

tienen efecto apreciable sobre la migración de las proteínas, apareciendo todos los cromatogramas con los mismos valores del Rf.

EXPERIMENTO N° 23.

A otra serie de tiras de papel filtro se les puso albúmina de huevo y desarrollándolas con soluciones de glicina 0.1 *M* a diferentes pH.



Se tomó una solución de glicina 0.1 *M* que por sí sola tiene un pH se 5.1 y añadiéndole cantidades pequeñas de soluciones diluidas de ácido clorhídrico y sosa. Los pH que se ensayaron fueron:

2.6 — 3.5 — 4.0 — 5.1 — 6.6 — 7.1 — 7.6 — 8.1 — 8.4 — 9.1 y 9.5

RESULTADOS:

El desarrollo fué parejo entre los valores de pH de 3.5 a 9.5, en cambio en aquel que tenía pH 2.6 no existe más que un barrido desde el punto de aplicación de la muestra hasta la mitad del campo y que está bifurcado en la parte anterior.

EXPERIMENTO N° 24.

En los experimentos anteriores se usaron tiras de papel Whatmann N° 1 de 30 cms. de largo, y en la mayor parte de los casos se

presenta la mancha original, luego otra en forma de barrido que está unida a la anterior, y por último la mancha final que es la más intensa.

En este caso se usaron tiras de papel de 60 cms. de largo para ver si desaparecía la mancha central barrida, pensando que no era bastante el tiempo de migración.

Se hicieron las pruebas con una serie de soluciones de glicina 0.1 *M* y salicilato de sodio 0.1 *M* a los diferentes valores de pH citados en los últimos experimentos.

RESULTADOS:

Al revelar los papirogramas se vió que las tiras largas presentan las mismas manchas que se habían observado en las cortas.

EXPERIMENTO N° 25.

Para completar los solventes usados se hicieron unos ensayos con soluciones acuosas de sales inorgánicas como solventes en la migración de proteínas.

NaH_2PO_4 0.1 *M*.

Na_2HPO_4 0.1 *M*.

Na_3PO_4 0.1 *M*.

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1 *M*.

NaCl 0.1 *M*.

RESULTADOS:

Los resultados obtenidos son análogos a los que se obtuvieron con las soluciones acuosas de sales orgánicas, pues se presenta una mancha semifinal de forma alargada aparte de una pequeña mancha en el punto de aplicación de la muestra.

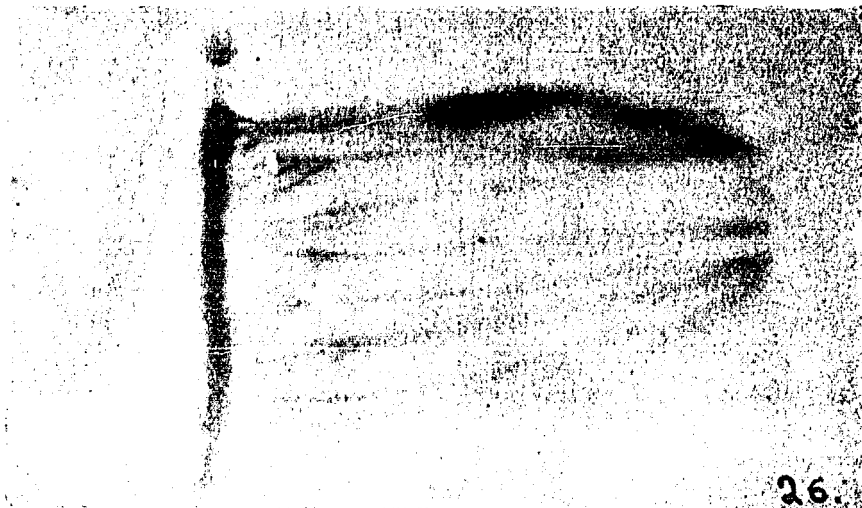
CROMATOGRAMAS BIDIMENSIONALES

Para hacer los cromatogramas bidimensionales, se corta el papel filtro Whatmann en cuadros de 25 cms. de lado. La muestra se coloca, por medio de una pipeta graduada, en una de las esquinas del papel a 5 cms. de cada lado.

Se coloca el papel en las naves de desarrollo descendente, se

deja equilibrar por algunas horas, y se añade luego al solvente que se va a usar para el desarrollo del papirograma.

Una vez hecho el desarrollo se saca de la cámara, se deja secar a temperatura ambiente, y se vuelve a colocar en la cámara con un solvente diferente haciendo girar el papel 90° . Se saca, se deja secar y se revela con los mismos colorantes que se usaron en los experimentos anteriores.



EXPERIMENTO N° 26.

Se utilizó la fracción II - III de un suero antitetánico, y se aplicó por medio de una pipeta graduada una gota en la esquina de un papel filtro de las dimensiones antes citadas. Se hizo el desarrollo con una solución de salicilato de sodio $0.1 M$. Se saca, se deja secar a temperatura ambiente y el segundo desarrollo se hizo con una solución de tartrato doble de sodio y potasio $0.1 M$.

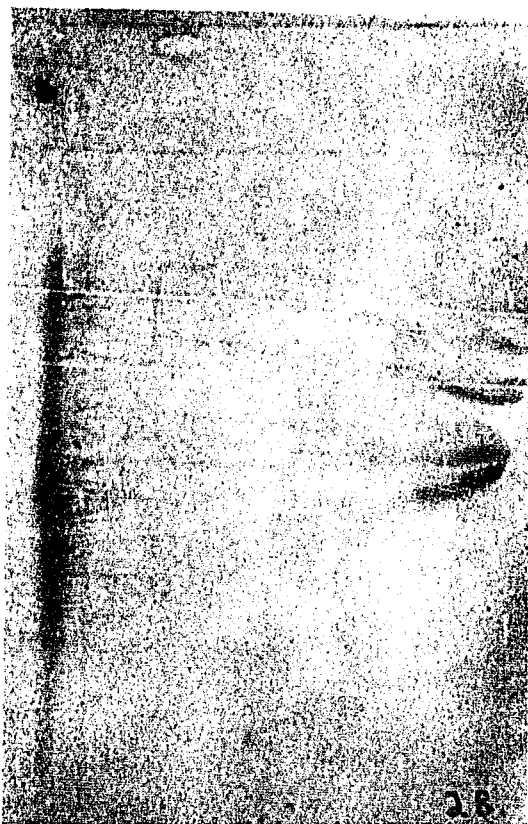
RESULTADOS:

En la primera dimensión se obtiene una mancha alargada, y en la segunda se obtienen una serie de manchas alargadas una junto de otra, que tratan de juntarse todas en la línea media. Cada una de estas manchas parece que se forma por una serie de canalillos que nacen en la mancha del primer desarrollo y que convergen al

avanzar el solvente. Se pueden observar también la mancha original, o sea el punto de aplicación de la muestra de proteína, y la mancha del primer desarrollo.

EXPERIMENTO N° 27.

La fracción II + III, adicionada de Tween 20, se desarrolló en un papírograma descendente, en la primera dimensión con tartrato



doble de sodio y potasio $0.1 M$ y en la segunda dimensión con una solución de sulfato de sodio $0.1 M$, o sea que se usaron los mismos solventes que en el experimento anterior, cambiando únicamente el orden.

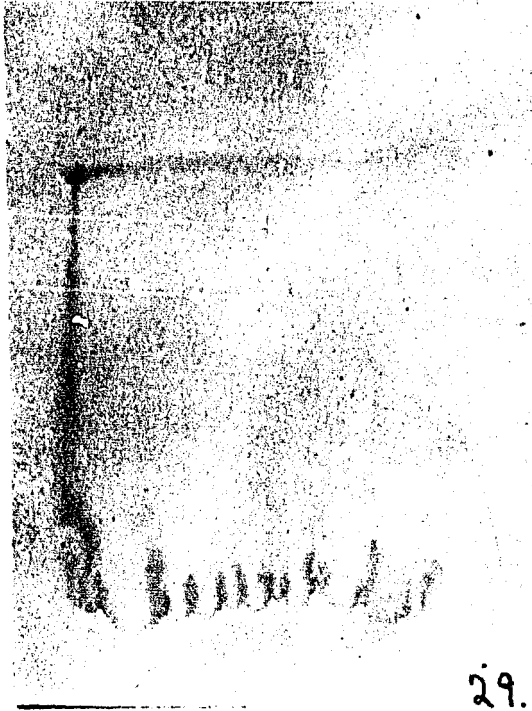
RESULTADOS:

Se obtuvo un desarrollo parecido al anterior, que tiene las mis-

mas características, con la diferencia que se obtuvieron únicamente 5 bandas.

EXPERIMENTO N° 28.

Como muestra proteica se tomó albúmina de huevo, adicionándosele Tween 20, y se hizo un desarrollo bidimensional. En la pri-



mera dimensión se usó una solución de salicilato de sodio 0.1 *M* y en la segunda una solución de tartrato doble de sodio y potasio 0.1 *M*.

RESULTADOS:

Se obtuvieron 4 ó 5 bandas en la segunda dimensión, pero a medida que se hace el desarrollo tratan de juntarse, pues todas tienen

la tendencia de dirigirse a la línea media. Aparecen, también, la mancha original y la que se formó al hacer el desarrollo en la primera dimensión.

EXPERIMENTO N° 29.

En este caso se usó albúmina de huevo más Tween 20 como muestra proteica, y para el desarrollo se usó una solución de salicilato de sodio 0.1 *M* a la que se le añadió una pequeña cantidad de Tween 20. El desarrollo en la segunda dimensión se hizo con una solución de tartrato doble de sodio y potasio que también contiene una pequeña cantidad de Tween 20.

RESULTADOS:

Los resultados fueron exactamente iguales, con la diferencia de que las manchas en el segundo desarrollo siguen de frente sin desviarse hacia la línea media. El borde del solvente se hace más irregular por el Tween 20 que se añadió.

EXPERIMENTO N° 30.

Para asegurarnos si se trataba realmente de dos fracciones diferentes de las cuales una camina con un solvente y la otra con el segundo solvente, se probó un papirograma bidimensional usando en ambos sentidos el mismo solvente.

Se usó albúmina de huevo fresca con Tween 20, y se desarrolló en ambos sentidos con una solución de salicilato de sodio 0.1 *M*.

El papirograma que se obtuvo se parece mucho a los que se obtuvieron anteriormente usando dos solventes diferentes, o sea que aparece la mancha original, una mancha barrida de la primera dimensión y unas bandas que se obtienen al hacer el desarrollo en la segunda dimensión.

EXPERIMENTO N° 31.

Se tomó una pequeña gota de un hidrolizado enzimático parcial del suero antitetánico adicionado de glicina, y se puso sobre un papel filtro de 25 x 25 cm. El desarrollo se hizo ascendente en una cámara especial. Se enrolla el papel filtro de manera que quede en forma de cilindro, pero sin que se toquen los bordes. Se coloca en

la cámara y se añade el solvente que se va a usar en la primera dimensión, que en este caso es una solución de salicilato de sodio 0.1 M. El desarrollo en la segunda dimensión se hizo con una solución de tartrato doble de sodio y potasio. Los cromatogramas se hicieron por duplicado, revelando uno con *azul brillante para lana BLS*, para ver en qué forma habían migrado las proteínas, y el otro se reveló con ninhidrina para identificar la posición de los aminoácidos.

RESULTADOS:

Los aminoácidos, o sea en este caso la glicina, aparece como una mancha bien definida, tanto al revelar después de la primera dimensión, como al hacerlo después del desarrollo completo. Con ambos solventes tiene un valor Rf grande. Con el primer solvente el valor del Rf está alrededor de 0.7 y en el segundo caso alrededor de 0.8. No aparecen otras manchas de aminoácidos, ni queda ningún rastro en el sitio de aplicación de la muestra.

Las proteínas casi no son visibles por encontrarse en pequeña cantidad. Al revelar después de la primera dimensión con *Azul brillante para lana BLS* aparece una mancha barrida, poco teñida, desde el punto de aplicación de la muestra casi hasta el final.

Si se revela después del segundo desarrollo no se ve ninguna mancha proteica definida, sin embargo a lo largo del borde del solvente aparecen sitios más teñidos que pueden ser proteínas.

EXPERIMENTO N° 32.

Se tomó el mismo hidrolizado con glicina, del cual se puso una gota en una esquina de un papel Whatmann N° 1 de 50 x 50 cm. y se hizo un desarrollo bidimensional descendente, usando en la primera dimensión metil-cellosolve al 95% y en la segunda fenol al 80%.

Se hizo por duplicado el desarrollo, revelando igualmente que en el caso anterior, uno con ninhidrina, y el otro con colorante directo para lana.

RESULTADOS:

Al revelar con ninhidrina, la glicina aparece como mancha bien definida, y con sus valores de Rf característicos cuando se hace migrar con estos solventes, que han sido determinados ya por otros autores.

No se observa la presencia de ningún otro aminoácido que pudiera tener el hidrolizado.

Si se revela con Azul Brillante para lana BLN después de la primera dimensión, la proteína ha quedado en su sitio original, y después de la segunda dimensión, se observa una migración completa de la proteína. Aparte de esto se observan las manchas a lo largo del borde del fenol, como en el caso anterior.

EXPERIMENTO N° 33.

Se hizo un desarrollo bidimensional descendente, usando en la primera dimensión metil-cellosolve al 95% y en la segunda fenol al 80%, pero sin poner ninguna clase de muestra sobre el papel, con el objeto de ver si las manchas que se observan a lo largo del borde del solvente son verdaderamente parte de las proteínas que se colocaron como muestra, o si son únicamente sustancias que de por sí contiene el papel, y que el solvente arrastra a su paso.

RESULTADOS:

Al revelar el papel con el Azul Brillante para lana BLN se observaron a lo largo del borde del fenol, que fué el solvente que se usó en la segunda dimensión, una serie de manchas alargadas perpendiculares al borde. Estas manchas son más intensas y aparecen con más frecuencia en el sitio de mayor avance del metil-cellosolve, que fué el solvente del primer desarrollo. Así se comprueba que estas manchas se deben únicamente a productos de naturaleza desconocida pero que se tiñen con los colorantes, que arrastran los solventes a su paso, y que son naturales del papel filtro.

DISCUSION Y RESULTADOS

Con la idea de ampliar el campo de la papirografía al estudio de los sistemas proteicos, se llevaron a cabo una serie de pruebas sistemáticas para tratar de determinar si era posible efectuar la migración de las proteínas en papel filtro, para lo cual se hizo uso de distintos solventes, en varias condiciones de temperatura, concentración, pH, etc.

Durante el curso de estas investigaciones aparecieron algunos trabajos (6, 7, 8, 20 y 33), enfocados hacia el mismo fin, pero nuestros resultados nos llevaron hacia conclusiones distintas, como se verá más adelante.

En los experimentos 1 y 1 A, se vió que las proteínas no migran, o lo hacen muy escasamente con las soluciones fenoladas, tanto de alta como de baja concentración.

Igualmente, los cellosolves puros o adicionados de modificadores de la tensión superficial, no hacen migrar a las proteínas en lo absoluto.

En cambio, las soluciones acuosas de un gran número de sales inorgánicas y orgánicas, azúcares, aminoácidos, etc., hacen migrar a las proteínas, sin que se haya podido lograr hasta ahora una separación correcta de ellas.

Esto se observa claramente en el experimento 3, en el que se probaron doce soluciones diferentes de compuestos orgánicos, tales como: acetato de sodio, acetato de potasio, oxalato de sodio, oxalato de potasio, ascorbato de sodio, tartrato doble de sodio y potasio, salicilato de sodio, citrato de sodio, dextrosa, sucrosa, sacarosa y glucosa, todas a una concentración 0.1 M.

En las doce muestras se obtuvieron resultados análogos, pues en todas ellas se ve una mancha en el punto de aplicación de la muestra proteica, y otra, de forma alargada, en el otro extremo de papel, o sea a la altura del borde del solvente. En algunas el valor Rf es mayor que en otras, pero con poca diferencia. Se observó también

que con algunos azúcares y sales, la mancha original es más intensa, debido seguramente a que hay mayor desnaturalización en presencia de dichos compuestos.

En el experimento 15 se trató de hacer migrar las proteínas con soluciones de glicina, obteniéndose una migración similar a la de las sales orgánicas y azúcares antes mencionados.

En el experimento 25 se usaron soluciones acuosas de una serie de sales inorgánicas, tales como: fosfato monosódico, fosfato disódico, fosfato trisódico, sulfato de amonio, cloruro de sodio, etc., y se ve que se consigue una migración idéntica que en el caso de las sales orgánicas, o sea que las proteínas migran en forma global casi a la misma velocidad a la que migran los solventes, pues después de revelar se observa una mancha semifinal, además de la pequeña mancha en el punto de origen.

La variación de la concentración de las soluciones acuosas tiene muy poca acción sobre la migración de las proteínas. Esto se vió al hacer una migración comparativa con soluciones de salicilato de sodio, acetato de sodio, suerosa, etc., a diferentes concentraciones. Los desarrollos se hicieron simultáneamente, habiendo variado las concentraciones desde 0.01 *M* hasta 1.0 *M*, encontrándose únicamente un ligero aumento en los valores del *R_F* al aumentar la concentración.

Las concentraciones altas de azúcares hacen aparecer la mancha proteica más difusa y como con puntilleo, lo cual hace pensar que las proteínas se han precipitado sobre el papel debido a la alta concentración de la solución.

Las variaciones de temperatura, dentro de los límites usados en el laboratorio (de 0° a 37°C) no afectan notablemente la velocidad de movimiento de las proteínas sobre el papel, ni influyen de una manera marcada en la mayor o menor desnaturalización de las proteínas, pues los cromatogramas desarrollados a diferentes temperaturas, tienen las mismas características.

En los experimentos 22 y 3, se vió que el pH se puede variar dentro de límites muy amplios, sin que afecte la migración de las proteínas, en cambio si se exceden estos límites, llega cierto punto, en que la migración se hace más lenta, la mancha está barrida y se encuentra bifurcada en su extremo anterior. Esto es debido seguramente a que ya en ese momento se ha rebasado el punto isoeléctrico de la proteína.

Por los experimentos verificados, se ve que el Tween 20 añadido a la muestra proteica tiene cierta acción sobre la migración de ellas.

en cambio si el Tween 20 se añade a la solución que se va a usar para el desarrollo, la acción es muy marcada, pues los bordes del solvente se vuelven más irregulares y la proteína es arrastrada hasta el final, repartiéndose parte de ella en el mismo borde.

El efecto del Span 20, Span 80 y Span 85, es menos marcado que el Tween 20, y en sentido inverso, pues la mancha proteica en presencia de estas sustancias se hace menos final, y los bordes generalmente se hacen más irregulares.

En presencia de una mínima cantidad de Tween 20, la acción de los Span es nula, o por lo menos no es notoria en los experimentos.

Otras sustancias añadidas a la muestra proteica, tales como NaCN, NaCl, Glicina, etc., no tienen una acción apreciable sobre la migración de las proteínas en el papel filtro.

En los cromatogramas bidimensionales, desarrollados con dos solventes diferentes, se obtuvieron: una mancha en el punto original, o sea el punto de aplicación de la muestra, otra alargada procedente de la primera dimensión y una serie de canales que nacen en esta última mancha, y que al avanzar se juntan, formando una serie de bandas paralelas una a otra, perpendicular al borde del segundo solvente.

Se puede pensar que hay una separación por lo menos en tres fracciones, o sea, una que no migró absolutamente nada, otra que migró únicamente con el primer solvente, y una tercera que migra con ambos solventes. Se comprobó con el experimento 30, que esto no es correcto, pues usando en ambas dimensiones el mismo solvente, se presenta esta misma separación, lo cual indica que las manchas original y la de la primera dimensión, son restos de proteínas desnaturalizadas, que van quedando adheridos al papel sin que migren al paso del solvente.

La serie de bandas que se forman en la segunda dimensión, habían sido interpretadas por otros autores (6), como componentes de una mezcla de proteínas; pero como este cromatograma no es reproducible haciendo migraciones con solventes alternados, y además el número de bandas varía mucho si se le añade un agente de superficie, seguramente que estas bandas no corresponden a diferentes fracciones proteicas, sino que son partes de la proteína que se desprenden a lo largo de la mancha barrida de la primera dimensión al paso del segundo solvente, sin que su número tenga relación directa con el número de componentes de la mezcla.

De lo anterior se ve claramente, que el efecto de desnaturalización es tan fuerte, y que se presenta tan rápido, que no se logra en

ningún caso una migración de las proteínas completas, y que por esa causa no se pueden obtener separaciones de proteínas sobre el papel, a no ser que se encuentren condiciones o solventes especiales en los que dicha desnaturalización no se lleve a cabo, por lo menos durante el desarrollo cromatográfico.

Los métodos de cromatografía usados, pueden ser empleados para estudiar la acción de ciertas sustancias sobre las proteínas, así como para la separación de compuestos que acompañen a ésta, de tal manera es posible la separación cromatográfica de aminoácidos, hidratos de carbono, etc., que acompañan a los sistemas proteicos; además de ser posible en ciertos casos estudiar el efecto de otras sustancias, tales como grasas, hormonas, enzimas, modificadores de la tensión superficial en general, etc., sobre las proteínas ya que estas sustancias alteran notablemente la distribución de ellas en los papirogramas.

S U M A R I O

1.—Se logró revelar la proteína en papel filtro por un método rápido, sensible y reproducible, empleando "colorantes directos para lana".

2.—Se efectuó la migración de proteínas en papel filtro, pero observándose marcada desnaturalización, debida probablemente al contacto con el papel poroso.

3.—No hay posibilidad de reproducir análisis haciendo migraciones con solventes alternados.

4.—Hay posibilidad de separar los aminoácidos, hidratos de carbono, etc., de las proteínas.

5.—Se observó un marcado efecto de los modificadores de la Tensión Superficial, grasas, etc., sobre la migración de las proteínas.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—Bull, H. B., Hahn, J. W. y Baptist, V. H.
J. Am. Chem. Soc., 71, 550 (1949).
- 2.—Clegg, D. L.
Anal. Chem., 22, 48 (1950).
- 3.—Cohn, E. J.
Proteins, aminoacids and peptides.
Reinhold Publ. Corp. Nueva York (1943).
- 4.—De Vault, D.
J. Am. Chem. Soc., 65, 532 (1943).
- 5.—Durrum, E. L.
J. Am. Chem. Soc., 72, 2943 (1950).
- 6.—Franklin, A. E. y Quastel, J. H.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 74, 803 (1950).
- 7.—Franklin, A. E. y Quastel, J. H.
Science, 110, 447 (1949).
- 8.—Gross, J., Leblond, C. P., Franklin, A. E. y Quastel, J. H.
Science, 111, 605 (1950).
- 9.—Haugaard, G. y Kroner, T. D.
J. Am. Chem. Soc., 70, 2135 (1948).
- 10.—Le Rosen, A. L.
J. Am. Chem. Soc., 64, 1909 (1942).
- 11.—Le Rosen, A. L. y Rivet, Ch. A.
Anal. Chem., 20, 1093 (1948).
- 12.—Longenecker, W. H.
Science, 107, 23 (1948).
- 13.—Longenecker, W. H.
Anal. Chem., 21, 1402 (1949).
- 14.—Ma, M. R. y Fontaine, T. D.
Science, 110, 232 (1949).

- 15.—Martin, A. J. P.
Endeavour, 6, 21, 15 (1947).
- 16.—Meinhard, J. E. y Hall, N. F.
Anal. Chem., 21, 185 (1949).
- 17.—Meinhard, J. E. y Hall, N. F.
Anal. Chem., 22, 344 (1950).
- 18.—Meinhard, J. E.
Science, 110, 387 (1949).
- 19.—Mellon, E. F., Korn, A. H. y Hoover, S. R.
J. Am. Chem. Soc., 70, 1145 (1948).
- 20.—Mitchell, H. K. y Haskins, F. A.
Science, 110, 278 (1949).
- 21.—Mitchell, H. K., Gordon, M. y Haskins, F. A.
J. Am. Chem. Soc., 180, 1071 (1949).
- 22.—Müller, R. H. y Clegg, D. L.
Anal. Chem., 21, 1123 (1949).
- 23.—Noriega, F.
Tesis presentada en 1951, México, D. F.
- 24.—Rockland, L. B. y Dunn, M. S.
Science, 109, 539 (1949).
- 25.—Rockland, L. B. y Dunn, M. S.
Science, 111, 332 (1950).
- 26.—Rutter, L.
Nature, 161, 435 (1948).
- 27.—Sober, H. A., Kegeles, G. y Gutter, F. J.
Science, 110, 564 (1949).
- 28.—Steward, F. C., Stepka, W. y Thomson, J. F.
Science, 107, 451 (1948).
- 29.—Strain, H. H.
Anal. Chem., 22, January (1950).
- 30.—Strain, H. H.
Chromatographic Adsorption Analysis,
Interscience Publishers, Inc.
New York, N. Y. (1945).
- 31.—Strain, H. H.
Anal. Chem., 21, 75 (1949).
- 32.—Strain, H. H.
J. Am. Chem. Soc., 64, 1013 (1942).

- 33.—Swank, Franklin y Quastel.
- 34.—Tiselius, A.
Chem. & Ind., 189, 90 (1948).
- 35.—Turba, F.
Z. Vitamis-Hormon- u Fermentforsch., 2, 18 (1948).
- 36.—Urbach, K. F.
Science, 109, 259 (1949).
- 37.—Wieland, T. y Fischer, E.
Naturwissenschaften, 35, 29 (1949).
- 38.—Williams, J. R. y Kirby, H.
Science, 107, 481 (1948).
- 39.—Wilson, N. J.
J. Am. Chem. Soc., 62, 1583 (1940).
- 40.—Winsten, A. W.
Science, 107, 605 (1948).
- 41.—Wolfson, W. O., Cohn, C. y Devaney, W. A.
Science, 109, 541 (1949).
- 42.—Yanofsky, Ch., Wassermann, E. y Bonner, D. M.
Science, 111, 61 (1950).
- 43.—Zechmeister, L. y Cholonoky, L.
Principles and Practice of Chromatography.
2nd Ed. John Wiley & Sons, Inc.
Nueva York, N. Y., (1942).