

INSTITUTO DE QUIMICA BIOLOGICA

Universidad de Concepción (Chile)

Director: Prof. Dr. A. Moena Gómez

## Investigaciones cromatográficas de Amino-ácidos libres y de hidrolizados proteicos en líquidos biológicos.

P O R

Alberto Moena Gómez, Arsenio Morán, Leopoldo Pavese  
y colaboradores (\*)

### INTRODUCCION

Desde hace tres años, en nuestro Instituto se ha venido aplicando la técnica cromatográfica, como metódica de trabajo, en la investigación de la composición química, de diversos líquidos biológicos.

Los resultados obtenidos, como las metódicas empleadas han sido dadas a conocer, con todo detalle, en varias tesis de prueba (1, 2, 3, 4, 5) y han significado un aporte a la comprobación de la utilidad y eficacia de la cromatografía sobre papel, como también una contribución al estudio de la composición en amino-ácidos libres y de las fracciones proteicas de dichos líquidos biológicos.

En el presente trabajo daremos a conocer en conjunto el resultado de nuestras experiencias, indicando específicamente algunas modificaciones a ciertas metódicas clásicas de cromatografía, que hemos aplicado y que hemos estimado de utilidad darlas a conocer, pues además de significar simplificación a la técnica recomendada por investigadores extranjeros, representan la experiencia obtenida por nosotros hasta el momento.

(\*) H. Krause, R. Massone, R. Sánchez, E. Garcés y R. González.

## MATERIAL Y REACTIVOS

### 1. CAMARAS DE CROMATOGRAFIA

Además de las cámaras Shandon hemos empleado cámaras fabricadas en el Instituto y que pueden considerarse, prácticamente como de vidrio, ya que en la superficie interior de ellas se ha evitado, en el ajuste de las placas, la presencia de materiales metálicos y resinas. De esta manera se impide la posible solubilización de dichos materiales y la posibilidad, por tanto, de aparición de manchas de este origen en el papel, lo que es frecuente e induce, lógicamente, al ser revelado el cromatograma a errores de interpretación.

En general, el resto del material empleado (cápsulas, pinzas, etc.) ha sido preferentemente de vidrio.

### 2. PAPEL FILTRO

El papel empleado fue Whatman N° 1. Los ensayos efectuados con otro tipo de papel a nuestro alcance, han dado cromatogramas menos satisfactorios, ya sea en contenido de impurezas o por una velocidad de adsorción no apropiada para los fines perseguidos (6, 7, 2).

### 3. SOLVENTES

Al estudiar la composición de las proteínas constituyentes de numerosos líquidos biológicos (1, 2, 4, 5), nos han sido especialmente útiles los solventes universales a base de fenol saturado de agua y butanol acético saturado de agua, dejando el uso de solventes especiales para investigaciones específicamente intencionadas que no constituyeron el propósito central de este trabajo. Sin embargo, muchos de ellos son de gran utilidad en la separación de amino-ácidos, que con los solventes anteriores daban manchas de R<sub>f</sub> muy cercanos y de difícil individualización. Se detallan a continuación:

a) **Fenol tamponado a pH 2:** La solución madre de fenol se satura con un tampón a base de cloruro de potasio, y ácido clorhídrico (1,3).

b) **Butanol a pH 12:** Saturamos el alcohol con un tampón formado por fosfato bisódico e hidróxido de sodio (9), que reemplaza al ácido acético glacial y al agua de nuestro reactivo habitual.

c) **Solución amilica de piridina:** Para prepararla, se emplean cantidades iguales de piridina y alcohol amílico y la mezcla se satura en agua destilada (6).

d) **Acetona:** Solución de acetona al 50 % en agua destilada.

e) **Metacresol fenol:** Es un solvente muy útil en la técnica bidimensional. Dos partes de metacresol y una de fenol se mezclan y se tamponan con ácido bórico e hidróxido de sodio para obtener un pH de 8,3 (9).

#### 4. REACTIVOS

a) **Solución de ninhidrina:** Recomendamos el empleo de una solución al 0.1 % en butanol saturado de agua al que se agregarán en el momento de usarlo, unas gotas de ácido acético a fin de dejar un pH cercano a 5 con lo cual se alcanza un máximo de sensibilidad (1).

b) **Fijador:** Solución alcohólica nítrica de nitrato de cobre preparado según Kawevan (10).

c) **Reactivo de Ehrlich:** Se preparó según Cramer (11, 12).

d) **Acido sulfanílico diazotado:** (9).

### METODO DE TRABAJO

#### OBTENCION DE LA MUESTRA

**Sangre:** Las muestras pertenecían a individuos clínicamente sanos, empleando suero obtenido por coagulación espontánea.

**Líquido céfalo raquídeo:** Las muestras fueron obtenidas de pacientes del Hospital Clínico Regional de Concepción, sin consideración de sexo ni edad y ensayando preferencialmente aquellos con informes químico, coloidal y citológico normales.

**Leche humana:** Obtenida de pacientes normales entre el tercero y décimo día de puerperio.

**Sero-albúmina:** Se separó del suero empleando la metodología química con metanol (5) y la técnica electroforética, sirviéndonos del aparato Elphor H.

#### IDENTIFICACION DE LOS AMINO-ACIDOS

Al exponer nuestros resultados siempre lo hemos hecho en forma comparativa, esto es, aplicamos a la muestra en estudio la técnica de Macheboeuf (13), con la cual obtenemos resultados ampliamente satisfactorios y luego, aplicando nuestra metodología, comparamos resultados practicando los exámenes por duplicado en cada muestra.

#### TECNICA POR COAGULACION

Para evitar el tratamiento de Macheboeuf en la identificación de amino-ácidos libres, que exige un tratamiento largo, hemos ensayado el desarrollo de una técnica propia, basada en la coagulación previa de las proteínas por el calor. Se vierten 2 ml. de suero en una ampolla de inyectable de 10 ml, de ca-

pacidad, se agita durante 45 segundos al baño María hirviente al cabo de los cuales se deja enfriar y se trata con 10 ml. de acetona más 10 gotas de ácido clorhídrico 10 N, triturando con una bagueta a fin de disgregar la masa de proteínas coaguladas. Se agita y se filtra después de un reposo de 10 minutos a 4° C. Este tratamiento se repite dos veces a fin de asegurarnos que se ha extraído la totalidad de los amino-ácidos libres. El filtrado total se concentra hasta 0.2 ml. a una temperatura no superior a 70° C.

En las condiciones dadas la acetona extrae sensiblemente el total de los amino-ácidos libres dentro de 10 minutos. Sólo para trabajos cuantitativos es recomendable dejarla actuar por más tiempo.

Cuando, en los líquidos biológicos nos proponíamos estudiar las fracciones proteicas y no los amino-ácidos libres, la fracción proteica coagulada por el calor era separada por centrifugación. El sobrenadante era desechado y el coágulo tratado con 7 ml de ácido clorhídrico al 20% v/v, empleando una ampolla de vidrio inyectable. Se sella la ampolla al mechero y se deja hidrolizar a 120° C durante 12 horas a la estufa.

En la figura N° 1 presentamos los cromatogramas de una misma muestra de suero, que fue sometida a hidrólisis, a diversos períodos.

Transcurrido el período de hidrólisis, se deja enfriar y el contenido se filtra. Este filtrado se concentra a sequedad al vacío y a una temperatura no superior a 70° C. Se extraen las sales y los líquidos, agregando al residuo seco 10 ml. de acetona y 5 gotas de ácido clorhídrico 10 N; posteriormente se abandona media hora en la nevera y se filtra; si queda en el matraz un residuo de apariencia oleosa, se extrae agregando gotas de ácido clorhídrico 10 N y se vierte en el filtro.

El filtrado cetónico se concentra a una temperatura de 70° C haciendo circular una corriente de aire, para lo cual puede aprovecharse la succión hecha por la máquina de vacío y así se consigue arrastrar el exceso de ácido clorhídrico. Finalmente se disuelve el residuo en 0.2 ml. de agua bidestilada, con el fin de asegurar una concentración útil de los amino-ácidos a detectar.

## ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

En todos nuestros trabajos usamos la cromatografía ascendente, tanto en análisis mono como bidimensionales.

Las muestras se depositan sobre una banda de papel de 12 cm. de ancho por 60 cm. de largo, en cantidad de 0.01 ml. mediante pipetas calibradas. De la misma muestra se colocan 5 ó 6 marcas dejando entre ellas un espacio de 2 a 3 cm. de tal manera que al final del trabajo es posible recortar columnas separadas de cada una de ellas y someterlas a diversas otras técnicas.

Una vez practicadas estas operaciones preliminares se lleva la banda de papel a la cámara y su extremo inferior se deja en contacto con el solvente, por espacio de 14 a 16 horas. La temperatura exterior se controla con termostato, de manera que las oscilaciones máximas fluctúan entre 19 y 22° C (7,11). Como hay varios amino-ácidos cuyos R<sub>f</sub> coinciden, lo que se traduce en manchas superpuestas, para identificarlos en forma segura, es necesario ensayar cromatografía bidimensional. Es posible ejecutarla, sirviéndonos de las franjas no reveladas; en ellas eluimos empleando acetona clorhídrica al 15 % y concentrando el eluido, se aplica la técnica bidimensional.

En la figura N° 2 presentamos los cromatogramas de seroalbúmina, después de haber separado por electroforesis dicha fracción y sometida a hidrólisis ácida.

Por otra parte, para la identificación de las manchas, de cualquier cromatograma, aplicamos sistemas de R<sub>f</sub>, de trazadores testigos, y de recarga de la muestra con amino-ácidos puros, además de recurrir en muchos casos a reacciones específicas que nos confirman, sin lugar a error, la presencia de un amino-ácido determinado. Hacemos notar todavía, que al aplicar la técnica bidimensional, es indispensable aumentar la cantidad de muestra y empleamos 0.02 ml. (1,7).

Cuando hemos tenido interés por conocer los amino-ácidos constituyentes de una fracción proteica determinada, la aislamos por metódicas químicas y controlamos su pureza sirviéndonos de la técnica electroforética. En otras ocasiones, las fracciones han sido aisladas por electroforesis doble, se revela un electroforegrama y en el duplicado, se ensaya la técnica de elución y posteriormente la hidrólisis ácida (5).

## RESULTADOS

### DE LOS AMINO-ACIDOS LIBRES EN EL SUERO SANGUINEO

En su determinación se aplicó la técnica de Macheboeuf (13) y paralelamente ensayamos la desproteinización por el calor (3).

El número de casos estudiados fue de 50, y correspondían a sueros de individuos sanos. Los solventes empleados: fenol saturado de agua (11,2) y butanol acético (13). Como controles en la identificación de las manchas, se aplicó la técnica de recarga y de trazadores (7,13), sirviéndonos de amino-ácidos pro-análisis Merck.

En el cuadro siguiente hemos resumido los resultados obtenidos. En columnas aparte, se indica el número de veces que sobre 50 casos se identificó un determinado amino-ácido, con la técnica de Macheboeuf y la de coagulación calórica.

## CUADRO N° 1

Estudio comparativo de los amino-ácidos libres del suero sanguíneo identificados con las técnicas de Macheboeuf (13) y de coagulación.

Número de sueros estudiados: 50.

	Macheboeuf	Coagulación
Alanina	48	50
Glicocola	44	42
Serina	43	46
Leucinas	43	38
Fenil alanina	40	32
Glutámico	38	38
Lisina	37	38
Cistina	35	34
Triptófano	34	32
Aspártico	33	37
Arginina	32	39
Treonina	32	29
Metionina	31	37
Valina	31	38
Histidina	29	37
Tirosina	27	32
Asparragina	14	19
Prolina	3	2
Hidroxiprolina	3	2

Como puede apreciarse de los resultados expuestos, la riqueza de amino-ácidos libres del suero sanguíneo, en orden decreciente, se inicia con la alanina y glicocola para terminar con prolina e hidroxiprolina. Comparativamente con la técnica por coagulación hay notable coincidencia de valores entre ambas técnicas; sin embargo, la nueva técnica acusa mayor frecuencia en tirosina, arginina, histidina y valina, hecho que no debe despreciarse, si nos atenemos al carácter de indispensable de los tres últimos ácidos.

La explicación de la menor frecuencia que acusan con la técnica de Macheboeuf, ciertos amino-ácidos, podría tener su explicación por el tratamiento previo del suero con alcohol, que podría provocar pérdida de ellos por la adsorción a las proteínas precipitadas por alcohol etílico (14).

Comparando nuestros resultados con otros autores extranjeros tenemos que en general coinciden, con Crumpler (15), Boulanger (16) y Alexander (17). Si alguna diferencia debe hacerse notar, sería que Crumpler no cita las leucinas y con respecto a Alexander, quien identifica en muy escaso número de observaciones cistina y metionina.

## DE LOS AMINO-ACIDOS IDENTIFICADOS EN EL HIDROLIZADO DE PROTEINAS SANGUINEAS TOTALES

Fueron 30 ensayos, sobre sueros de individuos sanos. El suero sanguíneo fue coagulado por el calor y el coágulo lavado con acetona clorhídrica (3) para eliminar los amino-ácidos libres y a continuación fue triturado y sometido a hidrólisis ácida empleando ácido clorhídrico al 20 % y a 120° C durante 12 horas. Posteriormente se filtra y el filtrado se concentra al vacío, el residuo se lava con acetona clorhídrica para eliminar las sales y las fracciones lipídicas y finalmente el filtrado cetónico es concentrado al vacío y rediseuelto en agua bidestilada (3).

El estudio cromatográfico fue bidimensional empleando butanol acético y fenol (3).

En el cuadro siguiente, presentamos el resumen de nuestras observaciones.

### C U A D R O    N° 2

	Macheboeuf	Coagulación
Histidina	30	27
Alanina	30	30
Tirosina	30	28
Prolina	30	30
Glicocola	30	29
Treonina	29	29
Glutámico	29	30
Serina	29	30
Aspártico	29	30
Fenil alanina	29	29
Leucinas	30	29
Metiotina	22	27
Cistina	19	21
Asparragina	18	20
Cisteina	14	20
Valina	11	12
Lisina	19	13
Arginina	4	4

Como puede apreciarse, los resultados obtenidos por des-proteinización cálcica, son sensiblemente iguales a los obtenidos con la técnica de Macheboeuf (3), como lo demuestra el hecho que con ambas técnicas: glicocola, alanina, histidina, prolina y leucinas, fueron identificados en los 30 casos y en 29 observaciones: aspártico, serina, glutámico, treonina y fenil alanina. Solamente se aprecia diferencia respecto a lisina y metionina; la lisina es identificada 19 veces por la técnica clásica y sola-



mente 13 veces con la modificada y por el contrario metionina se identificó 22 veces con la técnica de Macheboeuf y 27 veces con la nuestra, hechos que por el momento no estamos en condiciones de explicar.

En cuanto a detalles técnicos, en esta nueva etapa, comentaremos que tiene enormes ventajas, el practicar varios cromatogramas de cada muestra, desarrollar solamente uno, y basados en el resultado del cromatograma revelado, recortar en los otros las franjas correspondientes, eluir las y someterlas a nueva hidrólisis para evitar la presencia de péptidos, que pueden aparecer, si la hidrólisis inicial no ha sido total, péptidos que al ser revelado el cromatograma, pueden presentar manchas de Rf semejantes a algunos amino-ácidos.

Todavía hacemos notar, las ventajas en ciertos casos del tratamiento previo del papel; tamponado o tratado con diferentes sustancias como óxido de calcio, etc. y que González detalla específicamente en su trabajo (3), cuando se quieren separar amino-ácidos de Rf muy próximos.

### DE LOS AMINO-ACIDOS IDENTIFICADOS EN LA FRACCIÓN SERO-ALBUMINA

La identificación de amino-ácidos, obtenidos por tratamiento hidrolítico de la sero-albúmina fue la tercera etapa de nuestro trabajo. En los 30 sueros problemas la separación de la fracción sero-albúmina, se efectuó aplicando la metódica química con metanol (5) y la técnica electroforética empleando el aparato Elphor H. La metódica química fue a su vez controlada por electroforesis (5).

Los amino-ácidos identificados en la totalidad de nuestra casística fueron: histidina, arginina, serina, treonina, alanina, tirosina, prolina, metionina, fenil alanina, leucinas.

Dada la limitación de espacio, hemos estimado conveniente resumir nuestros resultados comparando con los obtenidos por otros autores, resumen que presentamos en el cuadro siguiente.

#### C U A D R O N° 3

Cuadro comparativo de los amino-ácidos identificados por P. M. Re, (18) Wuhrmann y Wunderly (19) y Melville (20) y nosotros, en la fracción sero-albúmina.

P. M. Re	Wuhrmann Wunderly	Melville	Nuestros resultados
Glutámico	Glutámico	Glutámico	
Aspártico	Aspártico	Aspártico	
Fenil alanina	Fenil alanina	Fenil alanina	Fenil alanina
Triptófano		Triptófano	



Tirosina	Tirosina	Tirosino	Tirosina
Prolina	Prolina	Prolina	Prolina
Cistina	Cistina	Cistina	Cistina
Leucinas	Leucinas	Leucinas	Leucinas
Alanina	Alanina		Alanina
	Glicina	Glicina	
Arginina	Arginina	Arginina	Arginina
Lisina	Lisina	Lisina	
Histidina	Histidina	Histidina	Histidina
	Metionina	Metionina	Metiotina
	Treonina	Treonina	Treonina
Serina	Serina	Serina	Serina
		Valina	

Como puede comprobarse, los resultados son semejantes a los de otros autores, salvo que no nos fue posible identificar ácido glutámico y aspártico que Re (18), Wuhrmann (19) y Melvillè (20) encuentran. El triptófano no fue identificado tampoco y en ello coincidimos con la información de Wunderly.

En general, debemos hacer presente que la información bibliográfica, sobre este tema, no es solamente escasa para la sero-albúmina, sino que incompleta, pues muchos trabajos publicados sobre su composición se refieren a uno o dos aminoácidos determinados.

Además, como comenta Garcés (5) el mayor número de aminoácidos identificados por otros investigadores extranjeros, no es de difícil explicación, si se considera que la cantidad de muestras que emplean en las métodos químicas, que ellos usaron, es de 1 a 5 ml. de suero y en cambio en la métrica cromatográfica es de 0.1 a 0.4 ml. solamente, y al no ser, en estas condiciones, identificado un aminoácido, ello puede deberse a falta de sensibilidad del revelador empleado y no a verdadera ausencia de él.

### DE LOS AMINO-ACIDOS LIBRES IDENTIFICADOS EN EL LIQUIDO CEFALO RAQUIDEO

Dicho estudio se practicó en 80 muestras empleando como solventes fenol y butanol acético. En cuanto a la métrica en especial que Massone (2) detalla cuidadosamente, estimamos de interés hacer resaltar, que la cantidad de muestras empleada fue de 4 ml. y la desproteinización se efectuó con alcohol; posteriormente se centrifuga y el sobrenadante se evapora al vacío y el residuo se redisuelve en 0.2 ml. de agua destilada.

En el cuadro siguiente se resumen los resultados de nuestras 80 observaciones, indicando para cada aminoácido el número de veces que fue identificado en el total de nuestra casuística.

## C U A D R O    N° 4

Cistina	11
A. Aspártico	7
Lisina	2
Serina	13
Histidina	6
Glutámico	32
Glicina	5
Alanina	53
Tirosina	9
Triptófano	5
Valina	5
Metionina	5
Leucinas	13
Fenil alanina	25

Como puede apreciarse los amino-ácidos identificados son los mismos que se revelaron en el suero sanguíneo, pero debemos hacer resaltar el hecho, que la intensidad de las manchas fue en general notablemente más débil, lo que debe interpretarse como una menor concentración, pese a que se tomaron las máximas precauciones para evitar pérdidas de ellos durante el tratamiento, y lo que es más, pese a que la cantidad de muestra original fue de 4 ml.

### DE LOS AMINO-ACIDOS LIBRES Y DEL HIDROLIZADO PROTEICO DE LA LECHE HUMANA

Es otro de los ensayos cromatográficos desarrollados en este Instituto. Fue practicado en 45 muestras de leche humana de pacientes que se encontraban entre el tercero y décimo día de puerperio.

Debemos agregar que además de las investigaciones de amino-ácidos, Sánchez (4) completó el estudio con las determinaciones de proteínas totales y glúcidos sobre la misma casuística, estudio complementario que no es comentado en el presente trabajo, pero que puede ser consultado en la tesis de Sánchez (4).

Los solventes empleados son los mismos que aplica Krause (1), Massone (2), González (3) y Garcés (5) y la solución fijadora fue nitrato de cobre en solución alcohólica-nítrica (10).

En el cuadro siguiente se resumen nuestras observaciones en relación con los amino-ácidos identificados sobre 45 muestras, como amino-ácidos libres y del hidrolizado de proteínas totales en la leche.

C U A D R O    N° 5

A. Acidos	Libres	Del Hidrolizado
Alanina	33	23
Glicocola	25	21
Serina	28	12
Leucinas	32	23
Fenil alanina	17	15
Glutámico	31	21
Lisina	17	9
Cistina	21	20
Triptófano	18	15
Aspártico	37	23
Arginina	25	9
Treonina	No se investigó No se investigó	
Metionina	34	23
Valina	34	23
Histidina	17	9
Tirosina	23	22
Asparagina	23	21
Prolina	—	13
Hidroxiprolina	—	—

Debemos dejar establecido, que el número de muestras analizadas en el caso de los amino-ácidos libres fué de 45, en cambio en el hidrolizado sólo se analizaron 24 muestras distintas.

Del cuadro anterior podemos comentar que los amino-ácidos del hidrolizado fueron los mismos que identificamos como amino-ácidos libres, pero que el índice de frecuencia de ellos es mayor en el hidrolizado, que como amino-ácidos libres. Todavía podemos agregar, que en cuanto a la intensidad de las manchas ésta es mucho mayor en el hidrolizado, lo que debe estimarse como debido a una mayor concentración. Por último, otro hecho que resalta es el que se refiere a que ciertos amino-ácidos indispensables como arginina, lisina e histidina acusan en ambas condiciones un índice de frecuencia similar; en cambio la prolina, sólo pudo ser identificada en el hidrolizado, hecho que merece citarse ya que Kossel (21) sostiene la notable importancia de dicho amino-ácido como centro genético de la síntesis de la molécula proteica.

De la expresión resumida que hemos hecho de nuestros ensayos, podemos comentar, que en general en los diversos líquidos biológicos que hemos estudiado, se encuentran los mismos amino-ácidos, y que solamente se aprecia menor frecuencia de algunos frente a otros, pero que por tratarse de un ensayo cualitativo y no cuantitativo es posible aceptar, que la no identificación de algunos de ellos en ciertas determinaciones puede deberse a que se encontrarían en una concentración inferior al límite de sensibilidad de los reveladores empleados.

## CONCLUSIONES

Se demuestra la utilidad y ventaja que la técnica cromatográfica presenta en la investigación de amino-ácidos libres en líquidos biológicos, como también en hidrolizado de proteínas totales o fracciones proteicas de ellos. En la determinación de amino-ácidos libres, se aplica la técnica calórica en el proceso de desproteinización con resultados sensiblemente iguales a los que se obtienen con la técnica de Macheboeuf. El empleo de trazadores y recarga, en la investigación de amino-ácidos libres aseguran y facilitan la identificación de ellos.

## CONCLUSIONS

The use and advantage of chromatography in research of free amino-acids in biological fluids and hydrolysis of total proteins and their fractions, is reported. For determining free amino-acids the heat technique was used by means of desproteinization and thus almost identical results were obtained as with the method of Macheboeuf. The use of tracers and overcharge ensures and facilitates their identification.

## SCHLUSSFOLGERUNGEN

Wir berichten über die Anwendung und Vorteile der chromatographischen Technik zur Untersuchung freier Amino-Säuren in biologischen Flüssigkeiten und auch in den Abbauprodukten der Hydrolyse der Gesamtproteine oder deren Einzelfraktionen. Zur Bestimmung der freien Aminosäuren wurde die Wärmetechnik zur Protein-trennung gebraucht und es wurden anähernd die gleichen Ergebnisse erhalten wie mit der Macheboeuf'schen Technik. Zur sicheren und leichteren Identifizierung der freien Aminosäuren wurden Kontrollauftragungen gemacht.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.—Krause, W. H.: Contribución al estudio cromatográfico de la aminoacidemia normal. Tesis Universidad de Concepción, (1954).
- 2.—Massone, Sch. R.: Contribución al estudio cromatográfico de los amino-ácidos del líquido céfalo raquídeo. Tesis Universidad de Concepción, (1954).
- 3.—González, R. R.: Contribución al estudio cromatográfico del hidrolizado proteico sanguíneo. Tesis Universidad de Concepción, (1955).
- 4.—Sánchez, B. R.: Estudio Cromatográfico de proteínas y glúcidos en la leche humana. Tesis Universidad de Concepción, (1954).

- 5.—Garcés, G. E.: Contribución al estudio cromatográfico del hidrolizado de la fracción sero-albúmina. Tesis Universidad de Concepción, (1956).
- 6.—Villar, P. V.: Cromatografía sobre papel. 3-131. Instituto de Fisiología y Bioquímica. Madrid, (1952).
- 7.—Boulanger, P., Biserte, G.: La chromatographie de partage Exposés annuels de Biochimie Médicale. 11: 53-121, (1950).
- 8.—Kowkabany, H. G., Cassidy, G.: Investigation of paper Strip chromatography. Anal. Chem. 22: 817-819, (1950).
- 9.—Landua, A. J., Fuerst, R., Awapara, J.: Buffered filter paper chromatography of the amino-acids. Anal. Chem. 23: 162-174, (1951).
- 10.—Kaweban, E., Weiland, T.: Conservation of amino-acids chromatograms. Nature, 168: 78, (1951).
- 11.—Cramér, F.: Papierchromatographie, II ed. 24-68, Verlag Chemie, Weinheim, (1953).
- 12.—Gerard Biserte et René Scriban.: Les protides du lait. Bull. Soc. Chim. Biol. 34: 3-4, (1952).
- 13.—Macheboeuf, M., Cachin, M., Blass, J.: Application en biologie clinique de la microchromatographie sur papier. Anal. Biol. Clin. 10: 22-43, (1952).
- 14.—Vernier, C. H., Agreen, G.: On the paperchromatographic analysis of amino-acids and peptides in tissue extracts and enzyme hydrolyzed proteins. Acta. Chim. Scand. 2: 783-796, (1948).
- 15.—Crumpler, H. R., Dent, C. E., Lindan, O.: The amino-acids pattern in human foetal and maternal plasma at delivery. Biochem. J., 47: 223-227, (1950).
- 16.—Boulanger, P., Biserte, G.: Chromatographie sur papier des acides aminés et polypeptides des liquides biologiques. Modification technique et résultats nouveaux (plasma sanguin). Bull. Soc. Chim. Biol. 33: 1930-1939, (1951).
- 17.—Alexander, B.: Amino-acids in plasma. J. Biol. Chem. 171: 821, (1947).
- 18.—Re, P. M.: Acidos amino. Ed. El Ateneo. Buenos Aires, (1940).
- 19.—Wuhrmann, F., Wunderly, Ch.: Los proteínas sanguíneas en el hombre. Ed. Científico-Médica. Barcelona. 41-97, (1954).
- 20.—Melville, Sahyun: Proteins and amino-acids in nutrition. New York. 275 y sgts., (1948).
- 21.—Kossel: The protamines and histones. Ed. Longmans, Toronto, (1928).



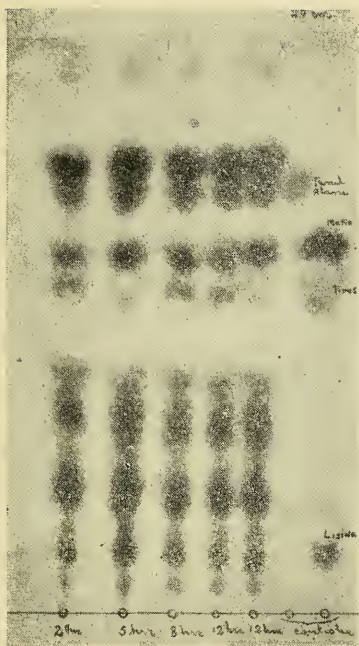


FIGURA 1

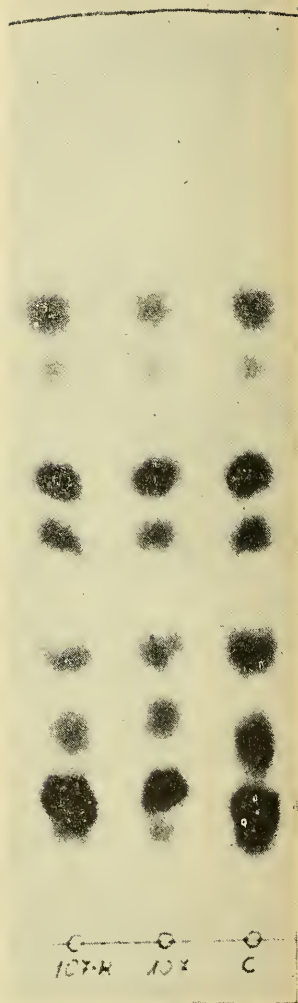


FIGURA 2



