

ESTUDIO SOBRE LA FRACCION NITROGENADA SOLUBLE EN LEGUMINOSAS CHILENAS (*)

Proyecto de Investigación subvencionado por el Consejo de Investigaciones Científicas de la Universidad de Concepción, Chile.

H. L. Barrales (**)

M. I. Alarcón (**)

W. Wilkomirsky (**)

Introducción

Es importante destacar que, junto a las diferencias ya muy conocidas para caracterizar al reino vegetal y al animal existen, además, otras fundamentales en la economía del nitrógeno de estos dos grandes grupos. Esta situación tiene proyecciones que, por lo general, no siempre son advertidas ni apreciadas en toda su magnitud. En efecto, es necesario anotar que existe en las plantas una amplia gama de alternativas metabólicas; como también células y órganos con un metabolismo nitrogenado muy diferente y característico.

El hecho decisivo es que las plantas, en contraste con los animales, contienen los mecanismos para reciclar y reutilizar los compuestos nitrogenados en alternativas que, comunmente, no se dan en los animales superiores.

Mientras las plantas realizan la que podría denominarse "síntesis primaria de proteínas", a partir del nitrógeno inorgánico —como nitratos y amoniaco— y compuestos carbonados derivados de la fotosíntesis, los animales dependen necesariamente de los llamados "aminoácidos esenciales". Esta dependencia exhibe variaciones para las diferentes especies y aún dentro de un mismo organismo.

Ahora bien, si es cierto que la planta entera es capaz de subsistir en base a nitrato o amoniaco, hay que reconocer, empero, que se da el caso de células individuales que derivan su nitrógeno orgánico prefabricado, a partir de los centros de síntesis primaria

(*) Condensado de la investigación CIC 59 del mismo nombre.

(**) Depto. de Biología, Inst. Central de Biología.

tales como hojas y/o raíces. Como consecuencia de esta situación se establece la necesidad de disponer de mecanismos adecuados para el transporte y almacenamiento de compuestos notables.

Materiales y Métodos

El análisis de la fracción nitrogenada soluble para el reconocimiento e identificación de alfa amino-ácidos y aminas se realizó por cromatografía bidimensional descendente en papel.

El método analítico utilizado comprende las siguientes etapas:

A) PREPARACION DE LA MUESTRA.

Colecta del material:

Las plantas fueron colectadas en el terreno, en el período de floración y/o durante la maduración de la semilla. Se prefiere esta etapa del desarrollo por cuanto coincide con valores máximos del Nitrógeno soluble en la planta. Asimismo, cuando se analizaron plantas de herbario las muestras correspondientes se obtuvieron de especímenes en flor.

Secado:

El material fresco es secado en estufa a 50°C durante una semana.

Molienda:

El material seco es molido en molina Willey con tamiz de 0.00165 pulgada. Para análisis se utilizan 500 mg. de polvo seco que se extraen exhaustivamente con etanol de 75%.

Extracción:

La extracción alcohólica se hace en forma repetida, con fracciones de 100 ml. de etanol; primero en frío y posteriormente a 46°C aproximadamente.

Se considera que se ha llegado al término de la extracción cuando una alícuota del extracto final reacciona negativamente con una solución alcohólica de ninhidrina al 0.2% a 80°C.

Generalmente se requieren una extracción en frío y tres en caliente, a 46°C por 2 horas, para agotar la muestra.

Concentración:

Las diferentes fracciones provenientes de las extracciones en frío y caliente se juntan y se reducen de volumen mediante la eliminación del solvente en un evaporador continuo, a presión reducida, y 50°C. El volumen original de aproximadamente 500 ml se reduce a 5 ml en alrededor de 1 hora.

Al final de la concentración resulta una solución acuosa de la fracción nitrogenada soluble, pigmentos, ácidos orgánicos y de-

más constituyentes hidro-alcohólicos solubles contenidos en la muestra original.

Purificación del extracto:

La muestra se purifica mediante la adición de 1 ml de cloroformo y centrifugación a 4000 RPM por 15 min. En tal forma se eliminan pigmentos y otras impurezas que interferirían en la migración de los compuestos nitrogenados en el papel. La adición de cloroformo tiene la ventaja adicional de su acción bacteriostática.

B) ANALISIS DE LA MUESTRA.

El análisis cuantitativo de la muestra permite reconocer la presencia de los diferentes constituyentes de la fracción nitrogenada soluble. Al mismo tiempo se puede hacer una apreciación estimativa d su abundancia relativa, en atención a que todos los extractos se hacen en base a 500 mg. de materia seca.

Para el método de análisis cromatográfico bidireccional descendente se utilizan láminas de papel Whatman Nc 1 de 56 x 57 cm.

La lámina de papel se marca en el ángulo inferior derecho con un punto (origen) que se localiza a 10 cm. de los bordes vertical y horizontal de la lámina. En el origen se aplican, mediante micropipetas totales, alícuotas del extracto en volumen variable, desde 50 a 200 u. ml., según concentración relativa en nitrógeno soluble del extracto original.

Cuando se emplean volúmenes de sobre 100 u ml por cromatogramas es preciso aplicar calor al origen para mantener un diámetro de la mancha no superior a 0,5 cm., facilitando así una migración uniforme del extracto con los solventes.

Las muestras se analizan en duplicado y una vez preparado el cromatograma en la forma descrita las láminas se someten a la acción de los solventes.

El método utilizado se basa en la acción de dos solventes. El primero de ellos: fenol/agua; 8 : 3; pH 5,5 se utiliza para la migración de la fracción nitrogenada en el sentido del mayor largo del papel. Los cromatogramas se ubican en pares, en cubetas de vidrio que se alojan en cabinets cromatográficos, aislados térmicamente, y con capacidad para cuatro cubetas, 8 láminas. Previa la aplicación del solvente es preciso saturar las cámaras con el solvente correspondiente. Asimismo, las láminas deben permanecer en este ambiente saturado por un lapso de 24 horas, antes de la aplicación del solvente. Bajo las condiciones estandarizadas descritas, se utilizan 100 ml del solvente fenol/agua por cada par de láminas, permitiendo la migración por un plazo de 32 horas. Terminada la elución con el primer sistema de solvente las láminas son retiradas del gabinete cromatográfico y secadas en una estufa cromatográfica con ventilación forzada, a 35°C por 10 horas. A continuación se procede a la elución del extracto en el segundo sistema de solventes. Butanol/ácido acético glacial/agua 9:1:2,5. Previa a la aplicación del segundo solvente es necesario cortar el borde del papel que estuvo en la cubeta del fenol. Una vez hecho esto se dobla el papel siguiendo la orilla, a 90° de la migración del primer solvente y en tal forma se ubican los pares de láminas en las cubetas de los cabinets de

butanol/acético/agua. Como en el caso del primer solvente, es necesario saturar la cámara y el papel por un lapso de 24 horas. El segundo sistema de solventes, 100 ml por par de láminas, se deja actuar por 32 horas. Al término de la migración se sacan las láminas y se secan en la estufa cromatográfica por 10 horas a 35°C.

Todos los reactivos utilizados: fenol, butanol y ácido acético, deben ser pro-análisis Merck y agua bidestilada desionizada en columna de intercambio iónico. Junto con cada serie de cromatogramas-problema se incluye una lámina standard con mezcla de amino-ácidos conocidos. En tal forma se tiene un standard interno de comparación para el cálculo de Rf en la muestra-problema.

Una vez secas, y después de haber migrado en el segundo solvente, las láminas están listas para ser reveladas mediante la aplicación de ninhidrina 0,2% en alcohol de 96°, recién preparado. El reactivo se aplica mediante nebulizador con presión de CO₂.

Una vez aplicada la ninhidrina las láminas se llevan a la estufa cromatográfica a 80°C para acelerar la reacción.

La reacción de la ninhidrina con los alfa-amino-ácidos y algunas aminas resulta en la aparición de manchas coloreadas en el papel. Algunas de color azul violeta, café, amarillo, azul fluorescente y naranja. Además de la reacción con ninhidrina se usa una lámpara de UV para detectar la presencia de compuestos fluorescentes, e.g. ácido pipecólico.

Los cromatogramas revelados son fotografiados en blanco y negro para constancia y archivo en el libro de protocolo.

La identificación de los diferentes amino-ácidos se hace por comparación con los standard y por co-cromatografía con standard interno.

Resultados

El examen de los resultados permite destacar las siguientes consideraciones (ver Tabla N° 1):

El análisis de las 66 especies revela la presencia de 16 amino-ácidos conocidos y de 91 compuestos no identificados, que reaccionan positivamente con ninhidrina. Además, se reconoce la presencia de 13 compuestos fluorescentes (U.V.) no identificados.

Las especies analizadas se agrupan en 12 géneros. Entre estos los de mayor importancia —por el número de especies analizadas— son: *Adesmia*, con 28 especies; *Astragalus* con 18 y *Caesia* con 6 especies.

Los amino-ácidos reconocidos son los que se enumeran a continuación: Aspártico, Glutámico, Serina, Glicina, Asparagina, Treonina, Alanina, Glutamina, Arginina, Prolina, Valina, Leucina, Fenilalanina, Gama-amino-buiférico, Hidroxiprolina y Pipecólico.

Aspártico, glutámico, asparagina, glutamina, alanina y gama-amino-buiférico se destacan tanto por la frecuencia con que se reconocen en los análisis, como también por aparecer en concentraciones medianas o altas.

Aún cuando no es posible distinguir un patrón de distribución, para caracterizar a un género o una especie, se reconoce que

para el caso de las aminas existe una situación especial. En efecto, en tanto que asparragina aparece con una distribución muy amplia, la presencia de glutamina se halla restringida, preferentemente, al género **Astragalus**.

En el caso de alanina y valina también merece reparos. Estos amino-ácidos—aún cuando de distribución muy amplia en las muestras—aparecen en el género **Adesmia**, frecuentemente, en concentraciones relativas bajas. Por otra parte en el género **Astragalus** la situación es precisamente opuesta.

Especial atención merecen los resultados anotados para el ácido gama-amino-butírico. En efecto, sorprende que este metabólico—de tan amplia distribución—se encuentre ausente en 18 de las 66 especies analizadas. Su ausencia no se limita a un género determinado, puesto que tanto falta en **Adesmia** como en **Astragalus** o en **Cassia**; tampoco coincide con concentraciones bajas de nitrógeno soluble. En efecto, falta tanto en **Adesmia cinerea** Clos. Como en **Astragalus cryptobotrys** Johnston. La primera es una especie con un bajo tenor en nitrógeno soluble total, en tanto que la segunda es característicamente rica en nitrógeno soluble.

Cuando se comparan los géneros, en su contenido total en nitrógeno soluble, resalta una notable diferencia entre **Adesmia** y **Astragalus**. Así, mientras que **Adesmia** se caracteriza por el bajo tenor de nitrógeno soluble, **Astragalus** aparece, en general, con una concentración relativa elevada, para cada uno de los componentes de la fracción nitrogenada.

Entre los componentes identificados arginina, fenilalanina, hidroxiprolina y piperacético son conspicuos por su limitada ocurrencia. Además, generalmente, aparecen en bajas concentraciones; excepción hecha de ácido piperacético.

Conclusiones y Discusiones

De los resultados anotados se puede concluir lo siguiente:

que, entre las especies analizadas existe una amplia gama en cuanto al número de compuestos que reaccionan positivamente con ninhidrina y la concentración relativa de los mismos;

que, el pool de nitrógeno soluble está constituido—en consideración a sus concentraciones relativas—principalmente por ácido aspártico, glutámico, asparragina, glutamina, alanina y, en menor escala gama-amino-butírico;

que, entre las aminas, asparragina es de más amplia distribución que glutamina. Esta última estaría limitada de preferencia al género **Astragalus**;

que, en cuanto al contenido total de nitrógeno soluble existe una diferencia manifiesta entre los géneros **Adesmia** y **Astragalus**. Así, mientras que en **Adesmia** el pool de nitrógeno soluble es de una baja concentración relativa, en **Astragalus** ocurre lo contrario;

que, el elevado número de compuestos no identificados positivos a ninhidrina, reconocidos en las muestras analizadas, ofrece expectativas muy amplias para estudios posteriores de aislamiento, caracterización y rol metabólico.

Hay que destacar un punto importantísimo: la ausencia total de histidina, lisina, metionina, triptófano y tirosina. En efecto, en ninguna de las especies analizadas se reconoció la presencia de estos compuestos y su importancia es fundamental por cuanto se les estima como "amino-ácidos esenciales". Es indudable que una dieta carente de estos constituyentes esenciales es inadecuada para el mantenimiento de la fauna natural.

Aún cuando no es posible imponer un patrón de criterio quimiotaxonómico en la gama de compuestos reconocidos entre las especies aisladas, no es menos cierto que se anotan diferencias entre los géneros *Adesmia* y *Astragalus*. Esta observación tiene trascendencia por cuanto ecológicamente las especies de ambos géneros no se diferencian en áreas de distribución. Así, tanto *Adesmia* como *Astragalus* colonizan la pre-cordillera andina, el desierto, la cordillera de la costa y la región austral de Chile. Por consiguiente, el origen de las diferencias anotadas debería buscarse al nivel genérico. Es interesante comparar estos resultados con los de Bell (2) quién, ha examinado 49 especies de leguminosas del género *Lathyrus*, y sugiere que es posible interpretar afinidades específicas al nivel genérico. Además, el mismo autor, reconoce la presencia de 7 compuestos —no identificados— que reaccionan positivamente con ninhidrina.

Resumen

Se utiliza el método cromatográfico (bi-dimencional de papel) con fenol/agua y butanol/acético/agua como primer y segundo sistema para el estudio de 66 especies de leguminosas chilenas.

Se detecta la presencia de 16 amino-ácidos conocidos y 91 compuestos, no identificados, que reaccionan positivamente con ninhidrina.

Las especies analizadas se agrupan en 12 géneros. Los de mayor importancia son: *Adesmia*, *Astragalus* y *Cassia*.

Aspártico, glutámico, asparragina, glutamina y gama-amino-butírico se destacan tanto por su frecuencia como por su concentración relativa.

Se reconocen diferencias en la distribución de glutamina y asparragina para los géneros *Adesmia* y *Astragalus*. También se anotan diferencias en la distribución de alanina y valina.

El género *Adesmia* aparece con una concentración relativa de nitrógeno soluble más baja que *Astragalus*.

Se reconoce una ausencia característica de histidina, lisina, metionina, triptófano y tirosina. Todos amino-ácidos esenciales.

Gama-amino-butírico sólo se detectó en 48 de las 66 especies analizadas.

Summary

The soluble nitrogen composition of 66 species of Chilean legumes was studied by means of bi-dimensional paper chromatography using phenol/water and butanol/acetic acid/water as first and second solvent system respectively.

The presence of 16 known aminoacids was recognized and also of 91 unidentified compounds which react positively with ninhydrin.

The species studied comprise a total of 12 genera: *Adesmia*, *Astragalus* and *Cassia* being the most important.

The presence of aspartic, glutamic, asparagine, glutamine and gamma-amino butyric acid was relevant both, because of frequency of their occurrence as well as their relative concentration.

The distribution of glutamine and asparagine differs for the genus *Adesmia* and *Astragalus*. Such differences were also noted for the distribution of alanine and valine.

Adesmia shows a lower relative concentration of soluble nitrogen as compared with *Astragalus*.

The absence of histidine, lysine, methionine, triptophan and tyrosine should be stressed as they are all essential aminoacids.

Gamma-amino butyric was found only in 48 of the 66 species analyzed.

TABLA N° 1

COMPOSICION CUALITATIVA Y CUANTITATIVA RELATIVA (A-B-C) DE LA FRACCION NITROGENADA SOLUBLE EN 66 ESPECIES DE LEGUMINOSAS CHILENAS.

PLANTA ANALIZADA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	UV	26	N	
<i>Adesmia angustifolia</i> H et A	A						B																				B	1
<i>Adesmia araucana</i> Phil	C	C	C				A		C						C	C		C									2	5
<i>Adesmia arborea</i> Bert	B	C	B				A		B						B	C							A					A
<i>Adesmia argentea</i> Meyen	B	B	B				A		A						A	C		C					A				B	2
<i>Adesmia atacamensis</i> Phil.	C	A	C				B		B						C	C		C					C					2
<i>Adesmia batonioides</i> Hook f	C						C		C							C												
<i>Adesmia cinerea</i> Clos	C	C	C				C		C																			2
<i>Adesmia emarginata</i> Clos	A	C	C				B		C	C					C	C		C					C					1
<i>Adesmia eremophila</i> Phil.	C	C	C				A		A						C	C		C					B					7
<i>Adesmia filifolia</i> Clos	A	A	B				C	C	A	B					B	B		B					A					1
<i>Adesmia godoyae</i> Phil et B	C	C	C				C		C						C	C							C					1
<i>Adesmia helioispra</i> H et A	A	B	C				C		C					C		B		C					B			1		
<i>Adesmia monosperma</i> Clos							C		C							C												
<i>Adesmia mucronata</i> H et A	A	C	B				B		C	C					C	B		C										
<i>Adesmia parvifolia</i> Phil.	C	C	C				C		C							C												
<i>Adesmia polyphylla</i> Phil.	C	C	C				B		C						C	C		C					C					
<i>Adesmia propinqua</i> Clos	B	C	B				C		A	C					B	C		B					C		1			
<i>Adesmia pulchra</i> Phil.	C	C	C				C		C							C												1
<i>Adesmia radicefolia</i> Clos	C	C	C				C	C	C						C	C		C					C					4
<i>Adesmia rahmeri</i> Phil.	C	C							C							C												
<i>Adesmia sessiliflora</i> Phil.	B	B	B				B		C						C	C							C					1
<i>Adesmia tenella</i> H et A var. <i>major</i> (Phil) Sa	C	C							C							C												
<i>Adesmia tenuiculis</i> Phil	B																											
<i>Adesmia trixago</i> Gill	B	A	C				B		C	C					C	B	C		C				B		1		1	
<i>Adesmia uspatiensis</i> Gill	C	C	C				C	C	C							C	C		C				C					3
<i>Adesmia venosa</i> Phil.	B	C	B				B		A						C	B	C		B				B		2			
<i>Adesmia villanuevae</i> Phil.	A	B	B				A		B							C	C		C				C					
<i>Adesmia viscida</i> Bert	C	C	B				C		B	C					C	B	C		B				B					
<i>Astragalus procumbens</i> H et A	A	B	C				B	C	C	C						C	C		C				A			B	1	
<i>Astragalus amunatogu</i> Phil.	A	A	A				A	A	A	B						A	A		A				A					
<i>Astragalus arequipensis</i> Vagel	B	A	C				B	C	A	C						B	B		C				C					
<i>Astragalus cryptanthus</i> Wedd.	A	A	B				C	B	A	B						C	B		B									4
<i>Astragalus berterii</i> Colla	A	A	B				A	B	B	B						B	B		B				A					

CLAVE PARA LAS CONCENTRACIONES

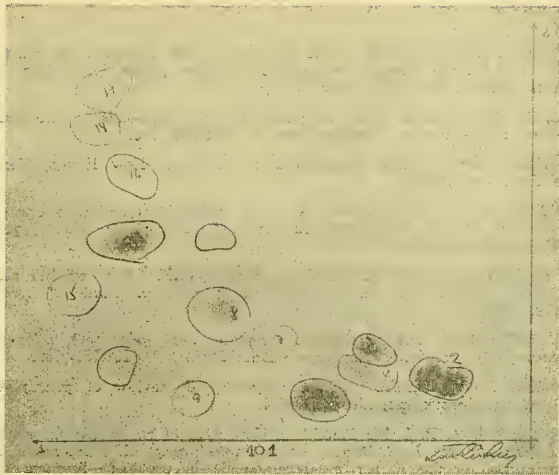
A : ALTA
B : MEDIA
C : BAJA

continúa

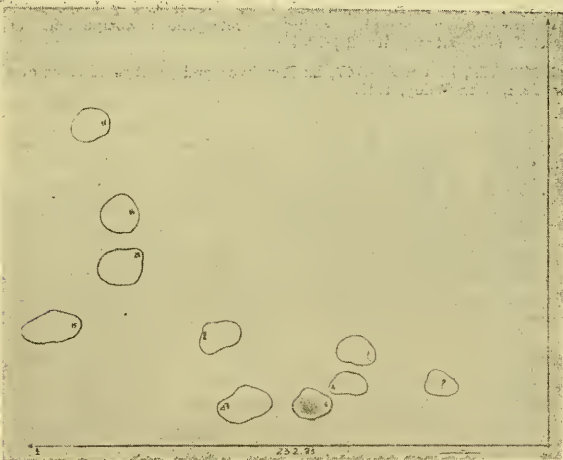
TABLA N° 1 continuacion

PLANTA ANALIZADA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	UV	26	NI	
<i>Astragalus bolivianus</i> Phil.	A	C	C		B		C							C	C		C						C					2
<i>Astragalus verticillatus</i> (Phil.) Reiche	A	A	B		A	A	A	A					B	C	B		C	C					B					1
<i>Astragalus busilloi</i> Clos	A	A	A		A		B	B						B	B		C						A					3
<i>Astragalus coquimbense</i> (H. et A.) Benth.	A	B	C		B	C	B	C						C	B		C	C					B		2			1
<i>Astragalus cryptolepis</i> Johnston	A	A	B		A		B	A						B	C													
<i>Astragalus peruvianus</i> Phil.	A	B	B		A	B	A	B					C	B	B		B						A					
<i>Astragalus peruvianus</i> Hieronimus	A	A	A		A	B	A	B						A	A		B						A			B		7
<i>Astragalus drummondii</i> (Bertero) Clos	A	A	A		A	B	A	B					C	B	A		C						B					1
<i>Astragalus micranthellus</i> Wedd.	A	A	A		A		A	A						B	A		B						A					2
<i>Astragalus menziesii</i> Wedd.	A	A	A		A	B	B	B						B	A								B					1
<i>Astragalus peruvianus</i> Phil.	A	B	B		C	C	C							C	C								B					2
<i>Astragalus pesqui</i> (Phil.) Johnston	A	A	B		A		B							B	B		C						A					2
<i>Astragalus amatus</i> Clos	B	C	C		A	C	A	C						C	C		C						B					
<i>Cassia acuta</i> Meyen	A	B			B		B							C	C		C						B					C
<i>Cassia clusiana</i> Phil.	A	B			B		B							B	C								C					B
<i>Cassia misera</i> Phil.	B	C	C		B		C	C						C			B										1	
<i>Cassia obtusa</i> Clos	C	B	C		B		A	C						C			C						B			1		2
<i>Cassia stipulacea</i> Ad.	A	C	C		B		B																C					1
<i>Cassia tomentosa</i> Lam.	A	A	C		C		A																	B				1
<i>Vicia andina</i> Phil.	B	C	A		B		B							C									B			B		6
<i>Vicia atropurpurea</i> Desf.	A	B	C		B		A							C	C		C						A					4
<i>Vicia speciosa</i> Phil.	A	A	A		B		A	B							A		B							B				2
<i>Vicia vicina</i> Clos	A	B	B		C		C	C						C									C					3
<i>Lathyrus hookeri</i> G. Don	B	C			B		C																B	C				1
<i>Lathyrus subandinus</i> Phil.	A	B	A		B	B	B	A	C						A	A	B							A				2
<i>Anarthrophyllum cumingii</i> H. et A.	A	C	C		C		C							C	C								B					
<i>Anarthrophyllum gayanum</i> (A. DC.) Johnston	C	C			C																						2	
<i>Ermannia multicaulis</i> (Clos) Johnston	B	C	C		A		B						C	C	C		C						B					
<i>Mosada subpinnata</i> (Lam.) T. et G.		C	B		B	C																		B				2
<i>Beckmannia decorticans</i> (Willd.) M. et A. Link.	A	C	A		B									C	C	C							B					6
<i>Parentia azurea</i> (Phil.) Moench	A	B	C		C		A						C	C	C								C	B				
<i>Prosopis alba</i> Griseb.	A	C	C		B	B								C	C	C							B			B		4
<i>Saphora macrocarpa</i> Sm.	C	B			C																							2

CLAVE PARA LOS AMINO ACIDOS: 1.- cisteina, 2.- aspártico, 3.- glutámico, 4.- serina, 5 glicina, 6.- asparagina, 7.- treonina, 8.- alanina, 9.- glutamina, 10.- alfa-amino-n-butírico, 11 histidina, 12.- lisina, 13.- arginina, 14.- metionina, 15.- prolina, 16.- valina, 17.- metionina sulfata, 18.- leucina, 19 leucil alanina, 20.- triptofano, 21.- tirosina, 22.- beta alanina, 23.- gamma amino butírico, 24.- hidroxi prolina, 26.- piroglutámico, NI no identificados.



Cromatograma típico del género *Astragalus* (*Astragalus coquimbensis* H. et A.)



Cromatograma típico del género *Adesmia* (*Adesmia polyphylla* Phil.)

Bibliografía

- BARRALES, HUGO LEONEL: Some problems of the isolation, occurrence, and behavior of soluble nitrogen compounds in higher plants. PhD thesis. Ithaca, N. York, Cornell University, 1959, 280 p.
- BELL, E. A.: Associations of ninhydrin reacting compounds in the seeds of 49 species of *Lathyrus*. *Biochem. Jour.* 83: 225-229, 1962.
- CHIBNALL, A. C.: Protein metabolism in the plant. New Haven, Connecticut, Yale Univ. Press, 1939.
- CONSDEN, R.; A. H. GORDON; A. J. P. MARTIN: Qualitative analysis of proteins: A partition chromatographic method using paper. *New Phytologist* 53: 38-43, 1954.
- GROBBELAAR, N.; I. K. POLLARD; F. C. STEWARD: New soluble nitrogen compounds (Amino and imino acids and amides) in plants. *Nature* 175: 703-708, 1955.
- J. F. THOMPSON: The nitrogenous constituents of plant with reference to chromatographic methods. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 1: 233-264, 1950.
- LEDERER, E; M. LEDERER: Chromatography. A review of principles and applications. Amsterdam, Elsevier, 1954.
- MARTIN, A. J. P.; R. L. M. SYNGE: A New form of chromatogram employing two liquid phases. I. A Theory of chromatography. II. Application to the determination of the higher monoaminoacids in proteins. *Biochem. J.* 35: 1358-1368, 1941.
- SCHMIDT, C. L. A.: The chemistry of the amino acids and proteins. Londres, Charles C. Thomas, 1938.
- STEWARD, F. C.; H. I. STREET: The Nitrogenous constituents of plants. *Ann. Rev. of Biochem.* 16: 471-520, 1947.
- STEWARD, F. C.; R. H. WETMORE; J. F. THOMPSON y J. P. NITSCH: A Quantitative chromatographic study of nitrogenous components of shoot apices. *Am. J. Botany*, 41: 123, 1954.
- ZEICHMEISTER, L.; CHOLNOKY, L.: Principles and practice of chromatography. New York, John Wiley, 1941.