

23. ESTUDIO DEL ACIDO NUCLEÍNICÓ DEL BACILO DE LA DIFTERIA,
por R. D. COGHILL y DOROTEA BARNÉS.

SUMMARY:

The nucleic acid from bacteria diphtheriae has been prepared following the method indicated by Coghill for the extraction of nucleic acid from the timothy bacillus.

Upon hydrolysis the nucleic acid of the bacteria diphtheriae yields guanine, adenine, uracil, cytosine and thymine. It contains at least 14% of pentose and gives positive test for the Feulgen reaction characteristic of the exose group.

The presence of thymine and the fact of giving positive test for the Feulgen reaction lead to the conclusion that we are dealing with a different type of nucleic acid or with a mixture of plant and animal types.

I. El estudio de los ácidos nucleínicos, de mucha importancia en sí por ser uno de los dos grupos de combinaciones nitrogenadas más importantes que intervienen en los cambios de la vida celular, adquiere un interés particular cuando se trata de ácidos procedentes de microorganismos, porque entonces no sólo interesa desde el punto de vista químico, tratando de buscar diferencias en su constitución según procedan de organismos patógenos o no patógenos y de si estas diferencias pueden evidenciarse aplicando métodos químicos, sino también desde el punto de vista de su clasificación cabe considerarlo filogenéticamente como una planta o como un microorganismo animal.

El ácido nucleínicó del bacilo de la tuberculosis, al que su descubridor Ruppel (1) denominó «ácido tuberculínico», fué el primero obtenido de un organismo patógeno. Ruppel le atribuyó un gran poder inmunizante, por lo que su estudio atrajo desde un principio la atención de los bioquímicos, y aunque esta hipótesis no se sostuvo mucho tiempo, sin embargo, el interés por el estudio del ácido tuberculínico ha ido aumentando progresivamente, como puede comprobarse revisando la literatura de los últimos años.

En el estudio reciente del ácido nucleínicó del bacilo de la alfalfa (2), «*Mycrobacterium phlei*» (Moeller), se ha podido comprobar que su constitución molecular difiere marcadamente de la del ácido tuberculínico, y, no obstante, ambos se incluyen por los bacteriólogos en el mismo grupo general, atendiendo a la manera de comportarse con el tñido de Gram (3). Si de esta diferencia en la constitución molecular de los ácidos nucleínicos de

(1) W. G Ruppel, *Z. physiol. Chem.*, **26**, 218, 1898-99.

(2) R. D. Coghill, *J. of. Biol. Chem.*, **90**, 57, 1930.

(3) Hiss y Zinsser, «A Text Book of Bacteriology». Appleton & Company.

dichas bacterias puede deducirse la base fundamental para una clasificación más racional que la usada por los bacteriólogos, fundada en el tñido de Gram, y si esta diferencia está de algún modo relacionada con la patogenicidad del organismo de que proceden, son cuestiones cuya decisión requiere el conocimiento previo de más ácidos nucleínicos aislados de otros muchos organismos, patógenos y no patógenos.

Siguiendo este criterio, se ha llevado a cabo el estudio del ácido nucleínico del bacilo de la difteria, de que se da cuenta en este trabajo.

II. MATERIAL EMPLEADO.—Las bacterias empleadas en este trabajo fueron suministradas por «The Parke Davis and Company», a cuya amabilidad debemos la información que sigue.

Son bacterias correspondientes a la raza 8, de Davis & Co. de difteria, cultivadas en un caldo nutritivo preparado con carne magra de vaca picada, conteniendo 0,5 por 100 de sal y 2 por 100 de peptona bacteriológica (P. D. & Co.). La acidez del medio al hacer la siembra de las bacterias es de $pH=8,2$, y el período de incubación de doce días.

Las bacterias fueron sometidas a un tratamiento con fenol para matarlas, separadas por filtración, desecadas en el vacío a 35° y trituradas en un molino de bolas.

De este modo se consigue un polvo finísimo de color amarillento, que es el que hemos empleado como punto de partida en nuestro trabajo.

III. PREPARACIÓN DEL ÁCIDO NUCLEÍNICO DEL BACILO DE LA DIFTERIA.—El procedimiento seguido para la preparación de este ácido ha sido el indicado por Coghill (loc. cit.) para la obtención del ácido nucleínico del bacilo de la alfalfa. A continuación se explican los detalles de una obtención típica.

500 gr. del bacilo de la difteria se mezclaron con dos litros de una solución de NaOH al 2 por 100 hasta formar una pasta homogénea. Esta operación se realizó poniendo el bacilo en un gran mortero de porcelana y añadiendo la solución de NaOH poco a poco, sin dejar de agitar la mezcla. Es conveniente realizar esta operación en la vitrina. Después de una hora fué añadido un litro de agua, y la suspensión resultante, muy espesa, fué neutralizada con ácido acético y centrifugada. Al cabo de quince minutos se obtuvo un líquido muy turbio imposible de aclarar aunque se prolongue la centrifugación. El residuo, después de extraído de las botellas de la centrifugadora con la menor cantidad posible de agua, se dejó en suspensión y se centrifugó de nuevo. El extracto resultante, unido al que resultó de la primera centrifugación, fueron tratados por ácido acético para precipitar la materia proteica. Entonces se añadió una solución coloidal de hidróxido férrico y la suspensión filtrada varias veces por filtro de papel plegado hasta que el líquido que pasa es perfectamente claro, aunque ligeramente amarillento. El ácido nucleínico fué precipitado de esta solución

añadiendo HCl concentrado hasta reacción ácida con el rojo congo, y en seguida, dos volúmenes de alcohol etílico de 90°. Se forma un abundante precipitado blanco que tiene que ser separado lo más pronto posible, por centrifugación, del líquido que sobrenada, para evitar que pueda ser descompuesto por hidrólisis. El precipitado fué lavado en las mismas botellas de la centrifugadora, dos veces con alcohol y otras dos con éter. El éter se separa dejando el precipitado durante unos días en un desecador de vacío.

El ácido nucleínico así obtenido, es un polvo blanco que se disuelve en una solución 0,1 normal de NaOH, dando una solución perfectamente clara, pero ligeramente amarillenta.

El rendimiento obtenido en cada determinación sacando la media de varias determinaciones, fué de 3,6 gr.

La reacción del biuret, realizada de la manera usual, resultó ser negativa, pero repetida según la técnica especial de Osborne, citada por Coghill en su trabajo ya mencionado, resultó ligeramente positiva.

Después de hecha la reacción de la manera ordinaria, se añaden de 10 a 20 gotas de alcohol etílico y un trozo de potasa sólida. El álcali forma la correspondiente sal con el alcohol y arrastra consigo la más mínima cantidad de color debida a la reacción del biuret. Con esta modificación se observa reacción de biuret positiva en soluciones que por el método ordinario dan reacción negativa.

De varias determinaciones fueron elegidas dos, *E* y *F*, que dieron el mismo rendimiento, y con ellas se ha llevado a cabo el análisis del ácido nucleínico de que se da cuenta a continuación.

El análisis se ha hecho siguiendo el conocido criterio de los más modernos investigadores. Se ha hecho determinación de humedad, nitrógeno total, fósforo total, bases púricas, bases pirimidicas, contenido en pentosa y reacción Feulgen, poniendo especial cuidado en las tres últimas, que son la clave, como ya hemos dicho anteriormente, para poder clasificar cualquier ácido nucleínico.

Determinación de la humedad.—La determinación de la humedad se hizo en un desecador Abderhalden a 100° C hasta peso constante. Fueron hechas varias determinaciones tanto en el ácido nucleínico como en el bacilo de la difteria empleado para su preparación, habiendo obtenido los resultados siguientes:

Muestra E:

0,6546 gr. de ácido nucleínico.
0,0962 gr. pérdida de peso.
14,6 por 100 de humedad.

Muestra F:

0,1750 gr. de ácido nucleínico.
0,0227 gr. pérdida de peso.
12,97 por 100 de humedad.

Bacilo de la difteria:

12,12 por 100 de humedad.

*Rendimiento en ácido nucleínico**hecha la corrección de humedad:*

0,81 por 100.

Determinación del contenido en nitrógeno.—El contenido en nitrógeno ha sido determinado por el conocido método de Kjeldahl. Los resultados siguientes están ya calculados después de hecha la corrección de humedad.

Muestra E:

0,1579 gr. de ácido nucleínico.

0,0281 gr. de nitrógeno.

14,39 por 100 de nitrógeno.

0,1946 gr. de ácido nucleínico.

0,0281 gr. de nitrógeno.

14,43 por 100 de nitrógeno.

Muestra F:

0,1098 gr. de ácido nucleínico.

0,0161 gr. de nitrógeno.

14,70 por 100 de nitrógeno.

0,0882 gr. de ácido nucleínico.

0,0130 gr. de nitrógeno.

14,73 por 100 de nitrógeno.

Determinación del contenido en fósforo.—El fósforo ha sido determinado siguiendo el método gravimétrico indicado en «Official and Tentative Method of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists». Descomponiendo la muestra de ácido nucleínico en un matraz Kjeldahl con H_2SO_4 y $NaNO_3$, precipitando después el fósforo al estado de fosfomolibdato y convirtiendo finalmente el fosfomolibdato en pirofosfato magnésico.

Muestra E:

0,1453 gr. de ácido nucleínico.

0,0432 gr. de $Mg_2O_7P_2$.

0,0120 gr. de fósforo.

8,28 por 100 de fósforo.

0,1455 gr. de ácido nucleínico.

0,0431 gr. de $Mg_2O_7P_2$.

0,0120 gr. de fósforo.

8,25 por 100 de fósforo.

Muestra F:

0,1539 gr. de ácido nucleínico.

0,0439 gr. de $Mg_2O_7P_2$.

0,0122 gr. de fósforo.

7,95 por 100 de fósforo.

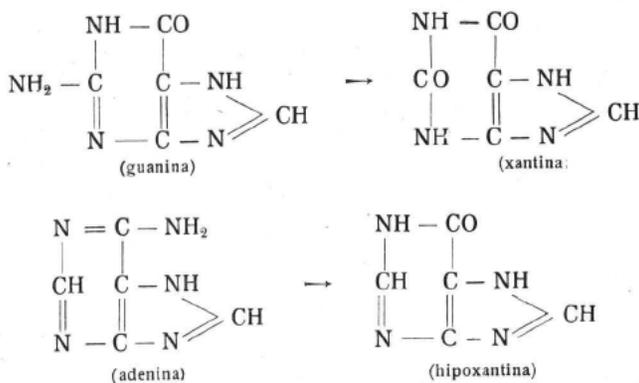
0,1530 gr. de ácido nucleínico.

0,0429 gr. de $Mg_2O_7P_2$.

0,0119 gr. de fósforo.

7,82 por 100 de fósforo.

Identificación de las sales púricas.—El conocimiento actual de la química de las bases púricas en los ácidos nucleínicos ha demostrado de una manera concluyente que sólo dos combinaciones de éstas se encuentran formando parte constituyente de la molécula del ácido nucleínico: guanina y adenina. Se caracterizan estas aminopurinas por su comportamiento hidrolítico, siendo fácilmente desaminadas con formación de las correspondientes oxipurinas, xantina e hipoxantina, transformación que no sólo se lleva a cabo fácilmente por medio de hidrólisis, sino normalmente durante el proceso de autólisis celular bajo la influencia de enzimas específicos:



Esto fué lo que condujo a Kossel (4) en sus primeros trabajos a considerar xantina e hipoxantina como productos primarios de hidrólisis.

Determinación de la guanina.—Se han seguido las indicaciones dadas por Jones (5) en su monografía sobre ácidos nucleínicos, citada anteriormente.

Dos muestras de ácido nucleínico de un gramo cada una, fueron sometidas a hidrólisis durante dos horas y media con 40 c. c. de H_2SO_4 al 10 por 100 (en peso) en un baño maría a 100° . El producto de hidrólisis fué filtrado y antes de frío fué tratado con amoníaco concentrado, añadiendo el reactivo lentamente, hasta reacción neutra con papel tornasol. La guanina se precipita en forma pesada granular, mientras que la adenina permanece en solución. El precipitado fué filtrado y lavado con amoníaco diluido, en un crisol de Gooch, después disuelto en NaOH, filtrado y

(4) A Kossel, *Zeits. f. Physiol. Chem.*, **3**, 284, 1879; **4**, 290, 1880.

(5) W. Jones, *Nucleic Acids., Monographs on Biochemistry.*

recristalizado nuevamente añadiendo ácido acético hasta neutralidad y enfriando la solución a 0°.

El precipitado fué pesado finalmente en un crisol de Gooch después de haber sido desecado en la estufa a 120°.

El resultado de las determinaciones, si bien estos números no se pueden dar con garantía absoluta dadas las dificultades hasta ahora no bien resueltas, para la separación cuantitativa de las bases púricas, es el siguiente:

Muestra E:

1,0681 gr. de ácido nucleínico.
0,1293 gr. de guanina.
12,11 por 100 de guanina.

Muestra F:

0,9730 gr. de ácido nucleínico.
0,1201 gr. de guanina.
12,35 por 100 de guanina.

Determinación del nitrógeno en la guanina obtenida mezclando la obtenida en la muestra E con la obtenida en la muestra F:

0,0742 gr. de guanina.
0,0265 gr. de nitrógeno.
Encontrado: 35,68 por 100 de nitrógeno.
Calculado: 46,35 por 100 de nitrógeno.

El análisis del contenido en nitrógeno nos indica que el precipitado de la guanina contiene otras impurezas, por lo cual es necesario corregir los porcentajes anteriores usando el factor siguiente: $35,68 : 46,35 = 0,77$

Muestra E:

$12,11 \times 0,77 = 9,32$ por 100 de guanina.

Muestra F:

$12,35 \times 0,77 = 9,50$ por 100 de guanina.

La guanina restante fué convertida en cloruro de guanina y recristalizada varias veces, disolviéndola en la menor cantidad posible de HCl al 5 por 100 en caliente y añadiendo un poco de carbón animal.

Dejando enfriar la solución en la nevera se obtuvieron unos preciosos cristales blancos en forma de agujas de cloruro de guanina.

Determinación de la adenina.—El líquido procedente de la separación de la guanina fué concentrado y tratado en caliente por una solución saturada de ácido picrico en alcohol etílico. Después de enfriado en la nevera se formó un precipitado de picrato de adenina, que se purificó por recristalización en ácido acético al 25 por 100.

En todas las determinaciones se obtuvo un rendimiento muy bajo.

La tabla adjunta resume los resultados anteriores.

	Cantidad de bacteria.	Rendimiento en ácido nucleínico.	Humedad.	Nitrógeno total.	Fósforo total	Guanina.
Muestra E.	500 gr.	3,6 gr.	14,6 %	14,39 %	8,28 %	9,32 %
		0,81 %		14,43 %	8,35 %	
Muestra F.	500 gr.	3,8 gr.	12,97 %	14,70 %	7,82 %	9,50 %
		0,81 %		14,73 %	7,95 %	

Identificación de las bases pirimídicas.—La identificación de las bases pirimídicas se ha llevado a cabo de la siguiente forma:

9 gramos de ácido nucleínico fueron añadidos al filtrado procedente de la separación de las bases púricas y previa adición de 23 gr. de H_2SO_4 concentrado fueron sometidos a hidrólisis en un autoclave a 150-160° de temperatura durante cinco horas. El producto de hidrólisis, después de frío, fué diluido hasta un volumen aproximadamente de 300 c. c. y seguidamente tratados con $Ba(OH)_2$ para separar el exceso de H_2SO_4 .

El precipitado de $Ba(SO_4)$ y $Ba_3(PO_4)_2$ fué separado en un filtro Buchner, lavado con agua caliente, puesto en suspensión en agua hirviendo y vuelto a filtrar repitiendo este lavado una vez más. El filtrado, unido a las aguas de loción, fué ligeramente acidificado con H_2SO_4 y concentrado en el vacío hasta un volumen de unos 500 c. c. La concentración se facilita mucho añadiendo un poco de alcohol amílico para evitar la formación de espuma abundante que de otra manera hace imposible la concentración. Al líquido concentrado se le añade una solución concentrada de $AgNO_3$ hasta que la adición de nueva cantidad sobre el líquido que sobrenada, no produce más precipitado. Este precipitado, formado por las sales de plata de las bases púricas, fué separado por centrifugación y lavado varias veces. El líquido procedente de la separación de las bases púricas, combinado con las aguas de loción, fué tratado con $Ba(OH)_2$ hasta reacción alcalina y después fué repetido el mismo tratamiento anterior con $AgNO_3$ hasta que no se forma más precipitado de las sales de plata de las bases pirimídicas.

El método de separación de las bases púricas y pirimídicas está basado en la propiedad de que las sales argénticas de las primeras precipitan en solución ácida, mientras que las de las sales pirimídicas lo hacen en solución alcalina.

El precipitado resultante de las sales argénticas de las bases pirimídicas, después de separado por centrifugación, fué traspasado a un Erlenmeyer por el cual se hizo pasar una corriente de H_2S . Se formó un precipitado de

Ag_2S que, después de filtrado y suspendido en agua caliente, fué tratado nuevamente con corriente de H_2S , para cerciorarse de la descomposición completa de las sales de plata de las bases pirimídicas. El Ag_2S formado en este segundo tratamiento, fué separado por filtración y lavado con agua caliente y el líquido filtrado, unido al obtenido en el primer tratamiento y a las aguas de loción, fué concentrado en el vacío.

En unos cc. de este filtrado, la reacción de Johnson y Wheeler (6) para caracterizar la presencia de la citosina y el uracilo, dió un resultado francamente positivo. Esta reacción se hace muy rápidamente de la siguiente manera: se toman unos 5 cc. de la solución y se añade agua de bromo hasta un color rojo permanente. El exceso de Br es expulsado hirviendo la solución, después de lo cual se añade $\text{Ba}(\text{OH})_2$. La aparición inmediata de una coloración rosa violada debida a la sal de bario del ácido dialúrico, indica la presencia del uracilo o citosina o de ambas bases, puesto que esta reacción es común. Una condición absolutamente necesaria para la buena marcha de esta reacción, es estar bien seguro de expulsar por ebullición el exceso de Br_2 . Llevada a cabo en esta forma la prueba, es sensible para 1 mg. de citosina o uracilo. Como la reacción es común a ambas bases, hay que proceder a su separación para identificarlas separadamente.

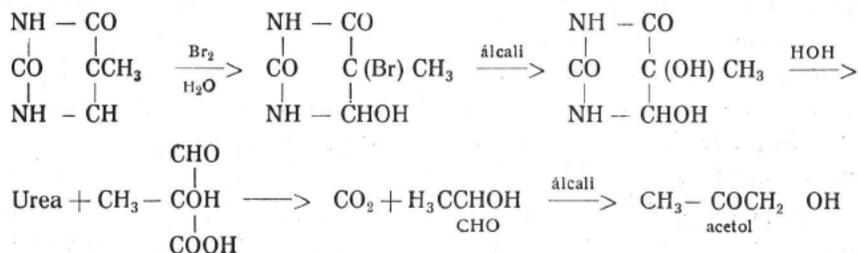
Después de concentrar el líquido procedente de la separación del Ag_2S , fué tratado con el H_2SO_4 necesario para precipitar el exceso de $\text{Ba}(\text{OH})_2$. Una vez separado por filtración el BaSO_4 formado, se precipita la citosina al estado de fosfowolframato por adición de una solución de ácido fosfowolfrámico concentrada hasta asegurarse de que la precipitación ha sido total y se deja en la nevera hasta el día siguiente. El precipitado fué separado en un filtro Buchner y el exceso de ácido fosfowolfrámico de la solución precipitado por $\text{Ba}(\text{OH})_2$, siendo necesario después precipitar cuidadosamente el exceso de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ con H_2SO_4 . La solución libre ya de ácido fosfowolfrámico de H_2SO_4 y de $\text{Ba}(\text{OH})_2$, fué concentrada en el vacío hasta un volumen aproximado de 20 cc., en el que se procedió a identificar la presencia del uracilo repitiendo la reacción de Johnson y Wheeler. Se obtuvo un resultado fuertemente positivo, debido sin duda a la presencia del uracilo, ya que la citosina ha sido previamente aislada.

La solución restante se concentró cuidadosamente en un Erlenmeyer hasta que el uracilo cristalizó en su forma usual, y previamente separado el precipitado por filtración, se procedió a la identificación de la timina aplicando la reacción descrita por Harkins y Johnson. Esta reacción está basada en lo siguiente: 1.º, que la timina se transforma cuantitativamente en 4-hidroxi-5-bromohidrotimina por la acción del agua de bromo (7),

(6) H. L. Wheeler and T. B. Johnson, *J. Biol. Chem.*, **3**, 183, 1907.

(7) W. Jones, *Zeits. f. Physical. Chem.*, **29**, 20, 1900.

y 2.º, que la timina se hidroliza fácilmente con formación de óxido de carbono, acetol y urea. Baudisch (8) se preocupó de estudiar el mecanismo de esta reacción y de interpretar el curso de este proceso hidrolítico, pero no pensó en la posibilidad de aplicarlo a la identificación de la timina en presencia de otros compuestos. Fueron Harkins y Johnson (9) los que de las dos observaciones citadas dedujeron una reacción muy sensible para identificar la timina y formularon el proceso del modo siguiente



El acetol se identifica, finalmente, alcalinizando su solución y tratándola en caliente con aminobenzaldehído de acuerdo con las indicaciones de Baudisch. La aparición de una fluorescencia azul verdosa, debida a la formación del compuesto 3-oxiquinaldina, nos indica que la reacción es positiva. Se ha comprobado que esta reacción es sensible para un miligramo de timina en presencia de 10 miligramos de citosina.

La reacción fué llevada a cabo del siguiente modo: la solución procedente de la separación de la citosina y el uracilo, fué tratada con agua de bromo, hasta la aparición de una coloración rojiza permanente y el exceso de Br expulsado hirviendo la solución. Después se añadió Ba(OH)₂ hasta reacción alcalina, y la sal de bario del ácido dialúrico que se formó, debido a la presencia del uracilo, fué separada por filtración. El líquido filtrado se trató con un poco de KOH al 25 por 100 y un poco de *o*-aminobenzaldehído y se hirvió durante diez minutos, añadiendo una o dos veces más *o*-aminobenzaldehído. Se deja enfriar la solución, se acidifica ligeramente con HCl, se añade HNaCO₃ en ligeroexceso y el precipitado de BaCO₃ que se forma se separa por filtración. El líquido filtrado, si la reacción es positiva, debe presentar una fluorescencia verde. A veces es necesario concentrar la solución previamente para poder observar la fluorescencia. En este caso, la reacción dió un resultado francamente positivo y la fluorescencia pudo observarse fácilmente. Sin embargo, fracasaron todas las tentativas para obtener la timina cristalizada de esta solución, hecho

(8) O. Baudisch, *Biochem. Z.*, **39**, 279, 1918; *J. Am. Chem. Soc.*, **44**, 1585, 1924.

O. Baudisch, and Bass, *J. Am. Chem. Soc.*, **46**, 181, 1924.

O. Baudisch, J and Davidson, *J. Biol. Chem.*, **64**, 238, 1925

(9) H. H. Harkins, T. B. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.*, **51**, 1237, 1929.

explicable en parte, por trabajar con mínimas cantidades que dificultaban mucho más el problema.

La timina para dar la reacción del acetol necesita una oxidación previa con agua de bromo, mientras que pudiera existir ya en la solución acetol procedente de la oxidación de los carbohidratos contenidos en la molécula del ácido nucleínico que, dando también reacción positiva, pudiese conducirnos a error. Teniendo esto en cuenta, repetimos varias veces la reacción sin el tratamiento con agua de bromo; para asegurarnos de que la reacción era debida a la presencia de la timina. En efecto, la reacción dió resultado negativo sin oxidación previa.

Determinación del contenido en pentosa.—El micrométodo de Hoffman ha sido llevado a cabo siguiendo las indicaciones dadas en su trabajo acerca de la microdeterminación de la pentosa en el ácido nucleínico de la levadura (10).

Este método, como todos los métodos modernos para la valoración de la pentosa, está basado en la conversión de la pentosa en furfurool cuando se le destila con HCl de 12-20 por 100 y la valoración cuantitativa del furfurool formado por la reacción colorimétrica con anilina y ácido acético.

En los trabajos de Perrier y Gortner se encuentra que la destilación en corriente de vapor de una mezcla reaccionante conteniendo HCl del 12-20 por 100, no sólo produce una hidrólisis completa de la sustancia que contiene pentosa, con la consiguiente formación de furfurool, sino también el transporte cuantitativo del furfurool formado. Pucher y Youngburg (11), hacen aplicación de este método que más tarde amplía y modifica Hoffman en el trabajo anteriormente citado. Para conseguir resultados cuantitativos, es necesario tener en cuenta las siguientes precauciones: primera, que el agua usada para producir la corriente de vapor contenga un poco de MnO_4K y NaOH para evitar impurezas de cloro u otras sustancias volátiles, y segunda, que el furfurool formado no entre en contacto con tapones de goma. Es muy importante también mantener la temperatura constante en el matraz de destilación. Si la temperatura no es superior a 100° , el vapor de agua se condensa, la mezcla reaccionante se diluye y, por tanto, se dificulta la hidrólisis y se interrumpe el transporte del furfurool formado. Si por el contrario, la temperatura se eleva por encima de 130° , el furfurool se descompone y se oscurece al poco tiempo de formarse.

Hoffman, en su trabajo, dice que tomando estas precauciones la pentosa se descompone cuantitativamente, por lo cual, teniéndolas en cuenta, hemos empleado un aparato adecuado.

(10) W. S. Hoffman, *J. Biol. Chem.*, **73**, 15, 1927.

(11) Pucher and Youngburg, *J. Biol. Chem.*, **61**, 741, 1924.

Se ha usado baño de glicerina como medio más seguro para mantener la temperatura constante a 112°-114° en el matraz de destilación. El aparato era un simple matraz de destilación. Claissen, que forma una sola pieza con el condensador y el tubo de llegada del vapor y en el que la abertura del cuello por donde ha de añadirse la mezcla reaccionante está cerrada con tapón esmerilado, evitando de este modo que el furfurool entre en contacto con taponos o empalmes de goma.

El producto de destilación se recoge en un matraz aforado de capacidad algo mayor que la del líquido que se espera—500 c. c.—, se neutraliza en el mismo matraz añadiendo con una bureta una solución de NaOH al 10 por 100 hasta reacción neutra con rojo congo y la solución se diluye finalmente hasta la marca del matraz aforado.

Usamos el papel rojo congo en lugar de la fenoltaleína, porque al rojo congo vira cuando la solución está todavía en el lado ácido $pH = 7$, mientras que la fenoltaleína vira cuando ya está en el lado alcalino, siendo esto desfavorable para la estabilidad del furfurool.

Se prepara una solución conocida de furfurool equivalente a la cantidad esperada, y para esto se emplea furfurool repetidamente destilado a presión reducida. Se coloca en un matraz aforado del mismo tamaño y se añade HCl y NaOH hasta reacción neutra con el rojo congo, de tal modo, que la cantidad de NaOH añadida sea igual a la que se añadió al producto de destilación. Así tenemos las dos soluciones conteniendo la misma concentración de NaCl y ambas neutras con el rojo congo.

5 c. c. de cada solución se transportan a dos Erlenmeyer pequeñitos y a cada uno de ellos se le añade una mezcla de 1 c. c. de anilina recién destilada y 10 c. c. de ácido acético glacial, se les deja reaccionar durante 10-15 minutos en la oscuridad, y después se les compara en un colorímetro.

Primero fueron hechas varias determinaciones de furfurool en xilosa pura, cristalizada, para comprobar la exactitud del método. Después de una larga serie de determinaciones, nunca fué posible obtener más de 85 por 100 de la cantidad teórica, siendo el valor medio alcanzado el de 83 por 100. Estos resultados difieren de los dados de Hoffman, pero están de acuerdo con Levene y Jorpes, los cuales dicen en uno de sus trabajos (12) que el análisis del contenido en pentosa en ácido guanílico cristalizado obtuvieron un valor medio de furfurool correspondiente al 79,57 por 100 de la cantidad teórica siguiendo el método descrito por Hoffman.

Los resultados obtenidos en el ácido nucleínico del bacilo de la difteria, hecha la corrección de humedad, son los siguientes, después de tomar el valor medio de varias lecturas para cada determinación.

(12) P. A. Levene, E. and Jorpes, *J. Biol. Chem.*, **86**, 389, 1930.

Muestra E:

62,6 mg. de ácido nucleínico.

5,528 mg. de furfurool.

8,638 mg. de pentosa.

13,8 por 100 de pentosa.

97,1 mg. de ácido nucleínico.

8,564 mg. de furfurool.

13,381 mg. de pentosa.

13,78 por 100 de pentosa.

Muestra F:

45,1 mg. de ácido nucleínico.

3,529 mg. de furfurool.

5,514 mg. de pentosa.

12,20 por 100 de pentosa.

54,0 mg. de ácido nucleínico.

4,301 mg. de furfurool.

6,720 mg. de pentosa.

12,4 por 100 de pentosa.

Reacción de Feulgen.—Esta reacción de la fuchsina y del ácido sulfuroso, introducida primeramente por Feulgen (13) como específica del ácido nucleínico del timo cuyos carbohidratos, después de someterlos a hidrólisis se portan como verdaderos aldehidos, puede ser usada con resultado positivo por su análisis cuantitativo, como ha sido demostrado por Winsdtröm (14) con una aproximación de un 2,5 por 100. El ácido guanílico, ni aún en cantidades de 20-30 mg., produce coloración con dicho reactivo que pudiera conducir a error, mientras que 0,2 mg. de ácido nucleínico bastan para que se forme una coloración fácil de apreciar. El trabajo de Widström anteriormente citado muestra, lo que tuve ocasión de comprobar más tarde, los muchos factores que intervienen en la nueva marcha y exactitud del método. La intensidad del color que produce una cantidad dada de ácido nucleínico, depende de lo intensa que haya sido la hidrólisis, de la cantidad de reactivo Schiff añadido y de la acidez del medio en que la reacción se desenvuelve. La reacción Feulgen fué llevada a cabo en el bacilo de la difteria, encontrándose un resultado francamente positivo. En vista del resultado se trató de comparar cuantitativamente dicho ácido nucleínico con el del timo, para lo cual se prepararon varias soluciones de concentraciones diferentes hasta encontrar aquellas concentraciones apropiadas que dieran con el reactivo de Schiff coloraciones comparables dentro de la amplitud de observación del colorímetro.

(13) R. Feulgen, *Zeist. f. physiol. Chen.*, **92**, 1585, 1924.(14) G. Windström, *Biochen. Zeis.*, **199**, 298, 1928.

La técnica 2.^a indicada por Windström se ha seguido en el siguiente experimento:

Dos soluciones del ácido nucleínico del timo y del ácido nucleínico del bacilo de la difteria, ambas de concentraciones conocidas, fueron preparadas en NaOH muy diluída, puesto que dichos ácidos son insolubles en agua. 1 c. c. de cada solución fueron llevados a dos matraces erlenmeyer y después de tratar cada muestra con HCl hasta reacción ácida con papel rojo congo, fueron añadidos 10 c. c. de una solución buffer y sometidos a hidrolisis en el mismo baño de maría durante 2'45". Windström, después de numerosísimas experiencias, ha comprobado, como ya dijimos antes, que pequeñas variaciones en la temperatura y el tiempo en que se realiza la hidrolisis pueden producir pequeñas variaciones en la intensidad del color en soluciones de la misma concentración, por lo que aconseja el empleo del mismo baño de maría para eliminar esta causa de error.

Los productos de hidrolisis, después de fríos, son tratados con 3 c. c. de una mezcla compuesta de un volumen de reactivo de Schiff y dos volúmenes de solución buffer. Este reactivo debe ser mezclado con las dos muestras tan rápidamente como sea posible, pues de otro modo el desenvolvimiento del color no sería uniforme, se dejan reaccionar durante 12-20 horas y después se observan en el colorímetro.

El reactivo Schiff fué preparado de la siguiente forma: por una solución acuosa de fuchsina al 135 por 100 aproximadamente (1,75 gr. de fuchsina en 500 de agua) se hace pasar una corriente de SO₂ hasta que la solución se pone de color amarillo pajizo y no varía prolongando la adición de SO₂. El exceso de SO₂ se extrae en el vacío.

La solución buffer fué preparada con una mezcla de 30,5 c. c. de una solución de citrato sódico y 69,5 de HCl N/10 (*pH* 2,0). La solución de citrato fué preparada a su vez con una mezcla de 21,008 gr. de ácido cítrico cristalizado y 200 c. c. de NaOH, N por litro.

Los resultados obtenidos, hecha la corrección de humedad, son los que a continuación se exponen:

Muestra E:

28,83 por 100 de ácido nucleínico del timo.
26,18 por 100 » » »

Muestra F:

23,97 por 100 de ácido nucleínico del timo.
27,68 por 100 » » »

RESUMEN

1. Ha sido preparado el ácido nucleínico contenido en el bacilo de la difteria siguiendo el método indicado para la preparación del ácido nucleínico del bacilo de la alfalfa.

2. El ácido nucleínico ha sido sometido a una serie de análisis para determinar el contenido en nitrógeno total, fósforo total, bases púricas, bases pirimídicas, pentosa y reacción de Feulgen.

3. Por hidrólisis el ácido nucleínico del bacilo de la difteria produce guanina, adenina, citosina, uracilo y timina. Contiene por lo menos un 13 por 100 de pentosa y la reacción de Feulgen, llevada a cabo según la técnica de Widstrom, indica que un 25 por 100 del ácido nucleínico responde al tipo animal.

DISCUSIÓN

Comparando los resultados obtenidos en el análisis de este ácido con los obtenidos en el análisis del ácido nucleínico de la levadura, del bacilo de la alfalfa, del bacilo de la tuberculosis y de la glándula del timo, se ve que está mucho más íntimamente relacionado con los ácidos nucleínicos del tipo vegetal en contra de lo que debería esperarse, ya que ambos bacilos, el de la difteria y el de la tuberculosis se hallan en el mismo grupo de la clasificación bacteriológica. Sin embargo, a diferencia de los ácidos nucleínicos del tipo vegetal, el ácido nucleínico del bacilo de la difteria da un resultado francamente positivo para la reacción de la timina y para la reacción de Feulgen característica del grupo exosa en la molécula.

* * *

Uno de nosotros (D. B.) debe manifestar aquí su gratitud al Sr. W. A. Neilson, Presidente de Smith College por haberle concedido una beca «Marion Le Roy Burton», que unida a otra beca obtenida de Yale University, le permitieron llevar a término este trabajo.

*Sterling Chemistry Laboratory
Yale University, New Haven, Conn.*
