

Determinación de proteínas en hojas de Citrus. I. Métodos e interferencias

POR

A. L. GARCIA y J. SANCHEZ-ROJAS

ABSTRACT

The Folin-Lowry, UV absorption and Kjeldahl methods, for protein determination using ox albumine as standard, are studied. This last method only as a comparative one.

For the Folin-Lowry method the calibration curves and the corresponding regression equations are established.

At the same time the interferences produced by different solvents and buffers are studied, so as its usefulness to extract vegetal protein.

INTRODUCCION

Los métodos que se usan actualmente para la cuantificación de proteínas vegetales se basan en la utilización de distintas técnicas: colorimétricas (Folin-Lowry, Biuret), espectrofotométricas (absorción en el ultravioleta próximo o lejano), volumétricas (Kjeldahl) y turbidimétricas (precipitación con determinados reactivos). De ellos, los que presentan una mayor aceptación en cuanto a sensibilidad y sencillez, son las de Folin-Lowry, absorción en el ultravioleta y Kjeldahl.

El fundamento del método de Folin-Lowry, es la formación del complejo proteína-Cu, el cual reduce al fosfomolibdato del reactivo Folin-



Ciocalteu produciendo un color azul determinable colorimétricamente. Este método, utilizado desde 1951, ha sido objeto de numerosas revisiones, particularmente en lo que respecta a la estabilidad de la reacción en función del tiempo y temperatura (2, 3, 17, 26, 28) y longitud de onda apropiada para la medida del color (17, 28, 30).

Las proteínas pueden determinarse también por absorción en el ultravioleta próximo (280-270 nm) o lejano (220-200 nm), (11, 22, 34, 35, 36). Entre estas dos variantes, la determinación en el ultravioleta próximo y concretamente a 280 nm, es la más utilizada, ya que ciertos factores que interfieren afectan a la determinación en menor grado a esta longitud de onda (11, 28).

El método se basa en la absorción (a 280 nm) que presentan algunos aminoácidos (triptófano, tirosina y fenilalanina). La complejidad proteica permite admitir que su composición en los aminoácidos citados permanece prácticamente constante, por lo que la absorción que presenta a esta longitud de onda es proporcional a su concentración cumpliéndose, dentro de un rango apropiado, la ley de Beer-Lambert.

El método de Kjeldahl aplicado a la determinación de proteínas se basa en la consideración de que éstas contienen entre el 12-18 % en peso de nitrógeno, lo cual permite considerar como factor de conversión de nitrógeno a proteínas el número 6,25 (19, 27), aunque algunos autores indican valores inferiores, cuando se trata de proteínas vegetales (21, 23, 29).

En la reacción de Folin pueden intervenir, además de las sustancias coloreadas, las que de algún modo actúan sobre el proceso redox de la reacción (4, 14, 16, 24). En la determinación en el ultravioleta próximo en el intervalo 280-270 nm, o mayor, a longitudes de onda próximas a dicha zona del espectro. En ambos casos las sustancias interferentes pueden proceder del extractante (9, 15, 20, 25, 32) o de las extraídas por éste (11, 35).

En el primero de los supuestos considerados, los compuestos más utilizados son detergentes tales como: Dodecilsulfato sódico, desoxicolato sódico y tritón X 100, que se aplican para la solubilización de las proteínas vegetales laminares (13, 18, 33); o medios tamponados a base de Tris y distintas sustancias reductoras (1, 5, 7, 10, 16, 37).

Finalmente, queremos indicar que, aun cuando la bibliografía nos revela la existencia de numerosos procedimientos específicos para evitar ciertas interferencias, en la determinación proteica, pretendemos llegar a unas condiciones de purificación general de las muestras que no impliquen una excesiva manipulación y que ofrezcan las garantías

suficientes para aplicarlas al material vegetal, objeto final de nuestras experiencias.

Para ello, en este trabajo se estudian los métodos de Folin-Lowry y absorción en el ultravioleta, utilizando albúmina de buey como patrón, estableciéndose las condiciones más apropiadas para la aplicación de cada uno de ellos y comparándolos con el de Kjeldahl. Asimismo, se estudia las influencias que ejercen en estas determinaciones los componentes de algunos reactivos necesarios para la extracción previa de las proteínas vegetales.

MATERIAL Y METODOS

1) PROTEÍNA PATRÓN Y REACTIVOS

La proteína patrón utilizada fue albúmina de buey cristalizada. Los reactivos, que se enumeran en los apartados siguientes, así como los extractantes: Dodecil sulfato sódico (D.S.S.), desoxicolato sódico (D.C.S.), tritón X 100, y los componentes del tampón Tris-glicina-glucosa son de calidad R.A.

2) DETERMINACIÓN POR EL MÉTODO DE FOLIN-LOWRY

Para la determinación proteica por este método, son necesarios los reactivos siguientes:

- a) Carbonato sódico al 2 % en hidróxido sódico 0'10 N.
- b) Sulfato cúprico al 0,5 % en tartrato sódico al 1 %. Estas disoluciones deben conservarse por separado y mezclarse momentos antes de su utilización.
- c) Mezcla de reactivos *a* y *b* en la relación 50 : 1 en volumen.
- d) Reactivo Folin-Ciocalteu diluido con igual volumen de agua bi-distilada (34).

A 1 ml de la disolución proteica (en agua o hidróxido sódico 0'2 N) que contenga de 25-500 ug, se le añaden 5 ml de disolución *c*. Se deja reposar durante 10 minutos y a continuación se incorporan 0'5 ml del reactivo *d* agitando constantemente. Se introduce en un baño de agua durante 30 minutos. Por último, se mide el color desarrollado en un espectrofotómetro Hitachi Perkin-Elmer mod. 124.

3) DETERMINACIÓN POR ABSORCIÓN EN EL ULTRAVIOLETA

Se determina directamente la absorción a 280 nm de disoluciones de albúmina, en agua o hidróxido sódico, con concentraciones de 0'1 a 1 mg/ml utilizando el mismo espectrofotómetro.

4) DETERMINACIÓN POR KJELDALH

La determinación se efectúa sobre proteína redisuelta en hidróxido sódico 0'2 N, procedentes de alícuotos iguales de 1.500 ppm y que previamente había sido precipitada con ácido tricloroacético (T.C.A.) al 10 %. La metodología seguida es la del semimicro-Kjeldalh modificado (8).

RESULTADOS Y DISCUSION

Los datos bibliográficos respecto a la estabilidad de la reacción de Folin-Lowry en función del tiempo y temperatura, muestran notables discrepancias. Por ello, consideramos necesario estudiar y concretar la influencia de los citados factores.

Para conocer el tiempo necesario en el cual el desarrollo del color sea total, a temperatura ambiente, se ha medido la intensidad del mismo en dos muestras diferentes a distintos tiempos. Los resultados se exponen en la tabla I.

TABLA I
DESARROLLO DE LA REACCION DE FOLIN-LOWRY A TEMPERATURA AMBIENTE EN FUNCIÓN DEL TIEMPO EN MINUTOS

Muestra	Absorbancias a 500 nm					
	30'	60'	90'	240'	300'	360'
1	0,475	0,510	0,515	0,525	0,540	0,540
2	0,505	0,545	0,560	0,575	0,580	0,580

Los valores obtenidos en estas condiciones muestran que la estabilidad del color se logra a los 300 minutos. Sin embargo, en numerosos trabajos (12, 17, 28, 31) se indica que el color se desarrolla más rápidamente al calentar a temperaturas moderadas.

Para concretar este hecho se han determinado las variaciones en la absorbancia con respecto al tiempo, de disoluciones de albúmina de concentración creciente calentadas a 35° C durante 30 minutos. Tabla II.

De los datos expuestos en las dos tablas anteriores se deduce:

a) En el primer caso, las muestras deben quedar en reposo 5 horas antes de su valoración espectrofotométrica.

b) Las variaciones de la absorbancia con respecto al tiempo, después de calentarlas a 35° C, durante media hora, son mínimas.

c) En el entorno de concentraciones utilizadas, una mayor cantidad de proteína, no requiere condiciones distintas para que la reacción tenga lugar.

TABLA II
DESARROLLO DE LA REACCIÓN DE FOLIN-LOWRY A 35°C EN FUNCIÓN DEL TIEMPO EN MINUTOS

Muestra	Absorbancias a 500 nm			
	0'	60'	120'	240'
1	0,109	0,105	0,100	0,100
2	0,192	0,190	0,190	0,190
3	0,260	0,265	0,270	0,270
4	0,340	0,345	0,340	0,340
5	0,440	0,440	0,440	0,440
6	0,500	0,505	0,510	0,510
7	0,595	0,585	0,590	0,590
8	0,660	0,655	0,655	0,660
9	0,730	0,730	0,730	0,730
10	0,795	0,790	0,795	0,790

En lo que respecta a la longitud de onda apropiada, para valorar el desarrollo del color azul producido, se han seleccionado 750 y 500 nm. En las tablas III y IV se exponen los datos para obtener la curva de

TABLA III
DESARROLLO DE LA REACCIÓN DE FOLIN-LOWRY EN DISOLUCIONES DE ALBUMINA PATRÓN DE CONCENTRACIONES CRECIENTES. LECTURAS DE ABSORCIÓN A 750 nm

Muestra	Concentración (ppm)	Lecturas de absorción			
1	5	0,020	0,025	0,020	0,020
2	10	0,042	0,040	0,040	0,042
3	25	0,092	0,093	0,092	0,093
4	50	0,180	0,180	0,175	0,175
5	75	0,248	0,245	0,243	0,245
6	100	0,325	0,325	0,325	0,330
7	125	0,390	0,390	0,390	0,390
8	150	0,445	0,445	0,445	0,440

TABLA IV
DESARROLLO DE LA REACCIÓN DE FOLIN-LOWRY EN DISOLUCIONES DE ALBUMINA PATRÓN DE CONCENTRACIONES CRECIENTES. LECTURAS DE ABSORCIÓN A 500 nm

Muestra	Concentración (ppm)	Lecturas de absorción			
1	50	0,095	0,090	0,090	0,095
2	100	0,170	0,165	0,170	0,170
3	150	0,245	0,245	0,248	0,248
4	200	0,315	0,320	0,320	0,320
5	250	0,390	0,390	0,390	0,390
6	300	0,450	0,450	0,450	0,450
7	400	0,565	0,577	0,570	0,570
8	500	0,690	0,700	0,695	0,700

calibrado y las ecuaciones de regresión correspondientes respectivamente. En ambos casos se ha utilizado albúmina de buey disuelta en 0'2 N.

Para cada longitud de onda, la curva de calibración puede descomponerse en dos rectas, las cuales, junto con sus correspondientes ecuaciones de regresión, se exponen en la figura 1. La absorbancia se expresa en ordenadas y en abscisa la concentración proteica en ppm.

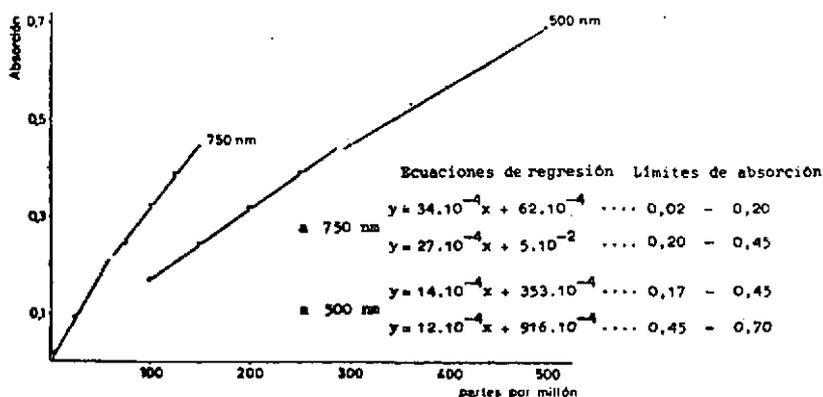


Fig. 1.—Curvas de calibración de albúmina patrón a 750 nm y 500 nm y ecuaciones de regresión.

En la determinación proteica por absorción en el ultravioleta la longitud de onda más empleada es 280 nm, pues los factores que pueden influir afectan en menor grado a esta longitud de onda (35).

Al igual que en las determinaciones colorimétricas, se utiliza para obtener las rectas de calibrado albúmina de buey como sustancia patrón; en un caso disuelta en agua, y en otro NaOH 0'2 N, ante la eventualidad de que las proteínas vegetales, objeto de un estudio posterior, puedan presentarse en medio básico, en cuyo caso la absorción proteica en la región del ultravioleta próximo está notablemente influenciada por el pH del medio (11).

En las tablas V y VI y figura 2, se exponen y representan, respectivamente, los resultados obtenidos.

Se puede observar que las rectas de calibrado obtenidas para una misma concentración proteica no son idénticas. Los valores para la

absorción en medio básico son superiores y en ambos casos se cumple la ley de Beer. Se confirma, por tanto, la influencia del pH del medio en la absorción.

TABLA V

VALORES DE ABSORCIÓN A 280 nm DE ALBUMINA PATRÓN EN AGUA DE CONCENTRACIONES CRECIENTES. MEDIA DE MUESTRAS POR TRIPLICADO

<i>Muestra</i>	<i>Concentración mg/ml</i>	<i>Absorción</i>
1	0,1	0,060
2	0,2	0,115
3	0,3	0,180
4	0,4	0,240
5	0,5	0,300
6	0,6	0,360
7	0,7	0,415
8	0,8	0,475
9	0,9	0,535
10	1,0	0,600

TABLA VI

VALORES DE ABSORCIÓN A 280 nm DE ALBUMINAS PATRÓN EN HIDROXIDO SODICO 0,2 N DE CONCENTRACIONES CRECIENTES. MEDIA DE MUESTRAS POR TRIPLICADO

<i>Muestra</i>	<i>Concentración mg/ml</i>	<i>Absorción</i>
1	0,1	0,075
2	0,2	0,160
3	0,3	0,240
4	0,4	0,320
5	0,5	0,400
6	0,6	0,480
7	0,7	0,550
8	0,8	0,630
9	0,9	0,710
10	1,0	0,790

La determinación proteica por el método de Kjeldhal se usa en la actualidad casi exclusivamente con fines comparativos, y en el mismo sentido se emplea en este trabajo con respecto a los métodos de Folin y espectrofotométrico.

Con el fin de realizar un estudio comparativo anteriormente considerado, se prepararon diez muestras de albúmina patrón de una concentración de 1.500 ppm. Para efectuar la experiencia en condiciones análogas a las de un trabajo posterior, relativo a proteínas vegetales,



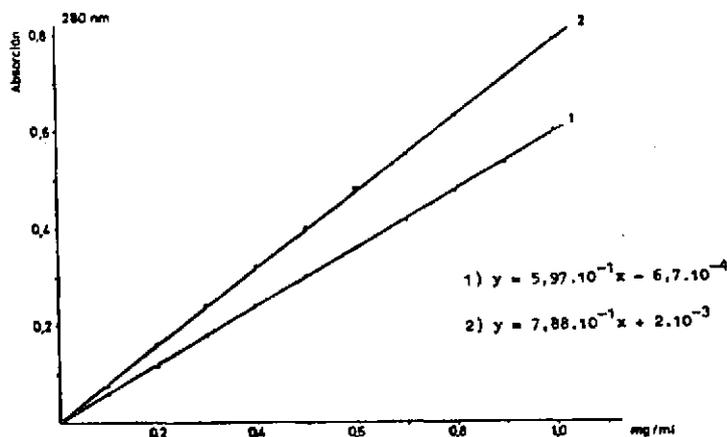


Fig. 2.—Curvas de calibración a 280 nm y ecuaciones de regresión: 1) Albúmina en agua. 2) Albúmina en hidróxido sódico 0,2 N.

se precipitó la proteína presente con T.C.A. al 10 %. Una vez separada por centrifugación se redisolvió en NaOH 0,2 N. Los resultados se exponen en la tabla VII.

TABLA VII

COMPARACION DE METODOS DE DETERMINACION PROTEICA
SOBRE ALBUMINA PATRON

Muestra	Kjeldahl	Polin-Lowry	Ultravioleta
1	1598,8	1499,1	1489,2
2	1495,7	1499,1	1489,2
3	1495,7	1499,1	1506,0
4	1469,9	1521,7	1542,1
5	1418,3	1484,0	1542,1
6	1444,1	1484,0	1506,0
7	1441,1	1521,7	1506,0
8	1595,1	1521,7	1525,3
9	1431,2	1469,0	1542,1
10	1477,0	1536,8	1525,3
Media	1477,0	1503,6	1517,3
E_M	16,20	6,75	6,61
Des. St.	51,25	21,36	20,91
Límites 5 %	1360,3-1592,2	1454,8-1550,7	1469,9-1564,4
C V %	3,47	1,42	1,38

Los datos muestran que no existen grandes diferencias entre los tres métodos, aunque la determinación por Kjeldahl es menos precisa. No obstante, la mayor sensibilidad y rapidez de los métodos de Folin-Lowry y absorción en el ultravioleta próximo (280 nm), hace aconsejable su utilización.

Tanto en la reacción de Folin-Lowry como en la determinación espectrofotométrica se pueden producir interferencias. En la primera, por interacción de sustancias coloreadas y aquellas otras que actúan en el proceso redox; en la segunda, la presencia de sustancias que absorben a 270-280 nm ligeramente o bastante a longitudes de onda próximas a dicha zona del espectro. Los compuestos interferentes son muy numerosos y entre ellos se encuentran los detergentes (D.S.S., D.C.S. y Tritón X 100) y el medio tamponado T.G.G.

Para conocer las posibles interferencias de detergentes y medios tamponados antes citados, se planteó una experiencia a partir de una disolución acuosa de albúmina patrón de concentración conocida. Alícuotos iguales de ésta, se diluyen convenientemente con agua y con cada uno de los extractantes considerados, hasta obtener una concentración idéntica. En cada una de estas muestras se desarrolla la reacción de Folin-Lowry. Las absorciones se detallan en la tabla VIII.

TABLA VIII
REACCION DE FOLIN-LOWRY. VALORES DE ABSORCION A 500 nm
DE DISTINTAS DISOLUCIONES DE ALBUMINA PATRON

Muestra	Disolvente				
	Agua	Dodecil 0,5 %	Desoxicolato 0,5 %	Tritón × 100 0,5 %	Tris pH 8,5
1	0,385	0,385	0,375	0,453	0,837
2	0,380	0,380	0,380	0,450	0,837
3	0,385	0,380	0,380	0,450	0,828
4	0,385	0,380	0,385	0,455	0,832
Media	0,383	0,381	0,380	0,452	0,833

Estos datos ponen de manifiesto que tanto el tritón X 100, al 0,5 %, como el tampón T.G.G., pH 8,5 interfieren considerablemente.

Con el fin de comprobar si estas interferencias se pueden eliminar fácilmente y dado que la precipitación con TCA constituye un procedimiento frecuentemente seguido para la purificación de proteínas (1, 2, 6, 34), se efectuó una segunda experiencia: Volúmenes iguales de disoluciones de albúmina preparadas como en el ensayo anterior, se trataron TCA al 10 %; después de un cierto tiempo, las muestras se centrifugaron 6.000 x g durante 10 minutos y la proteína sedimentada se re-

disolvió en NaOH 0,2 N hasta obtener el volumen inicial. Sobre estas nuevas disoluciones se desarrolló la reacción de Folin-Lowry y se determinó la absorción en cada caso. Los resultados se muestran en la tabla IX.

TABLA IX

REACCION DE FOLIN-LOWRY. VALORES DE ABSORCION A 500 nm DE DISTINTAS DISOLUCIONES DE ALBUMINA PATRON, PRECIPITADAS CON ACIDO TRICLOROACETICO AL 10% Y REDISUELTA EN HIDROXIDO SODICO 0,2 N

Muestra	Disolvente				
	Agua	Dodecil 0,5 %	Desoxicolato 0,5 %	Tritón × 100 0,5 %	Tris pH 8,5
1	0,380	0,375	0,380		0,380
2	0,375	0,380	0,375	No precipita	0,385
3	0,375	0,380	0,380	con TCA al	0,380
4	0,380	0,380	0,380	10 %	0,375
Media	0,377	0,378	0,378		0,380

De los resultados de ambas experiencias se deduce:

1.º Que la precipitación con TCA al 10 % es prácticamente total en las disoluciones tratadas, excepto para el Tritón X 100.

2.º Los extractantes DSS y DCS al 0,5 %, pueden ser utilizados sin que se produzcan interferencias en la determinación proteica por Folin-Lowry.

3.º En el caso del tampón TGG pH 8,5, es necesaria una precipitación previa de la proteína y redisolución posterior en NaOH 0,2 N.

Para estudiar la posible interferencia de los extractantes y tampón anteriormente citados, en la determinación espectrofotométrica, se prepararon disoluciones con idéntica concentración de albúmina en dichos medios, y se determinaron las absorciones correspondientes a 280 nm, utilizando como blanco el agua o el disolvente respectivo. Los valores se exponen en la tabla X.

TABLA X

VALORES DE ABSORCION A 280 nm DE DISOLUCIONES DE ALBUMINA PATRON EN DISTINTOS DISOLVENTES. MEDIA DE MUESTRAS POR TRIPLICADO

Disolvente	Absorción a 280 nm	
	«Blanco»: agua	«Blanco»: disolvente
Tritón × 100 0,5 %	0,964	—
Agua	0,315	0,315
Dodecilsulfato sódico 0,5 %	0,320	0,315
Desoxicolato sódico 0,5 %	0,440	0,315
Tris-glicina-glucosa pH 8,5	0,385	0,310
	diluido 10 veces	

Los resultados indican:

A) El DSS al 0,5 % no interfiere en la determinación proteica.

B) El tampón TGG pH 8,5 y en mayor proporción el DCS al 0,5 %, dan valores superiores a los correctos, si bien esta interferencia puede eliminarse utilizando como «blanco» el disolvente respectivo en lugar de agua.

C) El tritón x 100 a esta concentración, origina un aumento tan considerable en la absorción, que hace imposible la determinación proteica en estas condiciones.

La comprobación de lo expuesto anteriormente se llevó a cabo efectuando barridos en el ultravioleta de cada uno de los extractantes considerados y de sus correspondientes disoluciones proteicas. Los resultados se expresan en la figuras 3 y 4.

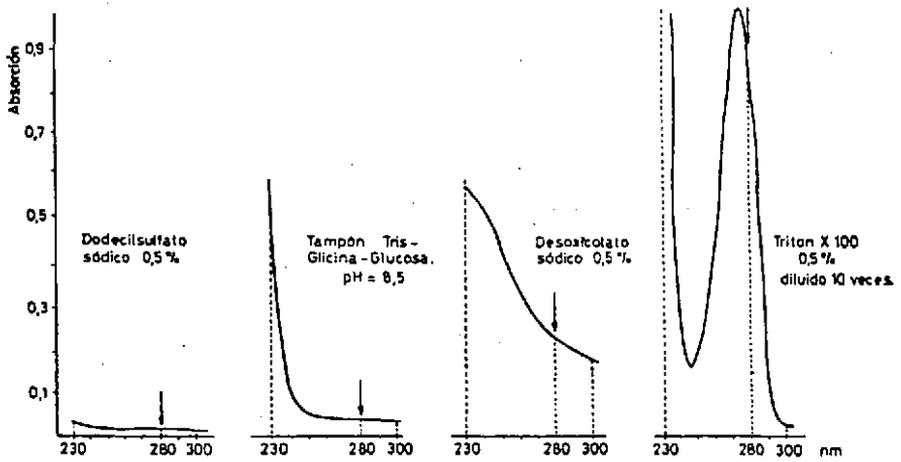


Fig. 3.—Barrido espectrofotométrico en el ultravioleta (300-230 m) de distintos extractantes. «Blanco»: agua.

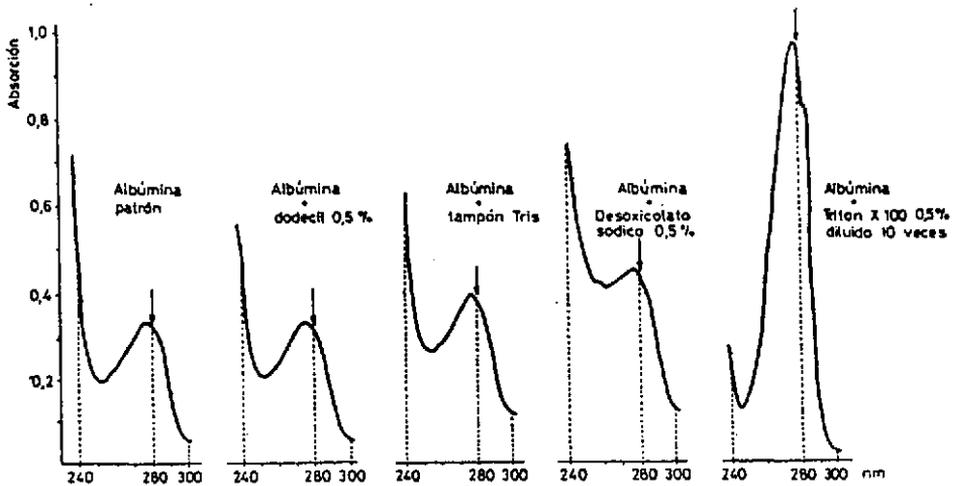


Fig. 4.—Barrido espectrofotométrico en el ultravioleta (300-240 nm) de disoluciones proteicas en agua y distintos extractantes. «Blanco»: agua.

BIBLIOGRAFIA

1. BENSADOU, A., y WEINSTEIN, D., «Assay of proteins in the presence of interfering materials», *Anal. Biochem.*, 70, 241 (1976).
2. BLATTNY, C.; BLATINA, J., y MILLIKAN, D. F., «Modifications in the Lowry protein test for greater accuracy in estimating plant leaf proteins», *Trans. Mo. Acad. Sci.*, 3, 59 (1969).
3. BLUEMEL, P., y VECKER, W., «Protein determination in the presence of glycerol by the Lowry procedure I. Influence of reaction temperature and alkali», *Anal. Biochem.*, 76, 524 (1976).
4. BONITATI, J.; ELLIOTT, W. B., y MILES, P. G., «Interference by carbohydrate and other substances in the estimation of protein with Folin Ciocalteu reagent», *Anal. Biochem.*, 31, 399 (1969).
5. BORDIER, CL., «Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution», *J. Biol. Chem.*, 256, 1604 (1981).
6. BOULTER, D., «Protein synthesis in plants», *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 21, 91 (1970).
7. BRAY, W., «Solvent fractionation of leaf juice to prepare green and white protein products», *J. Sci. Food. Agric.*, 29, 839 (1978).
8. CARPENA, O.; NAVARRO, S., y HELLÍN, E., «Determinación fraccionada de nitrógeno en materia vegetal», *Agrog. y Tecnol. de Alimentos*, 8, 360 (1968).
9. CHEETMAM, P., «A method for the determination of protein in presence of Triton X-100», *Anal. Biochem.*, 93, 139 (1979).
10. *Data for biochemical Research. Preparation and Composition of Biochemical Reagents*, pág. 618. R. M. Dawson y col., ed., Oxford University Press (1969).
11. DONOVAN, J. W., *Ultraviolet absorption. Physical principles and techniques of protein chemistry*. Vol. A, pág. 101. S. J. Leach, ed., Academic Press. New York-London (1969).
12. DORSEY, T. E.; McDONALD, P. W., y ROELS, O. A., «A heated biuret. Folin protein assay which gives equal absorbance with different proteins», *Anal. Biochem.*, 78, 156 (1977).
13. FESTENSTEIN, G. N., «Extraction of proteins from green leaves», *J. Sci. Food Agr.*, 12, 305 (1961).
14. GEIGER, P. J., y BESSMAN, S. P., «Protein determination by Lowry's method in the presence of sulfhydryl reagents», *Anal. Biochem.*, 49, 467 (1972).

15. GREGORY, J. D., y SAJDERA, S. W., «Interference in the Lowry method for protein determination», *Science*, **169**, 97 (1970).
16. HANOWER, P., y BRZO-ZOWSKA, J., «Determination of protein in presence of phenol, sucrose, mannitol, glucose, fructose and Tris, by Lowry's method», *Ann. Aniv. Abidjan Ser. C.*, **31**, 77 (1977).
17. HARTREE, E. F., «Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response», *Anal. Biochem.*, **48**, 422 (1972).
18. HESS, H. H.; LEES, M. B., y DEW, J. E., «A Linear Lowry-Folin assay for both water-soluble and dodecyl sulfate solubilized proteins», *Anal. Biochem.*, **85**, 295 (1978).
19. JENNINGS, A., y WATT, W., «Fractionation of plant material. I Extraction of proteins and nucleic acids from plant tissues and isolation of protein fractions (viciafaba L.) leaves», *J. Sci. Food Agr.*, **18**, 527 (1967).
20. JI, T. H., «Interference by detergents chelating agents and buffers with the Lowry protein determination», *Anal. Biochem.*, **52**, 517 (1973).
21. DAHN, J. B., y BANNISTER, T. T., «A soluble proteinchlorophyll complex from spinach chloroplasts. II the physical and photochemical properties of the complex», *Photoch. Phobiol.*, **4**, 27 (1965).
22. KALB, V. F., Jr., y BERNLOHR, R. W., «A new spectrophotometric assay for protein in cell extracts», *Anal. Biochem.*, **82**, 362 (1977).
23. LEXANDER, K.; CARLUTON, R.; SCHALEN, V.; SIMONSSON, A., y LUNDBORG, T., «Quantities and qualities of leaf protein concentrates from wild species and crop species grown under controlled conditions», *Ann. Appl. Biol.*, **66**, 193 (1970).
24. PETERS, M. A., y FONTS, J. M., «Interference by buffers and other chemicals with the Lowry protein determination», *Anal. Biochem.*, **80**, 299 (1969).
25. PETERSON, G. L., «A simplification of the protein assay method of Lowry et al. wich is more generally applicable», *Anal. Biochem.*, **82**, 346 (1977).
26. RIEDER, H. P., «An improvement of the method of determination of proteins by means of cupric ion and the phenol reagent of Folin Ciocalteu», *Clin. Chm. Acta*, **4**, 733 (1959).
27. SAMSON, A.; KHAUND, R.; CARTER, C., y MATTIL, K., «Extractability of coconut proteins», *J. Food Sci.*, **36**, 725 (1971).
28. SOHACTERLE, G., y POLLACK, R., «A simplified method for the quantitative assay of small amounts of protein in biologic material», *Anal. Biochem.*, **51**, 654 (1973).
29. SENTHESHANMUGANTHAN, S., y DURAND, S., «Isolation and composition of proteins from leaves of plants grown in Ceylan», *J. Sci. Food Agr.*, **20**, 603 (1969).
30. STAUFFER, C., «Linear standard curve for the Folin Lowry determination of protein», *Anal. Biochem.*, **69**, 646 (1975).
31. SUGAWARA, K., «Influence of Triton X-100 on protein determination by Lowry procedure», *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 2429 (1975).
32. TAN, K. K., «Assay of protein by Lowry's method in samples containing 2 mercaptoethanol», *Anal. Biochem.*, **86**, 327 (1978).
33. TAKANAKA, A.; TAKENAKA, O.; MIZOTA, T.; SHTBATA, K., y INADA, Y., «Sodium trichloroacetate as a denaturation reagent for proteins», *J. Biochem. (Tokyo)*, **70**, 63 (1971).
34. TOBS, M. P.; SOUTER, F., y MC LAGAN, N. F., «Spectrophotometric determination of protein at 210 mu», *Biochem. J.*, **73**, 167 (1959).
35. WEBSTER, G. C., «Comparison of direct spectrophotometric methods for the measurement of protein concentration», *Biochim. Biophys. Acta*, **207**, 371 (1970).
36. WHITAKER, J. R., y GRANUM, P. E., «An absolute method for protein determination based on difference in absorbance at 235 and 280 nm», *Anal. Biochem.*, **109**, 156 (1980).
37. WRIGLEY, C. W., y WEBSTER, H. L., «The effects of stem rust infection on the soluble proteins of wheat leaves», *Aust. J. Biol. Sci.*, **19**, 895 (1966).