

MINISTERIO DE EDUCACION DE LA NACION
UNIVERSIDAD NACIONAL DE EVA PERON
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

APORTE A LAS TECNICAS DE DETERMINACION DE AMINOACIDOS
POR ELECTROFORESIS EN PAPEL

NESTOR RODOLFO BOTTINO

1954

Señor Decano.

Señores Consejeros.

Señores Profesores.

Cumpliendo con el requisito reglamentario para optar al grado de Doctor en Química, entregamos a vuestra consideración el presente trabajo de tesis.

Ha sido efectuado bajo la dirección del Profesor Dr. Eduardo R. Scheggia, a quién agradecemos su valiosa colaboración. Expresamos asimismo nuestro reconocimiento al Profesor Dr. Jorge Gascón por el entusiasta apoyo brindado en todo momento; al Profesor Dr. Federico Villalonga Cordomí por su oportuna sugestión y al Dr. Enrique Imerito por su eficiente cooperación técnica.

1 - INTRODUCCION

El estudio, desde el punto de vista químico -biológico, de mezclas complejas de aminoácidos, ya -- producto de hidrólisis de una proteína, ya líquidos biológicos como orina, plasma y sueros sanguíneos, etc., necesita de métodos de separación que permitan identificar un gran número de aminoácidos presentes. Si, además, ese método -- provee de un medio de estimación de las cantidades respectivas de esos componentes, los resultados y conclusiones obtenibles pueden mostrar mejor aun relaciones existentes en lo que se refiere a composición, degradación, fenómenos metabólicos, etc.

Es recién en los últimos años que los intentos de separación y estimación de estas mezclas complejas han llegado a un desarrollo que aunque ya ha dado resultados valiosos, parece prometerlos aún mejores. Nos referimos a las muy variadas técnicas cromatográficas y electroforéticas que, si bien creadas antes, recién desde 15 años atrás han sido objeto de estudio y práctica intensivos.

Compartiendo características de las dos técnicas mencionadas recién, la electroforesis en papel puede considerarse como una simplificación de la llamada electroforesis de límite móvil, con algunas ventajas (aunque también tiene desventajas, como veremos después) tales como la obtención de zonas completamente separadas, el poder trabajar en una escala microquímica y con bajas concentraciones y la simplicidad y economía del aparato necesario.

Con respecto a la cromatografía con papel, aparte de todas las similitudes formales, existe a nuestro juicio una diferencia que justifica nuestra busca: es -- que un electrograma presenta sobre un cromatograma características de mayor nitidez y regularidad de formas, las cuales lo hacen más apto para ensayos cuantitativos. Además -- (32) la electroforesis en papel reposa fundamentalmente sobre la misma teoría básica que el método de límite móvil y puede interpretarse entonces más fácilmente en comparación con los métodos cromatográficos, más empíricos.

Un método de determinación de aminoácidos que incluya una separación con esas cualidades tiene -- que resultar un intento interesante en un laboratorio biológico.

La similitud que hay entre la electroforesis y la cromatografía en papel nos ha hecho pensar en la posibilidad de aplicar a aminoácidos separados por electroforesis una de las técnicas cuantitativas de cromatografía en papel. Estas no proporcionan, o por lo menos hasta el presente no lo han dado, una estimación muy exacta, pero si se tiene en cuenta la complejidad y el tiempo que insume la generalidad de los métodos de evaluación de aminoácidos de otro tipo, puede admitirse cierta tolerancia en el error cometido, a cambio de ventajas tales como rapidez, reproductibilidad, escasa cantidad de muestra necesaria. Estas características hacen que este tipo de técnicas sea de gran utilidad para la fiscalización de procesos en el momento y en -- los distintos grados de su realización.

En el presente trabajo hemos intentado la valoración de un aminoácido, el ácido glutámico, por un método de electroforesis en papel cuantitativa.

Aparte de que el mencionado aminoácido presenta interés general, desde el momento que se encuentra constituyendo una buena proporción de una serie de proteínas bien comunes, existen causas particulares como la importancia que se le ha dado como medicamento en la cura del "petit mal", como condimento (su sal monosódica), etc.

Pero tanto como todo eso pesa en nuestro juicio el hecho de que la aplicación al ácido glutámico, pueda considerarse solo como un ejemplo de las posibilidades del método, es decir, que las consideraciones aplicadas a su separación y posterior evaluación puedan extenderse a la mayoría de los aminoácidos conocidos.

De lo que antecede podrá inferirse que un ensayo como el que presentamos se verá abocado a dos problemas de índole distinta:

El primero, la separación del aminoácido a valorar del resto de los demás componentes de la mezcla; ésta tendrá en nuestro caso un carácter electroforético, por lo que estará emparentada con todas las técnicas que se valen de la corriente eléctrica como causa de movimiento. El segundo, la estimación del aminoácido separado; por las características de nuestro ensayo, esta fase se relacionará con los métodos cuantitativos de cromatografía en papel.

Con eso está esbozado el plan a seguir;

en primera instancia, una revisión rápida de los métodos de separación de aminoácidos más comunes así como los de evaluación post-cromatográfica. Luego, nuestros propios intentos de separación del aminoácido elegido, los cuales, conjuntamente con los antecedentes bibliográficos, han de proveer - las mejores condiciones para esa separación. Después, los ensayos de valoración, que nos han de conducir a la exposición de los resultados finales, discusión y conclusiones.

La designación "electroforesis en papel" a la separación de aminoácidos por el método de electromigración que nos ocupa responde al criterio explicado por Tiselius (157), que consiste en designar con el mismo término a esa técnica, sea cual sea el peso molecular de la sustancia separada.

Otros términos más o menos equivalentes puesto que han sido usados con diferente significado por varios autores, son "ionoforesis en papel", "electroferografía en papel", "ionografía". El de "electrocreoforesis" caracteriza la técnica que incluye evaporación continua de solvente.

Hemos llamado "electrocromatografía" al proceso que combina corriente eléctrica y flujo de solvente; Strain (154) propone el mismo término pero en un sentido más general que comprende tanto la migración eléctrica de iones como la de coloides, en cualquier medio poroso y que sería equivalente al "electroforesis de zona" que hemos utilizado.

En la exposición de métodos de fraccio-

namiento y valoración hemos sacrificado a veces equilibrio en su desarrollo a costa de lograr otros fines. Por ejemplo, el método de electroforesis de límite móvil, de enorme difusión en los últimos años, se trata casi con la misma extensión que otros todavía no totalmente desarrollados. Se ha buscado con oído dar noticia de métodos menos difundidos a expensas de otro que posee una bibliografía abundante y de fácil ubicación.

Motivos parecidos explican el mayor desarrollo de la descripción de los métodos de cromatografía en papel cuantitativa frente a la de otras técnicas de valoración y el del capítulo que trata de electroforesis en papel.

Las secciones se numeran con un sistema "decimal" inspirado en el que ha sido explicado por Davies (42a). Los números se leen como expresiones decimales. La ventaja del sistema es que pueden subdividirse secciones ya existentes e insertarse nuevas secciones en cualquier lugar sin perturbar las secciones adyacentes y sin que haya límite de extensión a las subdivisiones o inserciones.

Las tablas, gráficos y figuras se numeran siguiendo principios similares pero los sistemas no se corresponden entre sí ni con la numeración del texto.

Las referencias bibliográficas se indican entre paréntesis.

2 - MÉTODOS DE SEPARACION Y VALORACION DE AMINOACIDOS

En este capítulo trataremos de dar una noción general, aunque sea esquemática, de los métodos más comunes de separación de aminoácidos y dentro de éstos prestaremos especial atención a los que recurren a una diferencia de potencial para efectuarla. También veremos los métodos de valoración de aplicación común a todos los aminoácidos con especial referencia a los que se valen de la cromatografía en papel para separarlos. Finalmente citaremos algunos de los métodos clásicos de evaluación de ácido glutámico.

2,1 La separación o aislamiento de los aminoácidos a partir de una mezcla compleja puede lograrse mediante alguno de los siguientes métodos, todos ellos de carácter físico, como puede notarse:

2,11 Destilación fraccionada de ésteres de aminoácidos; el principio de esta técnica reside en la separación de los aminoácidos mediante la destilación fraccionada de sus ésteres, al vacío. Fischer propuso en 1901 este método cualitativo, pero investigadores posteriores lo han modificado con cierto éxito, para hacerlo cuantitativo (112, 146a).

2,12 Extracción con alcohol butílico: depende de la distribución de los aminoácidos entre dos fases: agua saturada de butanol y butanol saturado de agua.

2,13 Cromatografía de diferentes tipos (9, 19, 23, 37, 93, 164).

a) de adsorción: sobre carbón activado, sobre óxi-

do de titanio activado, etc.: la adsorción selectiva de los aminoácidos al ser colados a través de esas sustancias ubicadas en una columna, causa su separación. Las fracciones así obtenidas pueden recogerse mediante artificios diversos.

b) de recambio iónico: el agente es en este caso alguna resina sintética intercambiadora de aniones o cationes.

c) de partición: la disolución fraccionada de los aminoácidos por diferentes solventes o mezclas de solventes se logra, ya en una columna que puede llenarse con materiales de soporte muy variados (gel de sílice, almidón, celulosa en polvo) ya en papel de filtro. Salvo casos particulares, el material de soporte no parece tener más acción que ésa: ser el medio rígido en que se ponen en contacto los solutos y un sistema polifásico en el que cada una de las fases tiene diferente afinidad por aquéllos.

d) de "salting out": los aminoácidos son más fuertemente adsorbidos en papel de filtro y otros adsorbentes, en presencia de sales en altas concentraciones. La adsorción puede incrementarse desde prácticamente cero (en agua pura) hasta un valor considerable y el fenómeno utilizarse en separaciones cromatográficas. Con aminoácidos y péptidos la adsorción es muy pequeña en ausencia de sales pero es posible obtener buenos cromatogramas en papel usando, por ejemplo, fuertes soluciones reguladoras de fosfato como medio (71).

2,14 Transporte eléctrico: separación de los aminoácidos individualmente o en grupos mediante pasaje de una corriente continua a través de sus soluciones. Este modo de efectuar

la separación da lugar a una serie de métodos diferentes:

2,141 Transporte eléctrico en solución: se basa en la influencia del pH sobre la disociación de los aminoácidos. Colocando un hidrolizado proteico, mantenido a pH 5,5, en el compartimento central de una célula de tres y pasando una corriente continua a través de la solución, los aminoácidos se separan pronto en tres fracciones bastante netas: una con los de tipo ácido (aspártico, glutámico, β -hidroxiglutámico) que migran hacia el ánodo; otra con los aminoácidos básicos, que van hacia el cátodo; en el compartimento central quedan los ácidos monoamino monocarboxílicos, muy poco disociados a ese pH. Este procedimiento ha sido usado como método preparativo (146a) y como separación cuantitativa (4). Precisamente hay una patente que lo aplica para la separación del ácido glutámico a partir de hidrolizados proteicos.

2,142 Electroforesis de límite móvil, o de Tiselius, o del tubo en U, o en solución libre: al establecerse una diferencia de potencial entre los extremos de un tubo capilar en forma de U que contiene la solución coloidal a separar, se produce un desplazamiento de las partículas coloidales cargadas. Este se observa como un cambio de posición con el tiempo de un límite existente entre esa solución coloidal que contiene las partículas migrantes y otra igual, pero -- sin ellas, tal como una proteína y el regulador frente al cual fué dializada. Esa observación consiste en el registro --sobre una placa fotográfica, por ejemplo,-- de los cambios en el índice de refracción mediante un sistema óptico. Si la solución contiene iones proteicos de diferente carga o --

tamaño, por pasaje de la corriente eléctrica se obtendrá una serie de límites móviles representándolos (1, 2, 6, 21).

Este tipo de métodos se ha aplicado al estudio intensivo de proteínas puesto que permite no solo su separación sino también su evaluación, aparte de que ha aclarado muchos aspectos de la complicada química proteica. La nitidez de los límites depende esencialmente de la contribución a la conductividad total de la solución debida a las sustancias migrantes estudiadas. Con proteínas, el efecto es usualmente pequeño, pero con aminoácidos puede ser tan grande que quita significado a las experiencias (157).

2,143 Microelectroforesis: el principio es análogo al de la técnica del límite móvil, salvo que trabaja con partículas suficientemente grandes y de índice de refracción bien diferente al del medio como para hacerlas visibles al microscopio, mediante el cual es posible tomar cuenta de su movimiento.

Esta técnica ha sido utilizada para comparar las propiedades electrocinéticas de algunos aminoácidos en cristales y en solución (2a).

2,144 Electroforesis de convección o de decantación: un aparato compuesto de una cuba central, limitada por dos membranas de celofán verticales y donde se coloca una solución coloidal, se sumerge en una solución salina donde se encuentran dos electrodos colocados a uno y otro lado de la cuba creando un campo eléctrico horizontal. En esas condiciones, se produce una migración horizontal de las partículas coloidales cargadas, la que crea una diferencia de reparto

de las micelas en la solución. Ese fenómeno causa a su vez una diferencia de densidad y ésta provoca un movimiento de convección que tiende a hacer descender la zona más concentrada hacia la parte inferior de la cuba. Si, por otra parte, algunos iones coloidales son arrastrados hacia arriba por la corriente ascendente, son seguidamente atraídos por el campo eléctrico a la zona descendente y la parte inferior se enriquece entonces en coloides.

Este fenómeno se produce de la misma manera si la cuba tiene un compartimento inferior no sometido al campo eléctrico que sirve en cierto modo de "trampa" de los iones coloidales. A la inversa, el compartimento superior de la cuba, esté o no sometido al campo eléctrico, se empobrece progresivamente. Aplicando el método a proteínas la sedimentación será tanto más rápida cuanto mayor sea la movilidad del ion proteico y ésta es función de la diferencia existente entre el pH de la solución y el pH isoelectrico de la proteína. Teóricamente entonces, la proteína no se moverá si se trabaja al pH de su punto isoelectrico. Si se trata de una mezcla de dos proteínas, haciendo el pH igual al del punto isoelectrico de una de ellas se la podrá purificar haciendo descender la otra a la parte inferior del aparato (26, 27, 100, 121).

Los métodos electroforéticos que terminamos de mencionar tienen un carácter común: es que la separación de las partículas cargadas se efectúa en solución libre. En esas condiciones la separación no es generalmente completa. Para que eso suceda se requiere alguna clase de

medio inmóvil a través del cual efectuar la migración que puede ser vidrio en polvo, amianto, geles variados o papel de filtro. Para este tipo de experiencias que proveen de una efectiva y completa separación en zonas de diferente migración se ha propuesto el término genérico de electroforesis de zona (154, 157).

Están comprendidos en ese grupo los métodos que a continuación citamos:

2,145 Ionoforesis: el material de relleno -que tiene la misión de estabilizar los límites de migración evitando corrientes de convección en los electrolitos- usado en este caso varía en tipo y disposición. Según la última característica se pueden distinguir dos tipos de ionoforesis:

a) en columnas porosas: se ubican los electrodos en los extremos de una columna de algodón (153), o lana de vidrio (36) o de fibra de amianto (25). Se han separado así proteínas y sus hidrolizados.

b) en geles: el material a través del cual se hace pasar corriente es ya una plancha de gel de sílice (32), ya una columna de agar-agar (127). También se han fraccionado así aminoácidos y proteínas, aún de alto peso molecular.

2,146 Electroforesis en papel: la electroforesis en papel es la más reciente técnica electroforética. Consiste esencialmente en el uso de papel de filtro humedecido en una solución reguladora como soporte o puente de migración de iones o partículas cargadas, las que, por la acción de una diferencia de potencial, pueden ser separadas. Aprovechando el diferente sentido y velocidad de migración de cada ion

o partícula se ha conseguido separar mezclas complejas de esas partículas.

Los trabajos sucesivos sobre este tema no han modificado sustancialmente la técnica original que Wieland y Fischer dieron a conocer en 1943 (174): ubicaban una tira u hoja de papel de filtro embebida en solución reguladora y en la que se había sembrado una gota de una solución de la mezcla a separar, dentro de una cámara (dos placas de vidrio o plástico separadas por un marco del mismo material) de manera que quedaran fuera sus extremos. Estos pescaban en vasos conteniendo solución reguladora y en la que estaban también sumergidos los electrodos conectados a una fuente de corriente continua.

Estableciendo una diferencia de potencial entre los electrodos y a través de la hoja de papel, conseguían la separación de los componentes de la mezcla luego de un lapso adecuado para que sus diferentes velocidades de migración se pusieran de manifiesto.

Con diferencias de potencial de 110 voltios y regulador de ácido acético-acetato de sodio, conseguían separar mezclas artificiales de aminoácidos, por lo común fijando uno de ellos al hacer el pH del regulador igual al de su punto isoeléctrico.

Los complejos cobre-aminoácido migraban y podían separarse en la misma forma que los aminoácidos libres, salvo la histidina que aparentemente tenía la propiedad de formar complejos dobles, con otro aminoácido, frente al cobre.

Intentaban una valoración aplicando el llamado "análisis de retención" ideado por Wieland (171), - que detallamos más adelante.

Posteriormente, en 1950, Durrum y Biseg te modificaron esa técnica en diferentes sentidos.

El primero (47) tratando de lograr la - separación de mezclas complejas de aminoácidos y de proteínas, conseguía separar en cinco fracciones una mezcla de 19 aminoácidos utilizando un aparato muy similar al que mencionamos en §3,1 y con las siguientes condiciones de trabajo: - regulador de ftalato de potasio (0,025M) -hidróxido de sodio (0,0125M) de pH 5,9; diferencia de potencial, 600 v.; tiempo 120 minutos y papel Whatman nº 2.

En el mismo papel separaba también una mezcla de alanina, valina, prolina y triptofano, con ácido acético 5M (pH 1,7) como electrolito y un potencial de 500v. en 120 minutos.

También lograba la separación de una mezcla de glicocola, isoleucina, fenilalanina o hidroxiprolina así como la de glicil-glicocola de glicil-l-leucina, en las mismas condiciones.

El estudio de algunas de las condiciones que rigen el desplazamiento electroforético en el papel nos traba que la migración de la fenilalanina no es función lineal del tiempo.

Durrum realizó en este trabajo los primeros intentos de fraccionamiento proteico del suero sanguíneo por electroforesis en papel, comparando los resultados

obtenidos con los de electroforesis libre. Llegó a comprobar la gran similitud de los resultados provistos por ambas técnicas: con dietilbarbiturato de sodio (pH 8,6) como electrolito, un potencial de 350 v. y papel Whatman nº 2 conseguía separar en 130 minutos un suero humano en cinco fracciones equivalentes a las obtenidas en el clásico método de Tiselius. Comparaba también corridas realizadas con un suero humano y su plasma.

Finalmente lograba separar yoduro radiactivo inorgánico de yodo contenido en proteínas.

En el curso de las experiencias mencionadas Durrum recogía las siguientes observaciones:

El papel parece ser meramente pasivo: no hay evidencias de una posible acción adsorbente sobre aminoácidos o proteínas. La migración se efectúa como si fuera en solución libre. En la electroforesis en papel parece haber un equilibrio relativamente complicado de procesos tales como a) migración de iones debido al campo eléctrico; b) difusión; c) flujo electroosmótico; d) evaporación de agua de la tira de papel debida a su calentamiento por el flujo de corriente; e) equilibrio hidrodinámico en el papel entre las fuerzas capilares y las de gravedad; f) cambios de resistencia eléctrica a lo largo de la tira de papel debido principalmente a efectos de concentración junto con los factores d) y e).

En secciones estrechas del papel por encima del nivel de electrolito y en un instante dado, la velocidad de migración es proporcional a la fuerza del campo,

y ésta $X = \frac{I}{q \cdot k_g}$, donde I es la intensidad de corriente; q , el área de la sección transversal del papel y k_g , la conductividad de la solución sobre el papel y en la sección transversal considerada. Si I es constante, la sección transversal también lo es y, por lo tanto debe contener, en cualquier nivel dado, después de establecido el equilibrio, una cantidad dada de electrolito. Esta cantidad varía sin embargo - con el factor e), por lo que la "sección transversal efectiva" del papel debe considerarse como que se incrementa al aproximarse el nivel del electrolito, siendo mínima en el centro. Luego la fuerza del campo será mayor en el centro y - decrecerá con la proximidad del nivel de electrolito. Entonces, el centro, más "seco", tendrá mayor resistencia eléctrica y allí la hoja se calentará más que en las zonas inferiores más "húmedas". Este factor acentuará el "gradiente de humedad" en la parte inferior del papel.

Todo esto explica la falta de relación lineal de la migración con el tiempo; una confirmación experimental puede ser la importancia que tiene sobre la reproducibilidad de los resultados la altura del centro de la hoja con respecto a la del nivel de electrolito.

La migración hacia el cátodo de algunas fracciones proteicas a pH mayor que el isoelectrónico, se considera debido a flujo electroosmótico.

Biserte (13) ideó por su parte un dispositivo desarrollado en el sentido de mejorar la separación en placas de gel de sílice de Consden y colaboradores (32). Conseguía separar una mezcla de los aminoácidos: aspártico,

glutámico, glicocóla, treonina, alanina, prolina, histidina y arginina en un regulador de fosfato M/15 de pH 7,2 durante 3 horas y con 360 voltios a través de bandas de papel de 8 cm. de ancho, en cinco zonas. El análisis de esas zonas mediante la cromatografía en papel mostraba que dos de ellas contenían únicamente los ácidos aspártico y glutámico: las del lado del ánodo; otra, la central, apenas trazas de esos aminoácidos; otra, la inmediata al centro pero del lado del cátodo, agrupaba a la glicocóla, treonina, alanina, prolina y histidina; la quinta, en plena zona catódica, contenía arginina y restos de histidina y glicocóla. La separación podía mejorarse aumentando la duración de la experiencia.

Otro de los ensayos publicados consistía en separar los ácidos glutámico y aspártico en un regulador de acetato M/10 de pH 3, durante 9 horas y bajo 400 v., de una mezcla conteniendo 3 mg. de cada uno de ellos. El resultado era el siguiente: una zona anódica de 7 cm. de ancho que había migrado 5,5 cm. y contenía solamente ácido aspártico y una zona catódica de 5 cm. de ancho que se había desplazado 2,3 cm. de glutámico.

Finalmente ensayaba con éxito la separación, en regulador de pirofosfato M/30 de pH 9,5, durante 6 horas a 400 v., de una mezcla de leucil-glicocóla y glicocóla.

Una nueva publicación de Durrum (43) -- dió a conocer una técnica que inspirada en la cromatografía en papel bidimensional (31) aprovechaba el diferente desplazamiento electroforético que tiene una misma sustancia a di

ferentes valores de pH para lograrla separación de mezclas complejas.

En esencia aquélla consistía en separar en una hoja cuadrada de papel de filtro y en una dirección dada, fracciones de una mezcla a un pH dado; luego, girando la hoja 90°, separar en esta nueva dirección y a otro pH, las fracciones obtenidas antes.

El uso de una hoja de mayores dimensiones involucraba modificaciones en el aparato que no llegaban a ser esenciales. En cuanto a las condiciones de trabajo, eran idénticas.

El inconveniente -alteraciones del pH y de la fuerza iónica- que significaba la presencia de un residuo de electrolito de la primera fase del trabajo, en la segunda, era solucionado por el autor, ya usando en aquélla electrolitos volátiles (generalmente ácido acético) eliminables al secar la hoja entre corridas, ya llevando a cabo esa primera fase en una tira angosta de papel, que retenía poco electrolito residual y adhiriéndola luego a una hoja más grande para realizar la segunda fase de la experiencia.

En la tabla que reproducimos el autor daba a conocer el orden de migración de aminoácidos en papel de filtro (S S Nº 413) en dos electrolitos de pH diferentes.

TABLA 2.1

Orden relativo de migración de aminoácidos en papel de filtro.

Según Durrum (43)

Hacia el cátodo, en ác. acético
0,1 N - (pH 2,3)

Hacia el ánodo, en hidróxido
de amonio 0,2N. (pH 11,3)

Lisina	Acido aspártico
Histidina	Acido glutámico
Arginina	Cistina
Glicocola	
Alanina	Glicocola
	Serina
Valina	Treonina
Isoleucina	Hidroxi prolina
Leucina	Tiroxina
	Metionina
Serina	Histidina
Treonina	Fenilalanina
Metionina	Alanina
Triptofano	Valina
	Isoleucina
Fenilalanina	Leucina
Acido glutámico	Triptofano
Tirosina	
Prolina	
Cistina	Prolina
Acido aspártico	Lisina
Hidroxi prolina	
	Arginina

"Los grupos identifican aminoácidos que tienen movilidads tan cercanas a las de otros bajo las condiciones comunes de operación unidimensional que no son separables, aunque dentro de los diferentes grupos se pueden separar fácilmente aminoácidos individuales de otros aminoácidos individuales, en otros grupos, mediante métodos unidimensionales".

"Una revisión de la tabla sugiere que las separaciones bidimensionales hayan de atenerse a esos valores de pH, por lo menos en los casos en que los aminoácidos caigan en diferentes grupos de movilidad. Por eso, para llevar a cabo separaciones bidimensionales, solamente es necesario desarrollar una técnica que permita el manejo conveniente de láminas anchas de papel de filtro de acuerdo con los principios arriba mencionados".

La parte experimental del trabajo consistía en separar, primero en hidróxido de amonio 0,2 N (pH 11,3) a 400 v. y durante 20 minutos y luego en ácido acético 1 N (pH 2,3) a 1000 v. durante 3 minutos, una mezcla de 19 aminoácidos. En esas condiciones se obtenía una separación parcial, que podía hacerse casi total modificando potencial y tiempo solamente: la primera fase 120 minutos a 500 v. y para la segunda, 130 minutos a 300 v.

En las mismas condiciones y con igual resultado conseguía separar un hidrolizado pancreático de caseína.

En un ensayo de combinar sucesivamente la cromatografía en papel como primera fase de un ensayo bi

dimensional, con la electroforesis como segunda fase, se lograba una buena separación de 17 aminoácidos. La cromatografía era de tipo ascendente, en fenol-agua y se hacía en una tira de papel S S N° 589 de un cm. de ancho durante 19 horas. La fase electroforética contaba con ácido acético N/4 (pH 2,7) como electrolito y duraba 240 minutos con una diferencia de potencial de 1000 v.

También intentaba Durrum separar los aminoácidos de un suero sanguíneo y analizaba la posible interferencia de las proteínas allí presentes. Los resultados obtenidos eran que "por lo común un volumen de suero humano del orden de los 0,01 ml. no contiene cantidades de aminoácidos suficientes como para detectarlas con ninhidrina. Es evidente entonces que la determinación de aminoácidos en derivados sanguíneos requerirá de ordinario su concentración".

Experiencias realizadas corriendo paralelamente soluciones testigo de aminoácidos y muestra de suero o plasma con el agregado de aquéllas mostraban que la disposición obtenida en ambos casos era sensiblemente análoga.

En una serie de ensayos dedicada a caracterizar la movilidad electroforética en papel, Durrum llegaba a la conclusión de que cada soluto (en particular, cada aminoácido) tiene un límite en su movilidad pasado el cual las fuerzas que lo impelen a moverse se equilibran con las que lo detienen. Era así que, iniciando simultáneamente la corrida en varias tiras de papel sembradas en igual forma y sacándolas a intervalos, se observaba que pasado un tiempo dado, los aminoácidos ya no avanzaban más. Asimismo, sem-

brando la misma mezcla en tres puntos situados a alturas diferentes de una misma hoja, resultaba, pasado un lapso adecuado, la misma distribución de las manchas en los tres casos.

Durrum consideraba entonces que los anóxicos habían llegado a sus posiciones de "Equilibrio de movilidad", e interpretaba así los resultados obtenidos: en las separaciones por electroforesis en papel, se desarrolla calor en la tira debido al pasaje de corriente eléctrica. - Generalmente es suficiente para causar destilación de electrolito del papel. Esto entonces se seca y disminuye su estado de saturación capilar por lo que fuerzas capilares sifonan continuamente electrolito fresco de los vasos al papel. Como cada incremento de papel que se sucede más allá de los vasos recibe un volumen de electrolito menor en la cantidad que se ha evaporado en el incremento precedente, habrá una disminución sucesiva de volumen de flujo a medida que el centro se aproxima. Como la sección transversal efectiva del papel es constante, resulta un gradiente en el grado de flujo del líquido a lo largo de la tira de papel, desde cada vaso electrolítico, decreciendo a medida que el centro se aproxima. (La electroosmósis aumenta ese grado de flujo en el lado anódico y lo disminuye en el catódico). Luego, los iones aplicados en el centro del papel encuentran en su desplazamiento una contracorriente cuya velocidad se incrementa constantemente a medida que los vasos electrolíticos se aproximan. Por lo tanto, si la movilidad de un ion dado cae dentro de los valores extremos de la velocidad de ese flujo, -

llegará un momento en que su tendencia a desplazarse contra la corriente debida a su carga en el campo eléctrico, será equilibrada por el flujo de electrolito hacia el centro del papel. Luego, la posición final de migración será independiente del punto de aplicación.

Cambios de pH en el electrolito no pueden ser una explicación de los hechos que respalda a la anterior.

Cuando el electrolito es no-volátil, al efecto mencionado se suma el siguiente: la concentración de electrolito se incrementa constantemente sobre el papel a medida que el agua se evapora. Luego, el migrante, en su desplazamiento en el papel encontrará zonas de fuerza iónica creciente a medida que disminuye la distancia a los vasos de electrolito.

El punto de equilibrio de movilidad de un ion dado se verá afectado así por ese gradiente de fuerza iónica.

Eso explica que la posición de equilibrio de algunas proteínas se desplace y hasta llegue a desaparecer la condición de equilibrio, quizá debido a precipitación de los constituyentes del regulador y consiguientes cambios en el valor del pH.

En la posición de equilibrio, la única fuerza que tenderá a mover un ion será la difusión. Esta será imposible en el sentido de avance, puesto que la detendrá el flujo de electrolito; tampoco podrá efectuarse en el de retroceso, impedida por la atracción del campo eléctrico.

luego, la difusión podrá realizarse únicamente en sentido lateral, lo que ha sido confirmado experimentalmente.

La determinación de movibilidades iónicas por el método presente parece necesitar de modificaciones experimentales para evitar el equilibrio descrito, así como una fiscalización adecuada de los efectos de adsorción y electroosmótico.

En rigor, la consideración del equilibrio de movilidad, que parece ser inevitable en experiencias de larga duración, puede soslayarse en separaciones de iones rápidos, tanto uni como bidimensionales.

Aunque anterior a la publicación citada, puede considerarse como complementario un artículo publicado por el mismo autor (49), en que discute las posibilidades de exactitud de las determinaciones de Mc Donald y colaboradores (106) y la influencia de la adsorción, flujo electroosmótico y uniformidad de condiciones del "puente de papel" en las técnicas del tipo de la que nos ocupa.

Sobre la base de un trabajo anterior -- (38) Kunkel y Fiselius publicaron en 1951 (39) los resultados de una investigación que si bien no se refiere a la separación de aminoácidos sino de proteínas, tiene detalles técnicos y consideraciones teóricas que le dan importancia para nuestro trabajo.

Utilizando un aparato sencillo y de fácil realización en el que quedaban reducidos a un mínimo los factores disturbantes tales como evaporación, calentamiento y gradientes de concentración del regulador, esos autores --

llevaban a cabo un estudio sobre separación y evaluación de los componentes proteicos del suero sanguíneo y otras proteínas, así como determinación de movibilidades de algunas de ellas.

En detalle, los temas tratados eran los siguientes:

a) Separación de mezclas de proteínas purificadas: "el estudio de un gran número de proteínas altamente purificadas, solas o en mezclas artificiales mostraba que las proteínas que son solubles en reguladores alcalinos migraban como manchas netas en papel de filtro y podían ser separadas".

b) Separación de sueros normales y patológicos: - la electroforesis en papel resultaba particularmente apta para el estudio comparativo simultáneo de las proteínas de sueros normales y patológicos. Separaban en la misma hoja de papel hasta cinco sueros diferentes, cuatro de ellos patológicos, logrando de ese modo tener una comparación visual (sin perjuicio de una posterior evaluación) de cada una de las cinco fracciones obtenidas. Estas resultaban ser, de acuerdo a ensayos paralelos de electroforesis libre, de ánodo a cátodo: albúmina, α_1 , α_2 , β , y γ -globulina, ésta muy cerca del punto de aplicación.

Los autores mostraban diagramas correspondientes a sueros de pacientes de nefrosis y cirrosis biliar y hepática, con algunos de los componentes visiblemente aumentados. También de sueros de mielomas, para cuyo estudio y caracterización aseguraban que la electroforesis en papel resulta de particular conveniencia.

c) análisis cuantitativo de los componentes del suero: aplicando los procedimientos esbozados más arriba dado que era factible la separación de segmentos definidos de los diferentes componentes del suero, Kurkel y Tiselius ensayaron la valoración de las fracciones separadas. Las técnicas de estimación consistían, una en colorear la proteína sobre el papel, recortarlo en tiras, eluir el colorante ligado a aquélla y medir la densidad óptica del eluido mediante un espectrofotómetro; la otra, en eluir previamente a la coloración. Una ventaja de la técnica de coloración sobre el papel resultaba la posibilidad de comparar estrechamente ambos métodos al aplicarlos a corridas de réplica efectuadas en tiras superpuestas.

Los resultados que obtenían usando el método de elución del colorante estaban en estrecho acuerdo con los de electroforesis libre si se corregían algo los valores de albúmina y γ -globulina.

Aunque "simple y sorprendentemente exacto", este método tenía su principal defecto en la variada capacidad de ligar colorante de las diferentes proteínas. La estimación resultaba más aproximada usando el segundo método, pero éste carecía de la sensibilidad, simplicidad y precisión del anterior.

Si se trataba de obtener el valor absoluto de la concentración de los componentes del suero como para poder expresarlo en gramos por 100 cc. había que evitar en lo posible la pérdida de proteína, ya haciendo antilumescibles las placas de vidrio mediante su inmersión en una so-

lucción de silicona y posterior secado, ya colocando varias hojas de papel entre las placas y sometiendo luego los recortes del papel a una elución prolongada. De ese modo llegaban a obtener recuperaciones de 93 %.

d) electroforesis bidimensional: con esta técnica cuyos aspectos más generales hemos mencionado ya, y usando la misma solución reguladora para las dos direcciones, los autores llegaban a la conclusión de que "el mayor valor de esta técnica estaba en demostrar que las áreas oscuras entre las diferentes manchas representan a una multitud de componentes menores con diferentes movibilidades. De un diagrama unidimensional podía inferirse que aquellas representan "colas" o extensiones de los componentes mayores. Sin embargo el hecho de que esas áreas devengan colocadas en una línea diagonal después del giro indica que tienen la misma y definida movilidad en ambas direcciones".

e) electroendosmosis y determinaciones de movilidad: Kunkel y Tiselius pudieron medir el grado de electroendosmosis en varios papeles de filtro mediante el uso de una sustancia sin carga significativa que no tuviera movilidad por sí misma en el campo eléctrico pero que se moviera con el flujo electroendosmótico y además fuera coloreable: hallaron que el dextrano se adecuaba a esos requisitos. Sembrando en el mismo punto que la solución proteica -suero sanguíneo, por ejemplo- una solución de dextrano se observaba que éste se desplazaba -en el regulador de barbital usado - generalmente- hacia el cátodo, mientras que los componentes del suero sabemos que lo hacen hacia el ánodo. Un gran nú-

mero de experiencias parece indicar que el movimiento del dextrano da una estrecha aproximación de la extensión del flujo electroendosmótico. Su conocimiento resultaba particularmente importante en la determinación de puntos isoeléctricos: las curvas de movilidad en función del pH distaban de ser rectas cuando aquel punto se descuidaba (sobre todo para proteínas de punto isoeléctrico alto).

Relacionando electroendosmosis y movilidad, los autores encuentran analíticamente que hay una relación entre la distancia de flujo electroendosmótico indicada por el dextrano y la distancia de migración de una proteína específica, albúmina por ejemplo, sobre el papel:

$$\frac{d_{dex}}{d_{alb} + d_{dex}} = cte \quad \text{y} \quad \frac{d_{dex}}{d_{alb}} = cte \quad ; \quad \text{donde } d_{alb} \text{ es -}$$

la distancia que recorre la albúmina sobre el papel y d_{dex} es la que recorre el dextrano en sentido opuesto. La experiencia sobre varios papeles de filtro confirmó esas previsiones.

Considerando que el valor $d_{dex} + d_{alb}$ era la distancia efectivamente recorrida por la albúmina - en su migración electroforética, los autores intentaron - calcular la movilidad de esa proteína en papel de filtro. Para ello y mediante consideraciones de carácter matemático, introdujeron el uso de un factor de corrección que toma en cuenta el hecho de que la proteína migra en el papel a través de una intrincada red de canales. Consiste en el cociente l/l' , donde "l" es la longitud de la tira de papel y "l'", la de un canal tortuoso en aquella misma. Midieron

"l'" mediante la fórmula $l' = R q_a K$, donde "R" es la resistencia de la tira de papel; q_a , el área de la sección transversal y "k", la conductividad.

El factor l/l' representa una característica de cada tipo de papel de filtro y es independiente del medio líquido.

Determinaciones de movilidad de albúmina aislada y de los componentes del suero dieron resultados confirmatorios.

También en el año 1951, McDonald y colaboradores (107) publicaban un trabajo en el que caracterizaban la migración electroforética estudiando por separado algunos de los factores que afectan tal fenómeno: tiempo, potencial, pH y fuerza iónica.

Llegaban a las siguientes conclusiones:

a) contrariamente a lo afirmado por Durrum (47), el movimiento parecía ser una función lineal del tiempo, resultando importante a este respecto el grado en que se humedecía el papel, el modo cómo se humedecía y hasta que punto se mantenía en equilibrio ese grado de humectación; b) la velocidad de migración era directamente proporcional a la diferencia de potencial aplicada; c) variando suficientemente el pH, podía invertirse el sentido de la migración de un soluto dado, pasando por un punto en que ésta era nula o punto isoelectrico. Los valores de puntos isoelectricos obtenidos concordaban hasta cierto punto con los suministrados por otras fuentes; d) la movilidad aumentaba al disminuir la fuerza iónica del regulador. Sin embargo "hay un límite inferior más

allá del cual no conviene diluir el regulador. Cuando la capacidad reguladora de la solución cae por debajo de cierto valor es difícil mantener niveles uniformes de pH a lo largo de la tira de papel durante una experiencia."

La relación entre la movilidad y la recíproca de la raíz cuadrada de la fuerza iónica era de carácter lineal, por lo menos para cierto rango de valores.

Al año siguiente, uno de los autores mencionados, Mc Donald, daba a conocer una reseña sobre el tema que nos ocupa (104) y detalles de un aparato más evolucionado que llamaba ionógrafo.

Como resultado de una serie de experiencias con ese tipo de aparato, McDonald llegaba a las siguientes conclusiones: Los factores que influyen sobre la movilidad electroforética en papel son: tiempo, gradiente de potencial, pH y fuerza iónica del regulador, temperatura, adsorción y electroendósmosis.

El movimiento de un migrante dado es -- función lineal del tiempo, siempre que la energía eléctrica desarrollada por la tira de papel no exceda de cierto valor (0,25 wátios) para tira de un cm. de ancho a 25°C.), ese límite puede variarse, bien reemplazando el aire de la cámara por helio o hidrógeno saturados de vapor de agua, ya disminuyendo la temperatura. También es condición adversa a la relación lineal una fuerza iónica muy alta (mayor de 0,1) en este caso la curva movimiento-tiempo puede representarse por una ecuación empírica. Si se extrapola analíticamente esa curva hasta el tiempo cero, se encuentran para el migran

te valores de movilidad análogos a los provistos por el método del límite móvil, en iguales condiciones. En general, - para obtener un movimiento lineal con el tiempo es importante: el empleo de puentes salinos o "alimentadores", pequeños puentes de papel que suministran electrolito a las partes - intermedias de la hoja y de una atmósfera de helio; que haya uniformidad en la zona de migración en lo que se refiere a la vaina acuosa que rodea al papel (McDonald considera que la migración de las partículas o iones no se efectúa por la luz de los capilares del papel de filtro, sino más bien en la capa de fluido retenida superficialmente. Cree que es una prueba de ello el hecho de que las relaciones de fuerza iónica y movilidad sean análogas en ionografía y en solución libre y de que la movilidad se reduzca al disminuir la cantidad de electrolito que humedece al papel): igualdad de -- composición iónica, gradiente de potencial y temperatura, - evidenciados por lecturas constantes en el miliamperímetro, horizontalidad del papel e igualdad de nivel en los vasos - para evitar flujo de electrolito y con él, el llamado efecto "cromatográfico", es decir, arrastre del soluto antes de aplicar el campo eléctrico. Han demostrado moverse linealmente con el tiempo diversos aminoácidos y proteínas (107, 108), compuestos coloreados tales como el azul de bromofenol, N-(3,5-dinitrofenil)-glicocola y proteínas coloreadas.

El grado de migración eléctrica es directamente proporcional al potencial aplicado (107). El tamaño y la forma del aparato no son factores importantes, por lo que puede usarse cualquier longitud de papel y gradiente de

potencial.

El pH tiene una influencia grande sobre la movilidad de anfólitos tales como aminoácidos y proteínas.

La movilidad aumenta al decrecer la fuerza iónica del regulador, de tal modo que el grado de incremento de la velocidad de migración se hace mayor a medida que la fuerza iónica es más baja. El tiempo requerido para la separación de una mezcla en sus componentes será menor a fuerzas iónicas más bajas. La movilidad es directamente proporcional a la inversa de la raíz cuadrada de la fuerza iónica en una zona grande de los valores de la fuerza iónica, según las experiencias ionográficas. Puede interpretarse entonces que el migrante se mueve como si estuviera sumergido en el seno del líquido, que en este caso sería la vaina acuosa que rodea la tira de papel. En efecto, la movilidad de albúmina de suero bovino y otras sustancias se reduce -- cuando el papel se humedece menos de lo habitual.

En ionografía, el efecto electroendosmótico se presentará como un flujo de electrolito de ánodo a cátodo, motivado por la adquisición por el papel de una carga negativa con relación a una positiva que tomaría el líquido. Aumentará entonces la velocidad de los iones positivos y disminuirá la de los negativos y los puntos isoelectrónicos determinados por este medio serán mayores que los obtenidos mediante otros métodos, siendo la diferencia una medida de la electroendosmosis. Sin embargo, los puntos isoelectrónicos y movilidades estimados por ionografía son muy -- cercanos a los de otro origen por lo que el efecto electroendosmótico parece ser despreciable en las condiciones téc-

nicas propugnadas. No debiera esperarse esa identidad de resultados, dice McDonald, si el migrante no se moviera a través de un camino relativamente libre. Debido a la diferencia de cargas superficiales en las interfases vidrio-regulador y celulosa-regulador, la movilidad ha de ser diferente si el migrante se mueve enteramente dentro de unos pocos diámetros moleculares de esas interfases. Eso puede interpretarse así: en condiciones óptimas, el migrante puede moverse a una distancia tal de la interfase celulosa-regulador que la transferencia electroosmótica de agua a través del papel no afecta apreciablemente la movilidad del migrante. Quizá las técnicas que eliminan la vaina acuosa (por compresión entre -- placas de vidrio, por ejemplo) den resultados en que el efecto electroosmótico esté magnificado.

La movilidad aumenta con la temperatura. La relación existente entre ésta y la movilidad de la albúmina de suero bovino es lineal, según lo muestra una de las figuras de la publicación que nos ocupa. Uno de los puntos de la recta fué determinado por el método del límite móvil.

Ensayos comparativos con seis tipos de papeles de diferente espesor, velocidad de filtración, tersura superficial y fuerza de humectación (wet strength) muestran análoga movilidad de la albúmina de suero bovino. El tipo de papel usado parece ser importante, en cambio, en las técnicas que lo comprimen entre placas.

La adsorción por el papel, debido a la ligera carga negativa que adquiere su superficie, decrecerá la velocidad de los iones positivos mientras que no afecta

rá relativamente la de los negativos. Ese efecto será nulo en el punto isoelectrico del migrante. Será preferible entonces realizar determinaciones de movilidad en reguladores cuyo pH sea superior al del punto isoelectrico del migrante. Los aminoácidos y proteínas estudiadas se eliminan fácilmente del papel, por lo que este factor no parece ser causa de interferencias serias.

En ionogramas realizados en tiras angostas de papel, la concentración del soluto no parece tener efecto sobre la movilidad, tampoco sobre el ancho de las bandas.

Por fin, McDonald da una serie de aplicaciones del método, que citamos en otro lugar.

En 1953, Hacheboeuf y colaboradores (102) en un cambio de punto de vista que parece fructífero, propusieron tratar de regular la evaporación del electrolito, más bien que restringirla. Consideraban que esa evaporación tiene una importancia capital en el desplazamiento de proteínas.

En dispositivos del tipo creado por Durruz (47), un no-electrolito termina -previsto del tiempo necesario- por ocupar la misma posición, una vez aplicado el campo eléctrico, cualquiera sea el punto de la hoja de papel en que haya sido depositado. Los flujos que lo mueven son el de electrolito que repona al evaporado y el electroosmótico. Ahora bien, si actuara solamente el flujo de reposición, el no-electrolito quedaría en el centro de la hoja, habiéndose sembrado allí o no, pero como también existe un flujo electroosmótico, éste lo desplazará hacia el lado

del cátodo. Es decir, que el migrante seguirá el desplazamiento del líquido en el papel.

Experimentalmente, los autores comprobaban que la glucosa ocupa, después del tiempo de electroforesis necesario, el mismo lugar cualquiera sea el punto de aplicación.

Cuando se trate de partículas cargadas o iones, el desplazamiento en un sistema tal será la suma algebraica del desplazamiento electroforético y del desplazamiento del líquido en el papel, es decir, $V = \epsilon + e + E$, donde V es la velocidad de una proteína en el papel (los autores trabajan con proteínas, pero consideramos de interés general las conclusiones a que llegan); ϵ , la velocidad del desplazamiento electroforético del ión proteico con referencia al agua que lo contiene; e , la velocidad del movimiento del agua debido a la electroendósmosis; E , la velocidad del movimiento de agua ocasionado por la evaporación en un punto del papel.

ϵ y e son independientes del lugar del papel que se considere, mientras que E crece a medida que nos alejamos del centro de la hoja, hacia los polos.

Si el pH del líquido es superior al isoelectrico de la proteína, ésta migrará como si se tratara de un anión. Habrá, según la ecuación dada, un punto en que V será nula: cuando $|E| + |e| = |\epsilon|$, que se puede producir puesto que E varía pero e y ϵ no. En él, la corriente de líquido equilibra exactamente el desplazamiento electroforético.

Luego, cada tipo electroforético de proteína será transportado a un punto diferente característico y allí se detendrá. En consecuencia, la posición definitiva de una proteína es independiente de su posición inicial y de la duración de la experiencia, siempre que esa duración haya sido suficiente para lograr el equilibrio. (Esto no es más que el punto de "equilibrio de movilidad" que Durrum -- (43, 49) encontró para aminoácidos).

El caballete que sostiene la hoja y que la divide en dos partes de inclinación inversa, no tiene influencia sobre los fenómenos mencionados.

Una consecuencia de un comportamiento tal es que si por difusión u otra causa algunos de los iones del migrante se retrasan, tienen que vencer una contracorriente menos intensa que los que los anteceden por lo que pronto podrán alcanzarlos. Eso explica la notable nitidez de las manchas que la difusión no puede turbar. Se pueden efectuar entonces largas electroforesis de iones pequeños, muy difusibles, sin que las manchas se agranden demasiado. No puede haber difusión en sentido longitudinal: solamente persiste la difusión transversal, perpendicular a la dirección de la corriente.

Otra consecuencia es que la posición final de un ion es independiente de su punto de partida.

Señalando volúmenes diferentes pero correspondientes a cantidades iguales de una misma solución de proteína se logran, después de la electroforesis, manchas iguales y situadas al mismo nivel. (*)

(*) Respecto al tamaño de la mancha, lo dicho parece ser una confirmación de lo que hemos encontrado con respecto al ácido glutámico, que, en ciertas condiciones y dentro de ciertos límites, aquél depende de la cantidad absoluta y no del volumen depositado.

De acuerdo con lo establecido, una misma proteína podrá migrar en un sentido o en otro, dadas las mismas condiciones, según se encuentre de un lado u otro de su punto de equilibrio. En consecuencia, se podrá hacer encontrar, migrando en el papel en sentidos inversos, dos proteínas cualesquiera, aunque tengan el mismo signo. Eso es aplicable al estudio de las reacciones entre esas sustancias y en particular a la inmunología; también a la realización de reacciones entre iones más pequeños, lo que da lugar a numerosas aplicaciones microanalíticas cualitativas y aún cuantitativas. (Depositando proporciones diversas de dos iones en varios canales paralelos se pueden determinar las proporciones equivalentes para que ninguno de ellos esté en exceso en relación al otro) Una de las sustancias reaccionantes puede ser también un no-electrolito: esto abre posibilidades para el estudio de enzimas.

Los autores llaman *electroforesis* a este tipo de electroforesis en papel con evaporación continua considerando que los factores actuantes son dos opuestos en su acción: el campo eléctrico y la corriente líquida.

Un inconveniente quizá serio de la técnica de evaporación continua parece ser la concentración de sales dejadas en el papel por el electrolito al evaporarse: la fuerza iónica se modifica progresivamente en esas zonas durante la experiencia y en un grado mucho mayor cuanto más lejos esté la zona considerada de los vasos de electrolito (43), influyendo naturalmente sobre la movilidad del migrante. Los autores han determinado variaciones bastante gran-

des en la concentración salina sobre el papel, especialmente en experiencias de larga duración.

En un trabajo complementario del anterior Macheboeuf y colaboradores (99) dieron una interpretación teórica a los hechos mencionados: Establecieron las ecuaciones de movimiento de sustancias cargadas o no en el curso de la electroreoforesis. "La velocidad de ese desplazamiento es la resultante de tres componentes elementales: 1º) la velocidad de la corriente líquida electroosmótica, independiente de la posición en el papel; 2º) la velocidad de migración propia de la sustancia en el campo eléctrico, independiente de la posición en el papel; 3º) la velocidad de la corriente líquida debida a la evaporación, que es una función lineal de la distancia a la línea de flujo líquido nulo"

"La electroreoforesis permite determinar para cada proteína una posición de equilibrio que corresponde al punto donde su velocidad de migración electroforética es igual y de sentido contrario a la de la corriente líquida. Luego, esta última velocidad es proporcional a la distancia a la línea de flujo líquido nulo. La movilidad electroforética es pues una función lineal de la distancia desde la posición de equilibrio a dicha línea y eso permite determinar movilidades electroforéticas por una técnica simple".

"Si se depositan las sustancias a ensayar sobre una línea oblicua, cada sustancia se dispone según una línea recta que gira con el tiempo alrededor de un punto de la línea oblicua inicial. Ese punto fijo permite determinar rápidamente la posición de equilibrio. Es posible

sobre cada "electroforeograma" así obtenido, determinar mediante una fórmula simple el valor del coeficiente de proporcionalidad k entre la velocidad de la corriente líquida y la distancia a la línea de flujo nulo".

El papel parece no retener proteínas no desnaturalizadas, pero sí, en cambio, proteínas desnaturalizadas y algunas materias colorantes (Esto se comprobaba efectuando la cromatografía en papel de esas sustancias, con la solución reguladora como solvente: migraban con el frente de éste). Teniendo en cuenta ese efecto, los autores han generalizado la ecuación que caracteriza el desplazamiento de una sustancia en electroforesis proponiendo un coeficiente de retardo, comprendido entre 0 y 1. El valor 1 corresponde a las sustancias que no sufren acción retardadora del papel. La electroforesis en papel con evaporación continua de solvente puede permitir entonces distinguir dos sustancias de diferente coeficiente aunque tengan igual movilidad electroforética.

Aplicaciones: aunque todavía parece no haber finalizado el período de caracterización de las condiciones técnicas de la electroforesis en papel, el método ha demostrado su aptitud para el estudio de problemas de índole bastante variada.

A continuación daremos noticia, que será solo parcial por la naturaleza misma del tema, del capítulo de las aplicaciones, que está en intenso desarrollo en la actualidad:

- a) Separación y evaluación de proteínas del suero

sanguíneo: es, sin lugar a dudas, el tema que ha merecido - la atención más sostenida de los investigadores, con el deseo de reemplazar una técnica y aparato tan complejo como - el que requiere la electroforesis de límite móvil.

Tales proteínas han sido objeto de muchos intentos de separación cualitativa (47, 54, 61, 62, 101) ó cuantitativa (33, 54, 65, 63, 84, 95, 89, 159, 176); los resultados previstos por esta última no parecen coincidir exactamente con los suministrados por la electroforesis del tubo en U.

Algunos de los factores que afectan los fraccionamientos por la técnica en papel han sido estudiados por Durrum (47 a 50), Kunkel y Tisellius (39), Machebocuf y colaboradores (99, 102), McDonald (104, 103) y Heber (167).

b) Determinación de puntos isoelectrónicos de proteínas (107, 143).

c) Separación de péptidos: se ha conseguido aislar los, ya de mezclas sencillas con aminoácidos (13, 47) ya, - como el poliglutanilpéptido, de otros productos de crecimiento de un bacilo (152).

d) Separación de mezclas complejas de aminoácidos: el tema ya ha sido tratado antes. Añadirémos solamente que intentos de evaluación de los aminoácidos así separados han sido llevados a cabo por Wieland y Fischer (174) y Wieland y Wirth (177) mediante el análisis de retención (ver más adelante) y por Wieland y colaboradores (175) mediante el registro de la radioactividad de electrogramas con Cu^{64}

De gran interés es la aplicación de la

técnica que nos ocupa, conjuntamente con la cromatografía en papel, al estudio cinético de la interacción de aminoácidos y acetaldehído (133).

e) Separación de aminas: Weber (167) ha separado aminas orgánicas, encontrando que la orina humana contiene metilamina y dimetilamina así como otra amina aún no identificada.

La electroforesis en papel ha servido también como segundo paso de una separación bidimensional iniciada con una cromatografía en papel, para la identificación de aminas biológicas presentes junto a aminoácidos en hidrolizados de origen biológico (14).

f) Separación de glúcidos: Conden y Stanior (34) han hallado que es posible fraccionar mezclas de glúcidos naturales por electroforesis en papel, si el electrolito es un regulador de borato. Los complejos de borato formados con los glúcidos migran en el campo eléctrico. Hashimoto y colaboradores (72) han aplicado altos potenciales a la separación de las mismas sustancias así como de flavonoides.

g) Separación de enzimas: Hallenfels y Pechmann (166) han fraccionado mezclas de amilasa, lipasa, fosfatasa y proteínasa mediante la técnica que nos ocupa. También se han descrito separaciones de glucuronidasa, fosfatasa y estearasa (111).

h) Separación de materiales variados: la electroforesis en papel se ha aplicado a la separación de sustancias tales como purinas y pirimidinas (172); ribosa-mononucleótidos (41); derivados del ácido adenosintrifosfórico (169); -

colorantes biológicos (51); derivados del indol (44); venenos animales (120); un hemolizado de eritrocitos humanos con iones fosfato radiactivos; de oxígenidos (173); del complejo hormón tiroide-proteína plasmática (66); de virus vegetales (69).

Separación de iones inorgánicos: ha sido descripta la separación individual o en grupos de varios de esos iones(94).

i) Asimismo se han estudiado sus movi- lidades y calculado números de transferencia que parecen estar en coincidencia aceptable con los proporcionados por otro método (106). El signo de la carga de iones complejos inorgánicos y las constantes de estabilidad de tales complejos han sido también motivo de análisis (86).

La electroforesis en papel en solventes no-acuosos ha sido ensayada por Paul y Durrum (126).

Por su parte, Weber (163) ha intentado una interpretación teórica de la electromigración en soportes porosos.

2,147 Electro cromatografía en papel: esta técnica, muy vecina a la electroforesis en papel, combina una separación debida al campo eléctrico con otra causada por flujo de solvente a través del papel.

La aplicación simultánea y en ángulo recto de estas dos fuerzas permite un tipo de separación que recuerda al de la cromatografía bidimensional.

El sistema consiste esencialmente en establecer en dirección vertical a través de una hoja de papel

de filtro un flujo continuo de un solvente electrolítico de tipo cromatográfico (con fase orgánica) o simplemente una solución reguladora; el líquido fluye a través de un campo eléctrico establecido ya mediante electrodos de níquel, aluminio o platino (9b) convenientemente aplicados a los lados de la hoja, ya mediante inmersión de las puntas inferiores de la hoja en sendos vasos de electrolito en el que pescan los electrodos. Las fracciones separadas se ponen de manifiesto con reactivos colorados apropiados, luz ultravioleta, etc.

Sato y colaboradores (143) dicen respecto a esta técnica: "La electrocromatografía depende de la migración eléctrica diferencial de iones desde una angosta zona de la mezcla en un solvente electrolítico inmobilizado en un soporte poroso tal como una columna rígida o una tira u hoja de papel de filtro. Es una modificación del bien conocido método del límite móvil, en la cual la zona de iones migrantes se hace muy pequeña con respecto a la distancia de migración y la mezcla de las soluciones en el límite está retardada por el soporte poroso (153). Dependiendo de la solución electrolítica y del soporte inmobilizador, la migración de los iones puede ocurrir en la solución y sobre o en el soporte mismo".

"Por analogía con la cromatografía convencional, la que se basa en la migración diferencial producida por flujo de solvente a través de un medio adsorbente, la electrocromatografía ha de estar sujeta a grandes variaciones, particularmente en lo que respecta al aparato, el solvente electrolítico y el material poroso de soporte".

Haugaard y Kroner (73, 74) han conseguido separar de la manera descrita mezclas de 8 aminoácidos en 16 a 18 horas, con fenol como solvente y una diferencia de potencial de 100 voltios. Morris (117) ha modificado algunos detalles de la técnica propuesta por los autores mencionados.

Una variante interesante de la técnica tal como se ha visto es su adaptación a procesos de separación continuos. Si la mezcla se aplica continuamente sobre la hoja y la operación se extiende más allá del tiempo suficiente para que los solutos, arrastrados por el electrolito lleguen al borde inferior del papel, podrán recogerse separadamente diferentes fracciones con solo recortar ese borde en forma de puntas y tomar los extractos en sencillos tubos de ensayo.

El antecedente de este tipo de técnicas parece ser la separación continua de colorantes que Svansson y Brattsten (156) realizaron con un soporte de vidrio pulverizado.

La separación en papel ha sido aplicada por Durrum a mezclas de aminoácidos (50).

Strain y Sullivan (155) así como Sato y colaboradores (143) han llevado a cabo un análisis de los factores que gobiernan el proceso: dimensiones y construcción de la célula, el potencial y la intensidad eléctricos, las propiedades del solvente o del líquido de arrastre, incluyendo sus reacciones en los electrodos, la concentración y las propiedades eléctricas de los iones y la naturaleza de los complejos formados por las mezclas iónicas con el líquido

do de arrastre.

Una ventaja de los métodos continuos es la posibilidad de aislar efectivamente solutos o grupos de solutos en cantidades grandes en relación a las utilizadas en sistemas cromatográficos o electroforéticos en papel.

Por su parte, la electrocromatografía discontinua provee de un medio conveniente para la resolución rápida de mezclas y para la identificación de componentes.

Los inconvenientes que se presentan en la realización de los métodos electrocromatográficos parecen ser análogos a los de la electroforesis en papel: calentamiento de la hoja que puede causar modificaciones en solutos sensibles al calor; fenómenos electrolíticos en las vecindades de los electrodos con el consiguiente cambio de pH y variaciones en la movilidad y resolución de los migrantes (50).

La técnica que consideramos ha sido aplicada a la separación de aminoácidos, (50, 73, 117); de proteínas (50, 67); de colorantes (50); de iones inorgánicos (155), a veces marcados (143); de tierras raras (142).

2,2 Valoración (Métodos generales).

Existen métodos generales de evaluación de aminoácidos que por supuesto incluyen al ácido glutámico y métodos particulares de este aminoácido. Los más comunes son:

2,21 Destilación fraccionada de ésteres de aminoácidos: ya hemos dado el fundamento de este procedimiento. Ligeras modificaciones lo han hecho, según Mitchell y Hamilton (112) más satisfactorio para trabajos cuantitativos, pero numerosas fuentes de error hacen no aconsejable su uso en determinaciones exactas.

2,22 Estimación de los productos de solubilidad de sus sales: el producto de solubilidad de una sal de aminoácido es constante. Si se conoce el producto de solubilidad de la sal y la concentración del ión que no es aminoácido, se puede calcular la concentración de éste. El requerimiento esencial del método es que el hidrolizado proteico, por ejemplo, y el reactivo precipitante sean agitados y filtrados en condiciones de temperatura constante.

La ventaja está en que no es necesaria una completa separación (11, 46, 75, 151).

2,23 Previa separación por cromatografía de intercambio iónico: los aminoácidos se separan en grupos mediante filtrado a través de columnas de alúmina a diferentes valores de pH, se extraen con eluentes apropiados para cada uno de ellos y se valoran luego por separado (170).

La resolución de la mezcla puede también lograrse por pasaje a través de una columna de resina sintética tal como la Dowex 50 (u otra apropiada) seguido de elu

ción a diferentes valores de pH. La cantidad de mezcla necesaria para una técnica tal es de 3 a 6 mg. de aminoácidos. Los valores de recuperaciones alcanzados son de $100 \pm 3 \%$ (116).

2,24 Previa separación por cromatografía de partición en columnas los aminoácidos aislados se obtienen por disolución fraccionada (partición) en un solvente adecuado y adsorción, al pasar a través de una columna de almidón. El filtrado se recoge en porciones de un ml. mediante un colector automático de fracciones. Sobre él se realiza la determinación por medio de un método fotométrico con ninhidrina, especialmente adaptado (113, 114, 150).

Usando diferentes mezclas como solvente se han podido determinar cuantitativamente 18 componentes de las proteínas con datos de recuperación promedio, en determinaciones por duplicado y triplicado de $100 \pm 3 \%$ (115).

2,25 Previa separación por cromatografía en papel: la que sigue es una clasificación de los métodos de cromatografía en papel cuantitativa inspirada en una original de Block (19a):

2,251 Por comparación visual: Consiste en la comparación a simple vista de la superficie e intensidad de las manchas obtenidas de una serie de diluciones del desconocido con una escala testigo obtenida con el mismo aminoácido. En esta técnica es importante depositar volúmenes iguales de solución testigo y desconocida. Volúmenes comprendidos entre 0,0001 y 0,02 ml. dan resultados satisfactorios.

El método permite tres variantes, a saber: a) una comparación gruesa tal como se ha descrito. Solo da estimaciones semi-cuantitativas (130); b) referir -

las intensidades de las manchas obtenidas en el revelado con ninhidrina a los valores de una escala arbitraria de color, pintada a la acuarela y en relación con los colores que se obtienen con cantidades conocidas crecientes de aminoácidos. La escala va dividida de 1 a 10. Cuando el color es tan débil que no puede verse directamente se observa por transparencia se indica como < 1. Los colores de intensidad superior a 10 (que se indican como > 10) o muy superior (\gg 10) corresponden a una zona de concentraciones en que la reacción coloreada es mucho menos sensible. La precisión de esta comparación no supera un nivel de $\pm 25\%$ (45, 164); c) colocar sobre la hoja de papel una serie de gotas conteniendo concentraciones conocidas de las sustancias. Luego aplicar encima de las mismas manchas así como en los espacios en blanco una serie de diluciones del desconocido. Los volúmenes de solución aplicados deben ser iguales en toda la experiencia. Después de la corrida, las manchas del desconocido se comparan con las de desconocido más la cantidad agregada del tipo (12); d) estimar la mínima cantidad detectable en el desconocido, comparada con la cantidad mínima que puede verse cuando se aplica el tipo.

Estos métodos están sujetos a grandes errores y requieren muchos análisis a diluciones variadas para dar resultados satisfactorios, esto es, $\pm 10\%$.

2,252 Elución. Es el método más usado y probablemente el más exacto. Se basa en cortar la sección que contiene una sustancia individual, extraer ésta del papel y determinar su cantidad. A veces, cuando las sustancias están claramente separadas, la exactitud es mayor de $\pm 5\%$. La desventaja de esta técnica reside en que requiere separación absoluta, en el tiempo grande que insume y en la necesidad

de que no haya contaminantes.

Jutiaz (73) considera tres tipos de métodos de elución, a saber: a) elución, reacción con ninhidrina y colorimetría: el aminoácido a estimar se localiza en el cromatograma ya sea mediante luz ultravioleta (56, 123), ya sea utilizando ninhidrina en solución diluida (0,05 %) (91, 119). El papel se corta en trozos conteniendo un aminoácido cada uno, los cuales se tratan con una solución de ninhidrina en presencia de piridina (91) o de una solución reguladora (123) o de una mezcla especial según Stein y Moore (56) y se calienta al baño maría. El color que aparece puede extraerse totalmente con acetona. La densidad óptica de la solución se mide en un fotómetro (7, 119, 123, 133). Ha podido realizarse así un análisis cuantitativo completo de un hidrolizado con 0,2 a 0,3 mg. de una mezcla de 18 aminoácidos comunes con errores relativos inferiores a $\pm 5\%$ (56, 123). Polonowsky y colaboradores (129) han realizado el estudio crítico de uno de los métodos de este tipo; b) elución y reacción de Pope y Stevens: los aminoácidos se ubican con luz ultravioleta, se recorta el lugar que ocupan y se eluyen. Se hacen reaccionar luego con una suspensión de fosfato de cobre de pH 9,3 (reactivo de Pope y Stevens (132) y, después de filtrar el exceso de reactivo, el complejo soluble aminoácido-cobre se dosifica iodométricamente o colorimétricamente con dietilditiocarbamato (17, 92, 147, 131).

El complejo aminoácido-cobre puede determinarse igualmente por polarografía, lo que evita la separación del exceso de reactivo insoluble y hace más sensi

ble el método (103); c) elución y valoración de nitrógeno: esta técnica necesita como mínimo 50 microgramos de aminoácido. La valoración de nitrógeno se efectúa en un microaparato de destilación. Para obtener esa cantidad de aminoácido se depositan numerosas gotitas de la mezcla a analizar lado a lado sobre una línea horizontal trazada sobre una gran hoja de papel de filtro. En el cromatograma obtenido en ella se identifican las zonas correspondientes a los aminoácidos revelando con ninhidrina dos pequeñas bandas recortadas de los dos lados. Las zonas así identificadas se marcan con lápiz y cortan en sentido horizontal. Se eluye el aminoácido de la banda de papel, evapora el eluyente al vacío y se valora nitrógeno en el residuo. Las pérdidas de sustancia analizada que pueden llegar al 65 % se deben a descomposición en el curso de la cromatografía (83).

2,253 Área de la mancha. En un cromatograma en papel, la superficie de las manchas de aminoácidos dadas por la reacción de la ninhidrina es proporcional, dentro de ciertos límites, al logaritmo de la concentración. El área se determina ya mediante un planímetro (4, 19a, 52, 53, 59 y 60), ya copiando con papel carbónico sobre papel milimetrado el borde delimitado y contando el número de cuadrados. La aproximación de esta última técnica es de $\pm 5\%$ (93b). Una exactitud semejante se obtiene recortando y pesando el trozo de papel ocupado por la mancha (93b).

En general, la concentración del desconocido se establece por referencia a curvas establecidas con mezclas testigo de concentración creciente.

La determinación planimétrica se trata

con detalle en el capítulo dedicado a nuestros ensayos de estimación.

Una técnica que tiene en cuenta el tamaño de la mancha aunque no exactamente su área es la que consiste en determinar su longitud si se trata de manchas elípticas regulares. Longitud y logaritmo de la concentración son directamente proporcionales (53).

2,254 Color total de la mancha. La estimación del color total de la mancha puede proveer de un método de valoración relativamente simple, dado que la reacción empleada en el revelado de las manchas de aminoácidos parece seguir la ley de Beer. Técnicas que aplican ese criterio son las que siguen: a) Densidad de color total según Block (15) y Ball y colaboradores (23): cromatogramas unidimensionales paralelos, obtenidos sembrando una hoja ancha con 5 ó 10 - microlitros de testigo y desconocido alternados, se cortan en tiras y cada una de éstas se examina a intervalos de 5 mm. en toda su longitud con un densitómetro (15, 19a, 55). También se examinan 5 a 10 tiras de papel en blanco para tener lecturas de 100 % de transmisión a lo largo de todo el cromatograma. Las densidades medias de color obtenidas de 10 o más tiras coloreadas, así como el promedio de absorción del papel en blanco se llavan a un papel milimetrado (semilogarítmico cuando las lecturas se hagan en por ciento de transmisión) y se determina el área correspondiente a cada aminoácido (136); b) Densidad de color total según -- Rockland y colaboradores (139). Es fundamentalmente similar al anterior salvo que es la mancha completa lo que se registra con un densitómetro o un colorímetro adaptado. -

Puntos importantes de este método son que las manchas deben estar claramente separadas y ser muy pequeñas. Esto último se logra sembrando cantidades muy pequeñas (0,1 microlitro) y corriendo distancias cortas (5 a 10 cm.). El cromatograma terminado se coloca en un soporte adecuado que detiene toda la luz transmitida que no pasa por la mancha colorada. Eso requiere una serie de diafragmas que debe adecuarse a las manchas en el rango de concentración esperado (231)(140). La densidad de color así determinada indica la concentración de sustancia en las manchas si se la compara con curvas patrón. En las mejores condiciones este método provee una exactitud de $\pm 5\%$. Es tedioso si se efectúa a mano, pero si las respuestas de la fotocélula se toman con un galvanómetro automático registrador, es posible unir muchas tiras en serie y pasarlas por el densitómetro fotoeléctrico registrador.

El procedimiento descrito parece ser el más simple de los mencionados, puesto que puede adaptarse a los tipos de colorímetro fotoeléctrico comunes. Sin embargo, tiene la desventaja de que puede usarse solamente cuando las manchas no se superponen mucho y son circulares o regularmente elípticas. Ligeras distorsiones de la mancha causan grandes errores.

2,355 Densidad de color máximo. En la investigación sobre aminoácidos y aminos mediante el método anterior se ha observado que, debido a la naturaleza simétrica de las curvas de densidad y color, pueden obtenerse resultados exactos leyendo la concentración del desconocido directamente de curvas de calibración preparadas con las densidades

de color máximo de las soluciones tipo. Se adapta bien a la cromatografía bidimensional, a la que todavía no pueden aplicarse sistemas mecánicos de examen. Block (19a) ha encontrado que se pueden estimar así aminoácidos con una exactitud de $\pm 10\%$, mediante 13 análisis de réplica; el error puede deducirse aumentando el número de experiencias.

Cromatogramas unidimensionales corridos en una sola hoja se cortan en tiras paralelas o transversales a la dirección de flujo y éstas se examinan con un densitómetro o un espectrofotómetro adaptado (19a), anotando la densidad de color máximo. La concentración del desconocido se lee luego en curvas tipo preparadas previamente o aplicando un número suficiente de soluciones tipo en la misma hoja que el desconocido, haciendo así nuevas curvas de calibración para cada serie de determinaciones. Los registros densitométricos paralelos a la dirección de flujo son algo más exactos que los transversales. Sin embargo éstos son más simples puesto que en 2 á 3 minutos pueden observarse manchas de 22 posiciones si la tira se hace mover por un motor. Todo lo que hay que registrar es la deflexión máxima del galvanómetro para cada mancha (16, 109, 125). Winslow y colaboradores (179) han demostrado que la densitometría de transmisión es superior a la de reflexión cuando se aplican a materiales coloreados sobre papel de filtro.

Los resultados más exactos se obtienen cuando las manchas coloreadas son pequeñas y redondeadas o ligeramente elípticas. Para lograr eso es importante que la solución se aplique como una mancha circular de aproximadamente 5 mm. de diámetro o menos.

2,256 Análisis de retención. Este método constituye uno de los escasos antecedentes de nuestro trabajo, puesto que ha sido aplicado indistintamente a cromatogramas como electrogramas en papel. Consiste en lo siguiente: una vez separada la sustancia problema en un cromato- o electrograma, se desarrollan cromatográficamente éstos con acetato de cobre en tetrahidrofurano en una dirección normal a la anterior. Las moléculas del reactivo que encuentran en su camino ascendente la mancha del aminoácido, son "retenidas" a medida que ello ocurre, de modo que la línea del frente presenta ante cada mancha una depresión o excavadura. Esta limita una superficie que se completa con la prolongación de la hipotética línea normal del frente. Esa área es proporcional a la concentración de la sustancia problema en la mancha.

Las áreas se visualizan por rociado con una solución de ácido rubeánico (ditiocamida) en acetona. Se miden con un planímetro o colocando encima un papel milimetrado transparente (171, 174, 176).

El método no es conveniente en presencia de iones fosfato, sulfato, cloruro (en más de 1 %), malonato, tartrato, citrato y otros (19a).

Mediante esta técnica, Wieland (171) realizó ensayos de determinación de aminoácidos y grupos de aminoácidos. De entre ellos merece nuestra atención el análisis de retención efectuado sobre una mezcla de partes iguales de glutámico y aspártico al 5 % separados por electroforesis en papel a pH 3,7. Una separación de dos horas de duración proveyó una curva con dos cúspides apenas esbo-

zadas (en montura) y de extrapolación hacia la base bastante azarosa, la que sin embargo dejaba entrever la relación de amino-nitrógeno inicial.

Una variante de la técnica descrita se consigue mediante las siguientes consideraciones: sean, por ejemplo, iones Cu^{++} ascendiendo a través de manchas de aminoácidos; sea α la adsorción de Cu^{++} en el papel y β la adsorción de Cu^{++} por el aminoácido; la distancia recorrida por el Cu^{++} en el papel libre es luego $\frac{l}{\alpha} = h$, y la distancia recorrida en la mancha de aminoácido $\frac{l}{\alpha + \beta} = c$.

La relación entre las dos será: $\frac{\alpha + \beta}{\alpha} = 1 + \frac{\beta}{\alpha} = \frac{h}{c}$ (I).

La concentración del aminoácido en cada punto de la depresión en forma de V es proporcional a β/α , lo que, de acuerdo con la ecuación (I) es $\frac{h}{c} - 1$.

Llevando a un sistema de coordenadas $\frac{h}{c} - 1$ frente a la distancia en la tira de papel, se obtienen curvas cuya área es directamente proporcional a la concentración de la mancha.

Este método ha dado muy buenos resultados en muchos casos, pero su punto débil está en que el papel es por lo común no suficientemente uniforme, dando curvas con bordes aserrados. Esto reduce la exactitud así como disminuye la posibilidad de distinguir entre bandas muy cercanas (§3a).

2,257 Método de los derivados isotópicos (96). Una mezcla de compuestos orgánicos se trata por un reactivo isotópico con el fin de formar cuantitativamente un derivado isotópico de los compuestos que la forman. Como "traza

dor" se agrega un gran exceso de derivados no marcados y purificados hasta concentración isotópica constante. Conociendo la radiactividad específica del "trazador" purificado, de un tipo preparado convenientemente y también de la fracción de "trazador" restante después de la purificación, se puede calcular la cantidad del compuesto presente en la mezcla inicial (80, 81).

El principio ha sido aplicado a aminoácidos utilizando como reactivo el cloruro de p- ^{131}I -fenil-sulfonilo (cloruro de pipsilo) y perfeccionando con la inclusión de las técnicas cromatográficas: si uno de los derivados isotópicos puede ser separado cuantitativamente de los otros derivados presentes, puede ser valorado sin agregado de "trazador". El método es en este caso completamente independiente de las técnicas de dilución isotópica, lo que es una ventaja, puesto que ellas son largas y difíciles.

La cromatografía en papel permite separar perfectamente los pipsil-derivados de los aminoácidos. Las bandas radiactivas se localizan por radioautografía y su reactividad se determina recortándolas y midiendo en un contador de Geiger (76, 141). Si T_c es el número total de impulsos en una banda y C_r la concentración molecular isotópica del derivado isotópico puro, T_c/C_r es igual al número de moléculas de sustancia presentes (80, 81, 163, 180).

Este sub-micrométodo cuantitativo es el único de los mencionados cuyos resultados pueden considerarse al abrigo de la crítica (123).

A la misma familia de métodos pertenece el intentado por Wieland y colaboradores (175) formando

complejos de aminoácidos con cobre radiactivo, separándolos por electroforesis en papel, cortando las tiras en bandas angostas y determinando su radiactividad.

2,26 Método de dilución por isótopos. Se acaban de describir los fundamentos de esta técnica. La cantidad de un aminoácido existente en un hidrolizado, por ejemplo, podrá entonces conocerse sabiendo: la cantidad de aminoácido agregada y su contenido de isótopo y el contenido de isótopo del aminoácido aislado (137, 162).

2,27 Determinación microbiológica: la propiedad que tienen ciertos microorganismos de crecer en medios sintéticos permite la aplicación de métodos cuantitativos de determinación de cada componente del medio por separado. En un medio sintético en cuya composición entran varios aminoácidos (15, por ejemplo) pero al que no se ha agregado el aminoácido a valorar, que es esencial para el crecimiento del microorganismo, se hace desarrollar a éste. La cantidad de un producto dado (ácido láctico, por ejemplo, si se usa el *Laetobacillus arabinosus*, que sirve para determinar ácido glutámico, triptófano, treonina, valina, leucina, isoleucina, cistina, lisina o fenilalanina) formado en los ensayos testigo, indica la cantidad de aminoácido presente en el desconocido (97).

2,3 Valoración del ácido glutámico.

2,31 Estimación paralela con el ácido aspártico.

2,311 Precipitación de las sales de calcio por alcohol acuoso, original de Ritthausen, modificada por Foreman se precipitan las sales de calcio de glutámico y aspártico en medio acuoso, previa redisolución, se reprecipitan por

alcohol, se transforman, mediante el ácido fosfo-túngstico, en ácido pirrolidón-carboxílico y éste se extrae con ácido acético glacial. Evaporado el ácido acético, el residuo permite calcular al ser pesado las cantidades de glutámico y aspártico presentes (12).

2,312 Modificación del mismo método por Jones y -- Moeller: precipita las sales de bario en lugar de las de calcio (77).

2,313 Modificación del mismo método por Chibnall: precipita las sales de calcio en medio alcohólico, disuelve y reprecipita con alcohol absoluto. El glutámico se aísla disolviendo en agua y dejando cristalizar en medio clorhídrico concentrado. Se purifica por recristalización en el mismo medio. El ácido aspártico se separa evaporando el líquido madre anterior y precipitando de la solución acuosa del residuo, su sal de cobre (8, 18, 39, 40).

2,314 Modificación del mismo método por Lafage: los aminoácidos precipitados como sales cálcicas se determinan en conjunto transformándolas en fosfato de calcio y determinando colorimétricamente el fósforo. El glutámico se separa luego como sal de zinc y éste se estima iodométricamente (90).

2,315 Previa separación por cromatografía de recambio iónico: no es más que la aplicación a los ácidos glutámico y aspártico, o glutámico solo, del método general esbozado antes (169). La separación se efectúa en columna de alúmina "ácida". Los aminoácidos dicarboxílicos se eluyen juntos o por separado y determinan por métodos diversos (53, 83, 134, 169).

2,32 Estimación de ácido glutámico por separado (méto-

dos específicos).

2,321 Conversión a ácido pirrolidón-carboxílico: en soluciones acuosas casi neutras el equilibrio entre ácido glutámico y ácido pirrolidón-carboxílico tiende a favorecer una completa deshidratación, mientras que en soluciones fuertemente ácidas o alcalinas, la conversión del pirrolidón-carboxílico en glutámico es rápida y prácticamente completa (178). El ácido pirrolidón-carboxílico puede extraerse cuantitativamente de una solución ácida diluida (pH 2,4 \pm 0,2) mediante extracción continua con acetato de etilo, (123, 125).

2,322 Oxidación a ácido succínico: comprende varios parecidos, a saber: a) Procedimiento de micro-oxidación de Cohen y Krebs: el ácido glutámico, por acción de la cloramina T, se oxida a ácido β -cianopropiónico. Este se lleva por hidrólisis a ácido succínico, el cual se determina, manométricamente, midiendo el oxígeno que necesita la dehidrogenasa succínica para transformarlo en ácido fumárico (29, 37); b) El mismo, modificado por Woodhart y colaboradores: difiere del anterior en la manera de obtener el ácido β -cianopropiónico (132); c) Método de oxidación de Agnino y Iaino: el ácido glutámico se desamina, dando ácido hidroxiglutarico, que se oxida con permanganato de potasio a ácido succínico. Este se determina cuantitativamente -- (12).

3. Separación de ácido glutámico por electroforesis en papel.

3,1 Aparatos ensayados. Al comienzo de nuestro trabajo en sayamos disponer las tiras de papel de un modo muy parecido al adoptado por Durrum en su primera publicación sobre este tema (47). "El sistema (fig. 3,1) consistía en una plancha de madera aislada de la mesa mediante tacos de goma, sobre la que descansaban dos vasos (vasos eléctricos), entre y a una cierta altura-variable, por encima de ellos, colocábamos invertido un tubo de vidrio con forma de U en cuyas ramas se insertaban sendos trozos de alambre duro fijos en la base de madera. Ubicábamos la tira de papel de manera que, apoyando su parte media en la barra horizontal de la U invertida, sus extremos pescaran en el electrolito contenido en los vasos. Evitábamos que la tira tocara las paredes de éstos, colocando en su boca un tabito de vidrio ajustado a las paredes con dos pequeños trozos de corcho. También pescaban en el electrolito de los vasos sendos electrodos de carbón (que tomamos de pilas de carbón comunes) conectados respectivamente al polo positivo y negativo de una fuente de corriente continua. Esta fuente nos la proveía con diferencias de potencial que llegaban hasta + 830 voltios con una intensidad máxima de 30 ma. Cubríamos el sistema de vasos, soporte en U y electrodos con una cubeta de vidrio de tamaño adecuado para que descansara en la base de madera. No convenía dejar los electrodos sueltos dentro de los vasos, puesto que lógicamente no adoptaban por lo común posiciones simétricas con respecto a la ó las tiras de papel. A pesar de las observaciones aparentemente

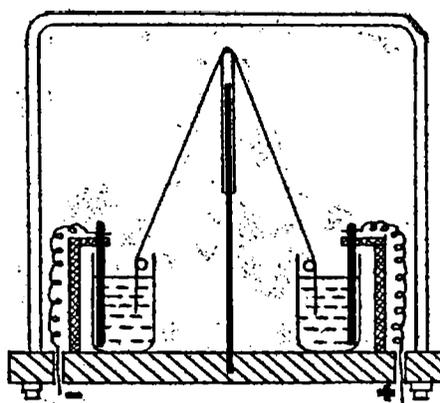


Figura 3.1

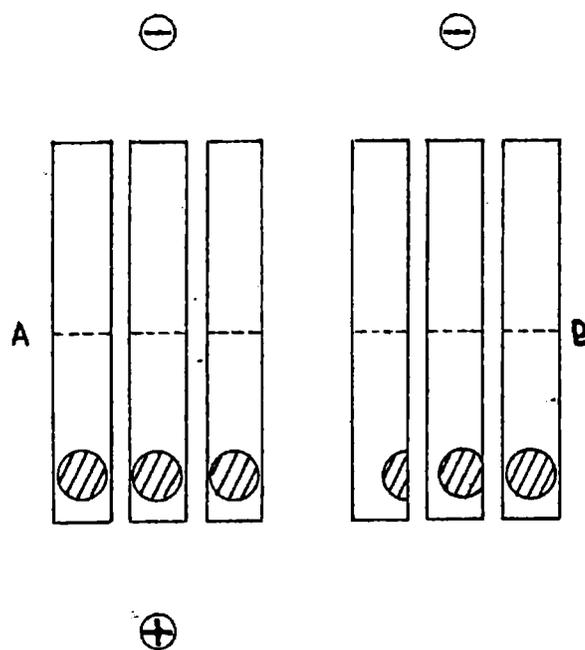


Figura 3.2. Esquema de la deformación de las manchas por excentricidad del electrodo.
A) ánodo en el centro ; B) ánodo a un lado.

en contrario de algunos autores (48) y coincidiendo en cambio con otros (102), cuando no colocábamos las tiras lo más equidistantes posible de los electrodos, notábamos desplazamientos laterales de los solutos, dentro de la misma tira, hacia el electrodo (fig. 3,2). Para evitar tal efecto asegurábamos los electrodos a soportes fijos en la base de madera aunque al mismo tiempo aislados de ésta.

Un dispositivo así adolecía de tres defectos: poca capacidad (no más de tres tiras de 1 cm. de ancho); gran variación del pH del electrolito a causa de procesos electrolíticos en la vecindad de los electrodos; gran volumen en la cámara de evaporación, lo que, relacionado con la escasa superficie del electrolito usado hacía difícil la saturación del ambiente, un factor importante en la reproducibilidad y homogeneidad de las corridas.

La primera de esas dificultades se solucionó reemplazando los vasos usados antes por cubetas del tipo usado en fotografía, de vidrio Pyrex, de 13 cm. de largo por 10 cm. de ancho. Para aislarlas, las apoyábamos sobre trozos de tubos de plástico de longitud conveniente clavados a la base de madera.

Con este sistema podían realizarse corridas con hasta 9 tiras de 1 cm. simultáneamente o una faja de 14 cm. de ancho.

La gran superficie de evaporación que las cubetas proveían hacía menor la tercera dificultad que citamos más arriba.

Ubicábamos los electrodos horizontalmente en el fondo de las cubetas y en todo su ancho.

Una de nuestras experiencias preparatorias consistió en correr simultáneamente 5 tiras de 1 cm. de ancho con la variante de ubicar uno de los electrodos diagonalmente en la cubeta de manera que la distancia de éste a la tira número uno fuera menor que a la tira dos, ésta menor que a la tres, y así siguiendo. El resultado fué que el soluto en la tira número uno se movió una distancia mayor que en cualquiera de las demás tiras, el de la dos avanzó menos que el de la uno pero más que los de las restantes, etc. Es decir, que la distancia recorrida disminuye al aumentar la distancia de la tira de papel al electrodo.

Para evitar grandes cambios de pH en el electrolito arbitrábamos el medio sugerido por McDonald y colaboradores (107) consistente en hacer pescar en diferente cuba que el electrodo y unir ambas mediante un puente de agar-cloruro de potasio contenido en un tubo en U de ramas de distinta longitud. Según esos autores, las proporciones de la mezcla mencionada eran: agar-agar esterilizado al 1 % en solución en cloruro de potasio 1M. McDonald (104) da en cambio la siguiente fórmula: agar esterilizado al 3 % en cloruro de potasio 1,5 N.

En cada cubeta o vaso de electrolito (fig. 3,3) pescaba la rana corta de uno de esos tubos, la larga, atravesando la base de madera por un agujero ubicado a tal efecto, se sumergía en el electrolito contenido en un vaso de precipitados de 100 ml. de capacidad (vaso eléctrico), lo mismo que el electrodo correspondiente.

Para reducir el tamaño de la cámara de

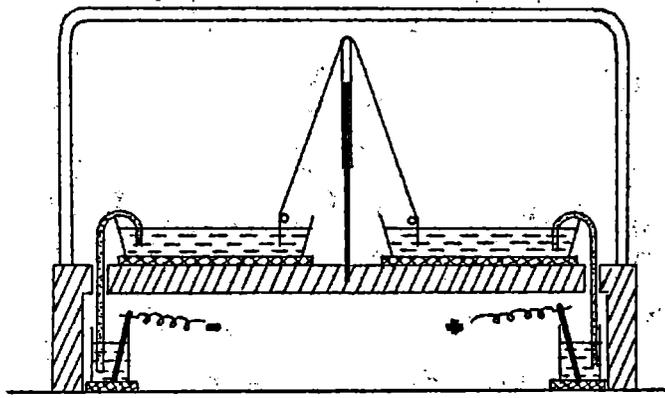


Figura 3,3

evaporación y evitar cambios en el nivel de los líquidos, ensayamos colocar la hoja dentro de una cámara constituida por dos placas de vidrio de 24 por 16 cm., teniendo adherido una de ellas un marco de parafina de unos 3 cm. de alto. La otra placa de vidrio hacía las veces de tapa de tal cámara y al mismo tiempo servía para asegurar las tiras de papel. El conjunto descansaba sobre los bordes de las cubetas.

Ese dispositivo no era en el fondo más que el utilizado por Wieland y Fischer (174).

Una ulterior modificación tendiente a evitar la tediosa preparación del manto de parafina y dar mayor capacidad a la cámara, es la que mencionamos al describir el sistema definitivo utilizado en nuestras experiencias.

Un intento de reemplazar el agar-cloruro de potasio como relleno de los tubos en U consistió en el ensayo que realizamos, inspirado en el trabajo de Tiselius (89) de llenarlos con lana de vidrio. Un puente de tal naturaleza resultaba inconveniente por su gran resistencia al paso de corriente: así, un tubo que con la mezcla agar 3 % - cloruro de potasio 15M tenía de extremo a extremo una diferencia de potencial de aproximadamente 10 voltios, al ser llenado con lana de vidrio presentaba una diferencia alrededor de 10 veces mayor.

A pesar de lo afirmado por algunos autores, también resultaron fallidos los intentos que realizamos de llevar a cabo corridas entre placas de vidrio con papeles de filtro delgados, tipo Whatman, números 1 y 2. -

El interés de una técnica así, que reduce al mínimo la cámara de evaporación y la evaporación misma, nos hizo ensayar reiteradamente su aplicación. En apariencia el inconveniente consiste en que las placas de vidrio se mojan y entre ellas y el papel se forman "lagunas", lo que resulta en discontinuidades de flujo y en la obtención de manchas deformes e irregulares al revelar los solutos después de la corrida. Por ello, untamos las placas, a veces de vidrio despulido, con una fina capa de grasa o de vaselina de acción antihumectante similar a la de la grasa de sílicona y utilizada por Tiselius (39). Ninguno de esos ensayos dió resultados, repetimos, con papeles Whatman números 1 y 2, electrolitos consistentes en mezclas reguladores de acetato y aminoácidos como solutos.

3,2 Aparato y técnica empleados.

3,21 Parte eléctrica. El equipo empleado para trabajar con tensiones de línea de 220 voltios de corriente alterna da es un rectificador de onda completa con derivación central y consta de: un transformador elevador de tensión; un transformador de filamento, dos válvulas rectificadoras; un filtro compuesto de dos inductancias, un condensador de aceite y cuatro condensadores electrolíticos; una resistencia tipo vitrificada.

El transformador de alta tensión posee cinco derivaciones que mediante una llave de cinco puntos permiten variar la tensión en aproximadamente 50 voltios. El punto medio se conecta a chasis (negativo general).

El transformador para encendido de los filamentos de las válvulas posee derivación central que se

utiliza como positivo general.

El sistema de filtro está constituido por dos secciones con entrada a condensador y dos inductancias alternativamente unidas a cuatro condensadores electrolíticos, estando estos en serie de dos en dos a fin de aumentar su aislación total.

Finalmente, una resistencia variable - que cumple la finalidad de descargar los condensadores, evita la posibilidad de que la fuente funcione en vacío y además oficia de regulador.

Con este equipo pueden seleccionarse tensiones desde un máximo de 830 voltios de corriente continua. (*)

3,22 Aparato. El aparato definitivamente adoptado por nosotros para la realización de corridas electroforéticas en papel, consiste esencialmente (fig. 3,4) en una cuba del tipo usado en fotografía, de vidrio Pyrex, de 19 por 14 cm. que hace de cámara, con una tapa de vidrio adaptada para dar un cierre casi hermético mediante un reborde de parafina. Lateralmente, con sus lados de mayor longitud adosados a los lados más cortos de la cuba grande, van dos cubetas menores o vasos de electrolito (de vidrio o porcelana; 15 por 11 cm.). A continuación se ubican dos vasos de precipitados de 100 ml. de capacidad (vasos electrolíticos). Las tres cubas descansan sobre una plancha de madera de 50 por 15 cm., de la que las separa una plancha de goma delgada. En cada uno de los vasos de electrolito se coloca una canti

(*) Se debe al Dr. Enrique Imerito la concepción, construcción y mantenimiento del aparato descrito. Mucho agradecemos su valiosa colaboración.

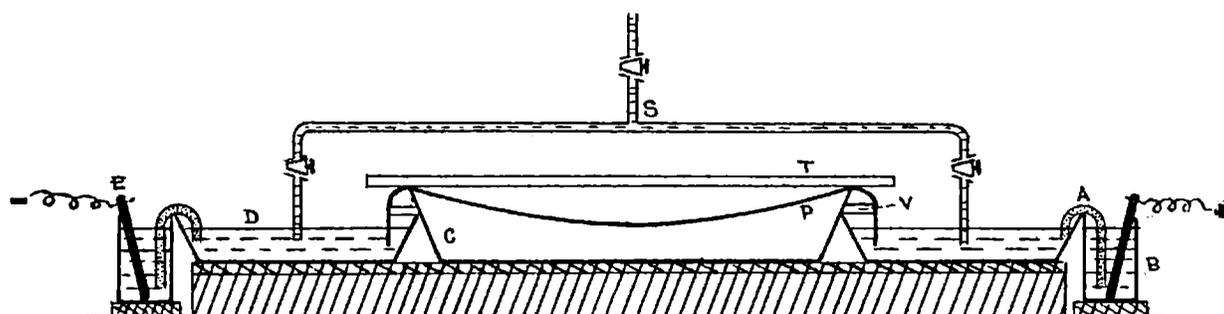


Figura 3.4. A:puente de agar-KCl ; B:vaso electrónico ; C:cámara ; D:vaso de electrolito ; E:electrodo ; P:hoja de papel ; S:sifón ; T:tapa ; V:placa angosta

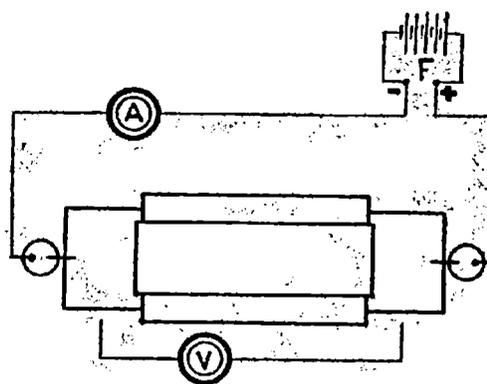


Figura 3,5

dad de regulador tal que su pH no varíe aún después de un tiempo de pasaje de corriente mucho mayor que el que va a durar la experiencia a realizar (39). En nuestros ensayos de carácter cualitativo usamos un volumen de electrolito de 300 ml. en cada vaso. Para los cuantitativos, en que una variación pequeña del pH no hubiera molestado, 250 ml. Los vasos electrólitos se cargan con la cantidad de electrolito necesaria para igualar el nivel de aquéllos. En corridas en las que ha de determinarse una distancia o velocidad de migración, es necesario evitar que haya en el papel flujo de electrolito debido a diferencias de nivel. En los aparatos contruidos con plásticos resulta sencillo perforar y conectar los vasos de electrolito mediante un tubo de goma, lo que permite igualar niveles en ambos. Una llave en el tubo de goma permite interrumpir la comunicación antes de hacer pasar la corriente. En nuestro caso y de acuerdo a lo sugerido por Papastamatis y Kensch (124) igualamos niveles mediante un sifón doble tal como el que muestra la figura 34. La tira u hoja de papel, de 32 cm. de longitud, se coloca sobre los bordes de la cubeta central, sujeta por la tapa, de manera que sus extremos posquen en el líquido contenido en los vasos de electrolito. Para evitar que el papel se adhiera a las paredes de éstos, se colocan apoyados sobre sus bordes laterales, sendas placas de vidrio delgado de 15 por 1 cm. Estas placas permiten también retirar cómodamente la hoja de la cámara una vez finalizada la experiencia. En el centro de la pared opuesta a los extremos de la tira de papel, va sumergida en los vasos de electrolito la rama más corta de un tubo en U invertido que

contiene una mezcla de agar (3 %) y cloruro de potasio - (1,5 M) que hace de puente conductor evitando al mismo tiempo que tengan lugar fenómenos de electrólisis en el líquido que baña el papel. La rama más larga de este tubo se sumerge a su vez en el electrolito que contiene el vaso electrodiódico correspondiente, en el que también pesca el electrodo respectivo, que consiste en una varilla de carbón extraída de pilas llamadas secas. Este conjunto simétrico - va conectado desde los electrodos a los polos positivos y negativo de la fuente eléctrica. Se intercala en el circuito, en serie y entre el cátodo y el polo negativo de la fuente un miliamperímetro apropiado. Las diferencias de potencial se estiman introduciendo en los vasos de electrolito los terminales, que conviene sean de carbón o platino, de un voltímetro o tester (fig. 3,5).

El aparato descrito es, en caracteres generales, muy parecido a los que han dado a conocer Grassmann y colab. (63) y McDonald y colaboradores (106).

3,23 Técnica.

3,231 Siembra. La técnica para depositar la solución portadora del soluto o mezcla de solutos a separar, - sobre el papel, puede considerarse dividida en dos fases - estrechamente relacionadas: la primera, el tratamiento previo del papel y la segunda, el depósito de una cantidad dada de solución en el papel, o siembra propiamente dicha. - Ambas son importantes para obtener manchas de formas regulares y reproducibles al poner luego de manifiesto los solutos mediante el revelado.

Comencemos por cortar la tira u hoja -

de papel de filtro dándole las dimensiones que mejor se adapten al aparato en uso y tipo de trabajo a realizar. Salvo circunstancias especiales, usamos fajas de papel de 32 cm. de longitud y entre 10 y 15 cm. de ancho, según los casos. Algunas veces se hizo necesario el uso de tiras angostas (1 cm. de ancho) de la misma longitud.

Tracemos luego con lápiz por el punto medio de la hoja, una línea transversal en la que marcamos puntos donde se aplicarán las microgotas de solución, separados más o menos 2 cm. de los bordes y entre sí. Estas distancias se adecúan por supuesto al tamaño de las manchas a obtener, para evitar superposiciones. Además tracemos también con lápiz dos líneas transversales a cada lado de la anterior y a 4 y 1 cm. de cada extremo de la hoja. Las situadas a 4 cm. de los extremos han de servir de guía para centrar la hoja en la cámara. Las que están a 1 cm. -- marcan el nivel al cual tiene que llegar el electrolito de los vasos.

Conviene también marcar uno de los extremos con un signo (+) ó (-), según el polo que le corresponde al ubicar luego la hoja en la cámara. Conviene porque en ciertos casos no es necesario revelar más que parcialmente la hoja y el signo sirve de referencia, evitando un consumo inútil de reactivo revelador.

La siembra puede hacerse sobre el papel seco y entonces se tiene la ventaja de poder depositar cantidades grandes de solución en una pequeña área, mediante aplicaciones y secados sucesivos de microgotas de aquélla. Esto tiene valor especialmente en trabajos de carácter -- cuantitativo, como veremos más adelante.

Una vez depositada y seca la cantidad deseada de solución, se coloca la hoja en un soporte adecuado y se riega con electrolito hasta una distancia dada (3 a 5 cm., más o menos) de la línea que contiene los puntos de aplicación. Luego, ubicando la hoja de papel de filtro en la cámara ya descrita de modo que sus extremos pesquen en el electrolito de los vasos, se deja hasta que, ascendiendo por capilaridad, las dos capas de líquido se reúnan, lo que debe tratarse que suceda a lo largo de la línea media mencionada. No queda entonces más que dar paso a la corriente eléctrica.

Los ensayos que hemos realizado con esta técnica no nos han demostrado la necesidad de un lavado previo de la hoja con agua destilada.

Para sembrar sobre papel húmedo, éste se marca previamente con lápiz tal como se indicó antes. De inmediato se sumerge en una solución del electrolito a usar y se seca parcialmente entre dos hojas gruesas de papel de filtro común, durante un momento, de manera que quede húmedo pero no gotee. En seguida se siembra en los puntos marcados, se lleva el papel a la cámara y sumergiendo sus extremos en el contenido de los vasos de electrolito, se deja unos 15 minutos para que la humectación se haga homogénea.

Luego se deja pasar la corriente. Esta técnica que Eiselius usa, salvo variantes leves, para la siembra de proteínas sobre papel (99) al ser ensayada con aminoácidos dió excelentes resultados y es la que hemos adoptado para la mayoría de nuestras experiencias.

Para lograr un medio de migración más homogéneo, McDonald (104) siembra recién después de hacer pasar corriente durante una media hora, sin desglosar el -

sistema, a través de pequeños agujeros que posee la tapa de la cámara.

Mencionemos ahora que es importante para la obtención en el revelado, de manchas reproducibles y de forma regular, sembrar pequeños volúmenes de solución (en nuestras experiencias éstos oscilaron entre aproximadamente 1 y 10 microlitos) y que además impregnen un área de papel lo menor posible, si se siembra sobre papel de filtro seco. Los inconvenientes de depositar volúmenes relativamente grandes en áreas también grandes parecen reducirse al sembrar sobre papel húmedo.

En el momento de la siembra el papel puede estar, bien suspendido horizontalmente en el aire -- por cualquier artificio adecuado, bien apoyado en toda su superficie sobre una placa de vidrio. Trabajando con hoja húmeda, hemos obtenido diferencias notables en el área de la mancha resultante utilizando ambas técnicas mencionadas (tabla 3,1). Las manchas eran mayores cuando la hoja se colocaba sobre la placa de vidrio.

TABLA 3.1

Área de la mancha según la siembra: A) en una hoja apoyada en una placa de vidrio; B) en una hoja sostenida solamente por sus extremos. (*)

SIEMBRA: 1 microlitro						SIEMBRA: 2 microlitros							
Exp. No	Dur. min.	*	Área (unid. arbit.)				Exp. No	Dur. min.	*	Área (unid. arbit.)			
			GluM 0,05	GluM 0,075	GluM 0,10	GluM 0,15				GluM 0,05	GluM 0,075	GluM 0,10	GluM 0,15
106	120	A	13,5	21,6	23,3	27,7	112	130	A	16,3	22,5	25,1	32,0
103, 111							114						
115	120	B	11,3	12,5	16,7	18,1	116	130	B	8,1	12,4	15,6	17,7

Electrolito: ácido acético-acetato de sodio de pH 4,55 y fuerza iónica 0,05; potencial, aproximadamente 445 voltios.

Para poder trabajar con mayores volúmenes de solución, hemos adoptado en nuestro trabajo la técnica de siembra en el aire, lo que se realiza fácilmente ajustando la hoja de papel a los bordes de la cubeta que hace de cámara electroforética mediante broches de madera o plástico.

La solución se deposita en el papel mediante una pipeta capilar o ultramicrobureta. No hemos tenido oportunidad de trabajar con alguna de este último tipo. En su reemplazo, resultan útiles las pipetas capilares del tipo mencionado por Macheboeuf y Blass (93) que consisten en un tubo capilar de vidrio Pyrex estirado y pulido en uno de sus extremos. Una pipeta así construida se calibra pesando la cantidad de agua contenida que tenga un volumen igual al doseado y marcando el punto en que se encuentra el menisco ya recubriendo la pipeta con una fina capa de parafina, haciendo un trazo en ella y luego atacando el vidrio con vapores de ácido fluorhídrico, ya anudando un cabello fino alrededor de la misma y fijándolo en un punto con una gota de parafina. Una pipeta así se carga por capilaridad introduciéndola simplemente en el líquido a tomar y se descarga por simple toque del papel. Existen tipos más elaborados de micropipetas (64, 161, 183) pero, aún para fines cuantitativos, se pueden usar las pipetas más simples si no es imprescindible más que comparar los volúmenes depositados.

En la siembra sobre hoja seca debe dejarse secar la microgota depositada antes de sembrar nuevamente o mojar el papel con el electrolito. El secado pue-

de acelerarse con un ventilador o bien acercando el papel húmedo a una lámpara de rayos infrarrojos o una lamparilla eléctrica común.

No existen estos problemas si se usa la técnica húmeda. En la parte cuantitativa de nuestro -- trabajo comprobamos, mediante una serie de experiencias, -- que el área de la mancha final no depende, dentro de ciertos límites, del volumen de solución sembrada en la hoja -- húmeda.

La concentración adecuada de la solución que se siembra depende de la solubilidad del soluto y de la sensibilidad del reactivo revelador. Dentro de -- los límites fijados por esas características, el uso de -- soluciones más o menos concentradas depende del fin perseguido: para determinaciones de tipo cualitativo, hemos utilizado soluciones de aminoácidos 0,05 molares, bien detectables por la ninhidrina al 0,05 g./100 ml. si se siembra no menos de medio microlitro. En cambio se usaron concentraciones mayores --hasta 3 microlitros de solución 0,15M-- cuando se trató de valorar aminoácidos.

3,232 Revelado. El revelado consiste en poner de -- manifiesto el o los solutos separados mediante un reactivo que por lo común da un producto coloreado con aquéllos.

Ante la posibilidad de realizar corridas testigo en las mismas condiciones que un desconocido dado, desaparece la necesidad de especificidad de un reactivo total. Así, el reactivo casiuniversalmente utilizado en este tipo de técnica para poner de manifiesto aminoácidos -- (salvo prolina), es la ninhidrina, que da con ellos colores

muy parecidos. Conviene que el solvente de este reactivo no disuelva o casi no disuelva los aminoácidos a revelar, puesto que se evita así difusión de las manchas en el papel (92a).

Antes de seguir, nos parece interesante hacer notar que desde el momento en que se tiene la hoja de papel de filtro seca y lista para revelar, no hay diferencia notable entre ésta, producto de una separación electroforética y un cromatograma común. Es por ello que obviemos la descripción de las numerosas técnicas de revelado y tipos de reactivo, temas desarrollados extensamente en la literatura sobre cromatografía (9, 19, 23, 37, 93, - 164).

Diremos también que es esa amplia similitud entre un electrograma y un cromatograma lo que nos ha inducido y permitido aplicar uno de los métodos de valoración creados para la cromatografía a la electroforesis en papel.

Para el revelado de aminoácidos utilizamos, para trabajos cualitativos, una solución de ninhidrina al 0,05 g./100 ml. en acetona, suficiente para poner negativamente de manifiesto concentraciones de aminoácidos tales como las mencionadas más arriba. Para las experiencias cuantitativas usamos soluciones ya en alcohol etílico de 95 %, ya en acetona, pero al 0,1 g./100 ml. No hemos encontrado gran ventaja en aumentar la concentración del reactivo por sobre ese valor. En cuanto a sus solventes, llenan la condición requerida de no disolver casi los aminoácidos; en efecto, la solubilidad del ácido glutámico, por

ejemplo, es, a 25°C., de 0,0000025 g./1000g. en acetona - (129) y 0,0000125 N/l en etanol (30a).

La ninhidrina en solución tiene una duración limitada. Conservadas en la oscuridad, sus soluciones acetónicas dan la reacción con aminoácidos hasta más o menos un mes después de preparadas.

Aplicamos el reactivo rozándolo con un pulverizador común en la fase cualitativa de nuestro trabajo; en cambio, lo hicimos por inmersión de la hoja en la - cuantitativa (153). Se lograba de este modo una mayor uniformidad y homogeneidad de mojado, importante para la comparación de las manchas obtenidas, de testigos y desconocidos.

El color aparece dejando simplemente - la hoja a temperatura ambiente, después de unos minutos. - Su máxima intensidad se produce en cambio al cabo de algunas horas. Que estos espacios de tiempo sean mayores o menores depende de la cantidad de soluto depositado en el papel y de la temperatura ambiente a igualdad de otros factores como solvente del reactivo, etc. Mayor rapidez de aparición y colores más intensos se consiguen con concentraciones y temperaturas más altas. Así es como un método - rápido para obtener el producto coloreado de la reacción - es colocar al electro cromatograma en una estufa a 90°C: - entonces aquél llega a su intensidad máxima a los 5 minutos aproximadamente. Sin embargo, se ha comprobado que por - la elevación de temperatura hay alguna destrucción del aminoácido. Estudiaremos este punto con más detalle en la parte cuantitativa.

Para nuestro trabajo, hemos utilizado

con éxito, según se ha dicho, soluciones acetónicas de ninhidrina, cuyo producto de reacción con los aminoácidos poníamos de manifiesto así: en las experiencias de carácter cualitativo, por calentamiento hasta lograr el color más intenso en estufa de 90°C aproximadamente; en las de carácter cuantitativo, se dejaba la hoja a temperatura ambiente y se tomaba como lapso convencional de máxima intensidad de coloración el de 13 horas.

Una vez conseguida la mancha más intensa y de bordes netos, se procedía al delineado. Este consiste en marcar con una línea de lápiz el borde de la mancha. Es un punto delicado en el método planimétrico de determinación que hemos ensayado y que desarrollamos en §4, 13.

Solo diremos aquí que el delineado debe ser inmediato, sobre todo para fines cuantitativos, puesto que la mancha obtenida no dura mucho: ya a los dos o tres días pierde intensidad de color y generalmente desaparece casi por completo a la semana. Se han hecho intentos para conservar la mancha coloreada (§, 79) con éxito variable.

3.24 Soluciones y reactivos. Soluciones de aminoácidos: preparamos las mezclas de aminoácidos pesando la cantidad necesaria, llevando a un tubo de ensayo y agregando la cantidad de agua conveniente, generalmente 5 ml. Si era necesario se entibiaba el tubo cerrado para completar la disolución. Mezclas con ácido aspártico, sobre todo si eran concentradas, requerían el agregado de ácido glicohídrico para lograr su disolución completa; generalmente bastaba con una o dos gotas de ácido clorhídrico concentrado en 5 ml. de agua para disolver ese aminoácido y formar soluciones

0,15 molares. La presencia del ácido inorgánico no parece ser causa de perturbaciones; eso se explica teniendo en cuenta su mínima concentración en el medio regulador en que se efectúa la separación.

Electrolito (solución reguladora): se han usado, por lo común con buenos resultados, diferentes tipos de soluciones reguladoras como electrolitos de corridas electroforéticas con papel de aminocelulosa. Entre ellos, los de ftalato ácido de potasio con ácido clorhídrico o cloruro de sodio, ácido acético-acetato de sodio, fosfato monopotásico-hidróxido de sodio, cloruro de potasio-hidróxido de sodio, etc. (47, 48, 50, 101, 107, 174). También han servido para el mismo fin soluciones que carecen de la propiedad de regular el pH: así, el ácido acético, hidróxido de amonio, borato de sodio, etc. Sin embargo, de acuerdo con nuestra experiencia, es preferible el uso de soluciones que tengan aquella propiedad para obtener resultados reproducibles y una mejor fijación de las variables.

De acuerdo con las consideraciones que siguen en §3.31 y la conveniencia de usar sustancias de fácil adquisición, hemos elegido para electrolito de nuestras separaciones electroforéticas la mezcla ácido acético-acetato de sodio que según Walpole (165) da valores de pH comprendidos entre 3,6 y 5,6, rango en el que precisamente necesitamos trabajar. Por otra parte, ensayos previos con ese regulador demostraban que podían obtenerse con él resultados satisfactorios en lo que se refiere a su reproducibilidad y a la nitidez de las manchas correspondientes a los solutos separados.

En general, para las distintas series

de experiencias concernientes a problemas diferentes, preparábamos cuatro litros de electrolito por vez. Esa cantidad era suficiente para efectuar cinco corridas, si tenemos en cuenta que cada una de ellas insufla aproximadamente 750 ml. de aquél (300 ml. en cada vaso de electrolito y 75 ml. en cada vaso eléctrico) y que no se puede usar dos veces la misma porción de solución reguladora. En efecto, hemos ensayado electroforesis con electrolito ya usado, obteniendo manchas completamente difusas, así como algunas de origen indeterminado.

Para lograr los diferentes valores de pH y fuerza iónica requeridos, mezclábamos en proporciones también diferentes, soluciones madres de ácido acético normal y acetato de sodio 0,5 normal.

La tabla confeccionada por Walpole nos da un medio de calcular esas proporciones.

En cuanto a las cantidades de esas soluciones necesarias para obtener valores de fuerza iónica variables, fué necesario calcularlas de la ecuación que, según veremos más adelante con más detalle (§ 3,32), la define:

na:
$$\mu = \frac{1}{2} \sum z_i^2 \cdot C_i.$$
 En ella, Z_i es la valencia de cada

ión y C_i la molaridad. Para calcular la fuerza iónica de nuestra mezcla de ácido acético-acetato de sodio habrá que considerar: Z_1 = valencia del ión acetato del ácido acético; C_1 = molaridad del mismo ión; Z_2 = valencia del ión hidrógeno del ácido acético; C_2 = molaridad del mismo ión; Z_3 = valencia del ión acetato del acetato de sodio; C_3 = molaridad del mismo ión; Z_4 = valencia del ión sodio del acq

tate de sodio; C_4 = molalidad del mismo ión.

Como $Z_1 = Z_2 = Z_3 = Z_4 = 1$; $\mu = \frac{1}{2} (C_1 + C_2 + C_3 + C_4)$

Pero $C_1 = C_2 = C_{\text{ACOH}}$ y $C_3 = C_4 = C_{\text{ACONa}}$

Entonces: $\mu = C_{\text{ACOH}} + C_{\text{ACONa}}$

Es decir, en nuestro caso, la fuerza iónica de la mezcla de ácido acético y acetato de sodio será igual a la suma de las molalidades de ambas sustancias.

3,3 Estudio de las variables.

Como ya dijimos, la finalidad de nuestro trabajo es llegar a obtener un método de estimación de un aminoácido (con la esperanza de poder entenderlo a los demás) que se valga de la electroforesis en papel como técnica de separación.

Debido al desarrollo tan reciente de esta técnica, el estudio del problema de una separación efectiva en las condiciones más sencillas y en el menor tiempo posible, se enfrenta a una literatura escasa y fragmentaria.

Ese mínimo acervo bibliográfico en todo no al tema suministra pocos datos teóricos y experimentales de que valerse si se tratan de prever las condiciones óptimas de un fraccionamiento del tipo buscado.

Todo eso muestra la necesidad de efectuar un análisis, aunque sea parcial, de algunos de los factores que gobiernan el fenómeno electroforético. Como ellos son muchos y de difícil cambio no imposible fiscalización hemos intensificado el estudio de aquéllos cuya acción es diferente según el soluto sobre el que actúan. Los iremos tratando en el siguiente orden: pH y fuerza iónica de la solución reguladora; duración de la corrida; diferencia de potencial aplicada; concentración del soluto sembrado; papel de filtro usado; temperatura; flujos de reposición de electrolito evaporado y electroendosmótico; adsorción.

Los datos experimentales que se consiguen a continuación se refieren al efecto de esas variables sobre una mezcla equimolecular de ácidos glutámico y as-

pártico, a veces con leucina. Basta con analizar el comportamiento de aquellos dos aminoácidos porque, en las condiciones bastante restringidas en que efectuamos nuestro análisis, el resto se comporta de manera uniforme, y porque solamente interesa conseguir una buena separación, del ácido glutámico, tanto del ácido aspártico por un lado como de los demás aminoácidos por otro.

3,31 pH del electrolito. El pH del regulador es sin duda una variable de importancia en lo que se refiere al problema particular de la separación.

Sabemos que una molécula de un anfólitico tal como un aminoácido, ubicada en un campo eléctrico, se comportará de una manera que dependerá, entre otras cosas, del pH del medio en que se encuentre. Así, habrá un valor del pH tal que la molécula no se moverá por estar neutralizadas sus cargas entre sí: ese será su punto isoeléctrico (tabla 3,2)

TABLA 3,2

pH del punto isoeléctrico de aminoácidos y algunas de sus sales a 25°C. (*)

A. Sustancias con un grupo amino y uno carboxilo.

Glicina.....	5,97	6,1	Honilalanina...	5,43	5,9
Alanina.....	6,00	6,1	Triptofano.....	5,89	5,9
Valina.....	5,96	6,0	Hotionina.....	5,74	5,8
Iscucina.....	5,93	6,0	Taurina.....	5,12	
Isoleucina.....	6,02	6,0	β-alanina.....	6,90	
Hexileucina.....	6,03	6,1	Glutamina.....	5,65	
Serina.....	5,63	5,7	Asparagina.....	5,41	
Prolina.....	6,30	6,4			

B. Aminoácidos con un grupo amino, uno carboxilo y uno o más grupos fenólicos o sulfhidrilos.

1 - tirosina.....	5,66		5,7		Cisteína.(a 30°C)	5,07		5,1
Diyodo - 1 - tirosina	4,29		4,3					

C. Aminoácidos con dos o más grupos carboxílicos y uno básico.

Acido aspártico....	2,77		3,0		Acido β -hidroxi-			
Acido glutámico....	3,22		3,2		glutámico.....	3,29		3,3

D. Sustancias con un grupo carboxilo y más de un grupo básico.

Histidina...	7,59		7,6		Ornitina...	9,70		
Arginina....	10,76		10,8		Lisina.....	9,74		9,7

E. Aminoácidos con dos grupos carboxílicos y dos amino.

Cistina (a 30°C)....	4,60		5,6		(*) 1a. columna según			
					Cohn y Edsall (30)			
					2a. columna según			
					Schmidt (146b).			

A valores de pH menores que el de su punto isoelectrico, será neutralizada su carga negativa y la polaridad positiva de su molécula se pondrá de manifiesto por su migración hacia el cátodo. Sucede a la inversa - cuando el medio tiene un pH mayor que el del punto isoelectrico: la partícula, transformada en anión, migra hacia el polo positivo.

En nuestro caso, estamos frente a un triple juego análogo que comprende: ácido aspártico: p. isoelectrico = 2.77; ácido glutámico, p.i. = 3.22 y el resto de los aminoácidos tomados en conjunto, de los que el punto isoelectrico más cercano es la cistina (p.i.=4,60) (no tomamos en cuenta el ácido hidroxiglutámico, p.i.= 3.29)

la diiodotirosina, p.i. = 4.29, difíciles de encontrar en hidrolizados comunes).

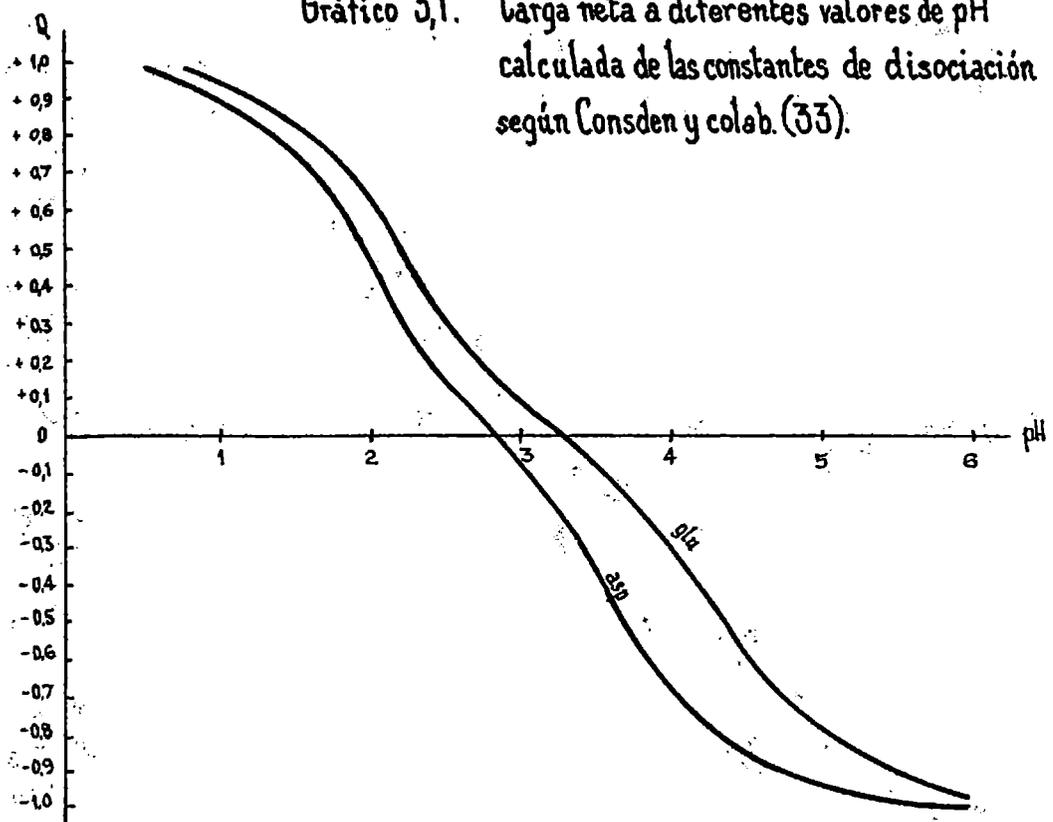
Uno de los pocos trabajos que pueden proveernos de datos útiles es el realizado por Consden y colaboradores en 1943 (33). Ante el problema, muy análogo al nuestro, de separar aspártico y glutámico, mediante una resina sintética de recambio aniónico, entra sí y de los demás aminoácidos, esos autores estudian, en función de datos anteriores, la variación de la carga neta de los ácidos glutámico, aspártico y cisteico en función del pH.

Según Abramson (21) la movilidad electroforética es una característica de cada partícula cargada bajo condiciones análogas de temperatura, concentración salina, etc. Su relación con la carga neta Q del migrante puede simbolizarse así: $v = k' \cdot Q$, donde k' es una constante de proporcionalidad que para el caso de una partícula aislada, por ejemplo, vale D/kT , donde D es la constante de Boltzmann y T , la temperatura absoluta.

Las curvas representativas de la variación de la carga neta con el pH nos darán pues una idea de la influencia de ese factor sobre la movilidad relativa de los aminoácidos que nos interesan.

De acuerdo con la figura 1 de la publicación mencionada (gráfico 3,1) glutámico y aspártico no habrán de separarse bien en un corto tiempo de electroforesis a valores de pH menores que 2,77, por ser sus cargas netas y por ende sus velocidades muy cercanas. El mismo inconveniente se presentaría si tratáramos de fijar el glutámico trabajando en su punto isoelectrico.

Gráfico 3,1. Carga neta a diferentes valores de pH calculada de las constantes de disociación según Consden y colab. (33).



La zona de pH que parece más adecuada es la comprendida entre 3,50 y 5,00, en la que aspártico y glutámico migrarán como aniones pero con velocidad bastante diferente, y el resto de los aminoácidos lo hará como - catión.

Las experiencias que nos habrían de mostrar el comportamiento de tales sustancias en la zona de pH indicada por literatura como la más adecuada para una buena separación se realizaron de la manera siguiente:

Se ensayaron electrolitos con los valores de pH que siguen: 3,50; 3,85; 4,25; 4,55; 4,60; 4,90; 5,30. A fin de eliminar posibles errores, se usaba la misma solución reguladora para cada grupo de cinco experiencias paralelas. Para ello preparábamos cuatro litros, dado que cada experiencia insuñía aproximadamente 750 ml., de una mezcla de ácido acético-acetato de sodio, según Walpole de fuerza iónica 0,025, en la forma indicada en § 3,24. Esa solución se conserva bien en la heladera. Para estimar su pH utilizábamos un potenciómetro Electro-glass de electrodo de vidrio, y como solución patrón una de ftalato ácido de potasio 0,1 N e hidróxido de sodio 0,1 N de pH 4,5 preparada según Kolthoff y Rosenblum (25).

Determinábamos el pH del electrolito antes de la corrida y, después de ella, del contenido en los vasos de electrolito y en los vasos electródicos. Los datos recogidos a diferentes valores de pH y fuerza iónica del electrolito al cabo de tiempos variables de corrida muestran que, con los dispositivos técnicos arbitrados (puentes de agar-cloruro de potasio, volumen de regulador

relativamente grande) el pH cambia muy poco durante la electroforesis en los vasos de electrolito. Por lo menos - no lo suficiente como para ocasionar perturbaciones en corridas cortas. En cambio sí alcanza valores notables la variación del pH en los vasos electródicos.

Las demás variables se fijaron arbitrariamente en los siguientes valores: diferencia de potencial se mantendrá mediante fiscalización desde la fuente, constante dentro de ciertos límites; sus valores se estimaban cada 15 minutos durante la corrida tomándose luego la media aritmética como valor promedio. En la serie de experiencias que nos ocupa aplicábamos una diferencia de potencial que oscilaba alrededor de los 450 voltios.

El tiempo de corrida era uniforme e igual a 180 minutos.

La mezcla a separar consistía en una solución equimolecular (0,05M) de ácidos glutámico y aspártico preparada según se indicó, es decir, que teníamos en solución los clorhidratos de ambos aminoácidos.

El papel de filtro era Whatman nº 1, - cortado en hojas de 32 cm. de longitud por 10 cm. de ancho, de pliegos grandes de 57 por 46 cm. No recibía preparación previa de ninguna clase. Se sembraba por la técnica húmeda un microlitro de solución en cada uno de cuatro puntos marcados en la hoja. La longitud del puente de papel comprendido entre los niveles de electrolito en los vasos, necesaria para calcular, como veremos más adelante, el gradiente de potencial, se determinaba mediante el artificio de hacer un pequeño tajo con una tijera marcando el nivel a que a-

que llegaba y midiendo la hoja seca después de finalizada la corrida.

La distancia recorrida por el aminoácido se medía con una regla común desde el punto de aplicación hasta el "centro de gravedad" de la mancha (centro promedio de área e intensidad de color (31)). Algunos autores (107) que trabajan con tiras angostas de papel, obteniendo no manchas circulares sino barras, miden esa distancia desde el frente de la mancha. La tabla puede servir para comparar ambos métodos de medida. Por supuesto, los datos obtenidos midiendo la distancia desde el punto de aplicación hasta el frente de la mancha, son mayores. Sin embargo existe un paralelismo entre ambas series de datos, por lo que el objeto buscado, que es, por las razones que damos más abajo, solamente obtener datos comparables y no de valor absoluto, se logra ampliamente con cualquiera de los dos métodos. En adelante, usaremos solamente el primero de ellos.

En la mayoría de los casos, las medidas representan el promedio de las distancias recorridas por tres manchas de cada aminoácido que migraron simultáneamente y en la misma hoja de papel. Los resultados así obtenidos se promedian a su vez con los de otras cuatro corridas paralelas en diferentes hojas, y con el dato final se calculan los valores de movilidad de aspártico y glutámico a diferentes niveles de pH.

La movilidad de un ion o partícula cargada en un campo eléctrico se define como la velocidad absoluta de ese ion bajo una caída de potencial de un voltio

por centímetro (63). Es decir, $\mu = \frac{d}{s \cdot v/l}$, donde d es la distancia recorrida por el migrante (cm) en un tiempo s (segundos) y bajo una diferencia de potencial v (voltios) aplicada a través de un puente l (cm) de migración.

Los valores de movilidad obtenidos no pueden considerarse equivalentes a los obtenidos por otros medios (cálculo sobre datos de transferencia, cálculo sobre datos de conductividad) puesto que en la electroforesis en papel, y tal como lo han puesto de manifiesto varios autores (47, 48, 90, 102), el desplazamiento es la suma algebraica de tres velocidades de carácter diferente: una, la "verdadera" velocidad electroforética, que hemos mencionado y cuyos valores son análogos a los que proveen otros medios de estimación. El signo de esta velocidad depende de la relación entre el pH del punto isoelectrico del migrante y el pH del electrolito.

La segunda de las velocidades mencionadas es la velocidad del flujo electroosmótico: así como en un tubo capilar lleno de líquido a través del cual se aplica un potencial en dirección paralela a la luz del tubo se observa un movimiento del fluido a través del capilar, también en un papel embebido en un líquido se produce un movimiento de fluido al aplicar una diferencia de potencial entre sus extremos (48, 49, 89). La explicación es análoga en ambos casos: el sólido adquiere una carga negativa en relación al líquido, que actúa como si tuviera una carga positiva. Como el sólido no puede desplazarse, lo hará solamente el líquido y hacia el polo negativo del sistema. Habrá entonces, cualesquiera sean las condiciones de la ex

perencia electroforética en papel, un flujo de electrolito que tendrá siempre el mismo sentido: del polo positivo al negativo. Este flujo actuará con la misma intensidad sobre todos los iones, aunque acelerando a algunos (cationes) y retardando a otros (aniones).

Finalmente, la tercera componente de la movilidad "real" en electroforesis en papel es el flujo de líquido proveniente de la reposición de electrolito evaporado en el papel. En efecto, al colocar el papel empapado en electrolito dentro de la cámara, éste se evapora hasta saturar la atmósfera circundante. Al pasar la corriente eléctrica aumenta gradualmente la temperatura sobre la hoja lo que ocasiona una nueva y ahora continua destilación de electrolito, que se ve condensar en las paredes de la cámara. Ese electrolito evaporado es repuesto por sifonación del electrolito de los vasos. La consecuencia de ello es la existencia de un flujo de líquido de los extremos al centro del papel. La serie de experiencias que citamos en -- §3,37 dan una prueba de su existencia.

Ahora bien, dados los fines de nuestra búsqueda, que no son más que fijar las condiciones mejores de una separación de glutámico y aspártico, no hemos estimado en el curso de nuestras experiencias más que un valor aproximado de la movilidad, midiendo simplemente distancia recorrida, longitud del puente, tiempo y voltaje aplicado y calculando con esos datos, sin tener en cuenta correcciones debidas a los otros factores mencionados.

Sin embargo, esas correcciones parecen ser muy pequeñas en corridas tan cortas como las que prac-

ticanos, sobre todo si se tienen en cuenta coincidencias como la que se ve a continuación entre datos de electroforesis en papel y los provenientes de otras fuentes.

Los resultados de los ensayos que se han venido describiendo pueden verse en la tabla 3,3.

TABLA 3,3

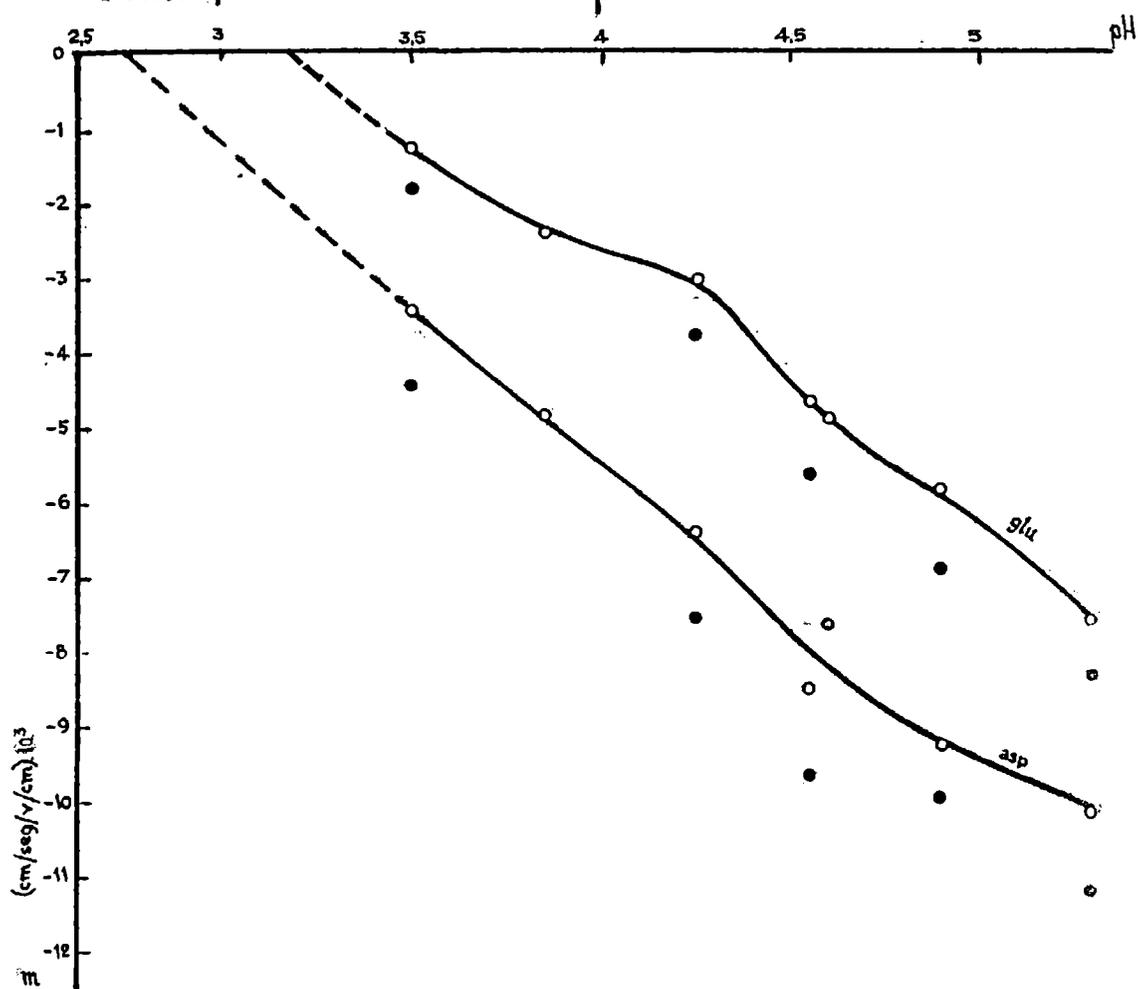
Movilidad de los ácidos glutámico y aspártico en función del pH.

Exp. No	pH	Movilidad según centro. (cm/s/v/cm. 10 ³)		Movilidad según frente. (cm/s/v/cm. 10 ³)	
		Glu	Asp.	Glu	Asp.
1/5	3,50	- 1,28	- 3,43	- 1,82	- 4,43
6/9	3,85	- 2,40	- 4,36		
10/15	4,25	- 3,04	- 6,39	- 3,79	- 7,54
16/20	4,55	- 4,67	- 8,49	- 5,65	- 9,62
21/24	4,60	- 4,89	- 7,63		
25/29	4,90	- 5,35	- 9,14	- 6,90	- 9,94
30/32	5,30	- 7,57	-10,14	- 8,36	-11,20

Electrolito ácido acético-acetato de sodio de fuerza iónica 0,025; gradiente de potencial, 15,3 v/cm.; duración, -- 120 minutos; papel Whatman nº 1; concentración, 0,05 M.; -- siembra 1 microlitro.

Las curvas de movilidad de glutámico y aspártico en función del pH del electrolito obtenidas (gráf. 3,2) muestran que hay entre ambas variables y en la zona -- de pH estudiada (pH 3,50 a 5,30) una relación muy semejante a la que existe entre pH y carga neta, según el gráfico 3,1.

Gráfico 3,2. Movilidad en función del pH



○ = según "centro de gravedad" de la mancha.
 ● = " " " frente " " "

La semejanza es tan estrecha que extrapolando las curvas - (línea punteada) se obtienen valores de punto isoelectrico coincidentes. Esos puntos coinciden no solo con los de las curvas del gráfico 3,1, sino también, dentro de ciertos límites, con los provistos por otras fuentes, según puede verse comparándolos con los de la tabla 3,2.

La relación pH-movilidad correspondiente al ácido glutámico hallada por McDonald y colaboradores -- (107) presenta características algo diferentes en su representación gráfica.

Si en el gráfico 3,2 estimamos en valores de movilidad, esto es, sobre el eje de las ordenadas, las diferencias entre las curvas de glutámico y aspártico a diferentes valores de pH, tendremos una idea de la separación que hay entre ambas manchas en el papel o sea de la distancia que las separa, a diferentes valores de pH. Análogamente, las diferencias medidas del mismo modo entre la curva correspondiente al glutámico y el eje de las abscisas proporcionarán una noción de la distancia que separa a la mancha de dicho aminoácido de la correspondiente a los que, por su carácter neutro, migran lentamente y en conjunto hacia el cátodo.

TABLA 3.31

Distancia estimada en valores de movilidad a diferentes valores de pH, entre las curvas de los ácidos glutámico y aspártico y el eje de las abscisas del gráfico 3,2 y entre - ambas curvas del mismo gráfico.

pH	Glu	Asp	Difer. glu-asp.
3,50	1,3	3,4	2,1
3,75	2,0	4,4	2,4
4,00	2,7	5,5	2,8
4,25	3,1	6,4	3,3
4,50	4,4	7,7	3,3
4,75	5,5	8,7	3,2
5,00	6,3	9,4	3,1
5,25	7,6	10,1	2,5

El estudio de las dos series de datos (tabla 3,31) nos indica que ya a pH 4,25 la distancia entre el ácido glutámico y los aminoácidos neutros y entre el mismo y el aspártico es suficiente para obtener manchas bien separadas en un corto tiempo. A valores más altos de pH sigue creciendo la diferencia entre glutámico y los neutros, mientras se mantiene y luego decrece lentamente la que se obtiene entre glutámico y aspártico. Si pensamos que al fraccionar un hidrolizado, la mancha a obtener correspondiente a los aminoácidos neutros será relativamente grande puesto que la constituirá la suma de las manchas individuales, parece necesario lograr una distancia mayor entre aquellos y el ácido glutámico. De manera que, dejando un margen de seguridad, el pH de elección ha de estar en las cercanías de 4,50. Si bien en este valor la separación entre los aminoácidos dicarboxílicos es la misma que a pH 4,25, la distancia que separa al ácido glutámico del resto de los aminoácidos es más grande y permite separación

nes más rápidas.

Un pH más alto sería demasiado cercano al del punto isoelectrico de la cistina con peligro de sobrepasarlo y tener a este aminoácido migrando hacia el ánodo como los otros dos.

Una vez fijada esta variable, seguiremos estudiando las demás, teniendo en cuenta que, en adelante y salvo indicación en contrario, el pH de la solución reguladora ha de ser de 4,55 en todos los casos.

3,32 Fuerza iónica del electrolito. El concepto de fuerza iónica fué introducido por Lewis y Randall en 1921 y da una medida de la intensidad del campo eléctrico debido a los iones en solución. Se lo representa con el símbolo " μ " y se define como la semisuma de los términos obtenidos multiplicando la molalidad (o concentración) de cada una de las especies iónicas presentes en la solución por el cuadrado de su valencia: $\mu = \frac{1}{2} \sum C_i Z_i^2$; donde C_i es la concentración "efectiva" (o molalidad) de cada ion y Z_i su valencia (63).

En electroforesis, un aumento de la fuerza iónica del electrolito hace que la movilidad de un migrante dado disminuya, a igualdad de las demás condiciones. También depende la movilidad de la naturaleza y valencia de los iones presentes. Según Davis y Cohn (43), esta sensibilidad a la naturaleza y fuerza de la atmósfera iónica parecería ser casi tan importante como el pH en la determinación de las condiciones óptimas para una separación electroforética. Los autores se refieren a la movilidad de proteínas en electroforesis según Tiselius, pero consideramos

que el concepto puede extenderse a los aminoácidos de acuerdo a los hechos experimentales que citamos a continuación.

"El estudio de la influencia de la fuerza iónica del electrolito sobre el comportamiento de los solutos que nos interesan, resulta de particular importancia si se toma en cuenta que no solo provee de datos sobre la movilidad relativa de aquellos sino que también permite controlar el área de la mancha de aminoácido a obtener.

Trabajando en condiciones esencialmente análogas a las de la serie de experiencias que analiza el papel del pH, se hicieron ensayos con soluciones reguladoras de ácido acético-acetato de sodio de fuerza iónica creciente entre los valores de 0,005 y 0,050. El pH era constante e igual a 4,55; el tiempo de 120 minutos; gradiente de potencial promedio 15,4 v/cm.; se depositó 1 microlitro de solución equimolecular de glutámico y aspártico 0,06 M en cada punto de una hoja de papel de filtro Whatman nº 1.

Los resultados obtenidos se ven en la tabla 3,4 y se representan gráficamente en el gráfico 3,3.

TABLA 3,4

Movilidad de los ácidos glutámico y aspártico en función de la fuerza iónica.

Exp.nº	μ	Movilidad (cm./s/v/cm. 10 ³)		
		Glu	Asp	
33	0,005	- 2,40	- 4,60	(*) Estas experiencias se realizaron en tiras de papel de 32x 2 cm.
34/33	0,015	- 3,57	- 7,14	
16/20	0,025	- 4,67	- 8,49	
30/33	0,035	- 4,32	- 7,96	
44/47*	0,045	- 4,23	- 7,21	
48/57	0,050	- 4,10	- 7,07	

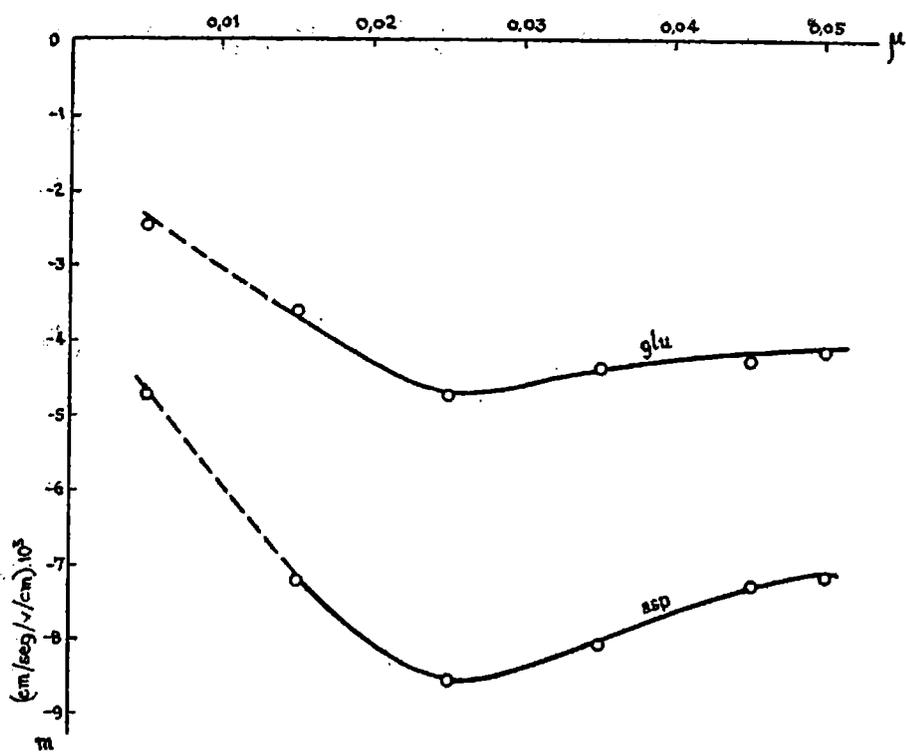
Condiciones: en el texto. -Electrolito: ácido acético-acetato de sodio; pH = 4,55.

Los datos correspondientes a la fuerza iónica 0,005 son dudosos, puesto que a tan baja concentración del electrolito las manchas que se logran son muy difusas y ocupan una gran superficie, lo que hace difícil situar su "centro de gravedad". Por otra parte, existe también un límite máximo de fuerza iónica del electrolito por encima del cual la intensidad de la corriente que pasa por el papel oxagora la destilación y hasta llega a hacer que el papel se quemara, como sucedía cuando efectuábamos electroforesis en tiras angostas de papel en un regulador de -ftalato ácido de potasio-hidróxido de sodio demasiado concentrado.

Las curvas del gráfico 3,3 muestran un comportamiento de los ácidos glutámico y aspártico que coincide con la teoría solamente para valores de la fuerza iónica del electrolito de ácido acético-acetato de sodio mayores de 0,025. Por debajo de ese valor la movilidad de esos aminoácidos decrece al disminuir la fuerza iónica. No encontramos referencia a ese comportamiento en la bibliografía a nuestro alcance; eso se explica por la novedad de la técnica que nos ocupa y la escasísima aplicación al comportamiento de los aminoácidos que se ha hecho de otros métodos electroforéticos.

No nos parece adecuado explicar los hechos registrados como debidos a un aumento de la fuerza iónica en algunas zonas del papel por evaporación del elec-

Gráfico 3.3. Movilidad en función de la fuerza iónica



trolito: porque las diferencias con la teoría se producen en los electrolitos más diluidos con los que la intensidad de corriente eléctrica se mantiene dentro de valores relativamente bajos. Luego la temperatura ascenderá menos y la evaporación alcanzará niveles menores que en experiencias con regulador de mayor fuerza iónica.

Otra causa de un comportamiento de glicín y aspártico tal como el registrado puede ser la existencia de cambios de pH en ciertas zonas del papel. Hay un límite inferior de dilución más allá del cual el electrolito pierde su propiedad reguladora, por lo que pueden devengarse cambios de pH en algunas zonas del papel (107). No hemos comprobado esa afirmación aunque sabemos que el pH no se modifica sustancialmente en los vasos de electrolito - aún en corridas de fuerza iónica baja.

Finalmente, se pueden explicar los hechos citados, extendiendo a ese caso una observación hecha sobre el comportamiento de una proteína de carácter análogo y que ha sido estudiada por electroforesis según Tiselius por lo que puede servir de referencia. En efecto, según Schmidt (146c) la caseína puede considerarse como si fuera un ácido polibásico debido a su gran contenido de grupos carboxílicos libres. Es decir, que su comportamiento electroforético será del tipo del de los aminoácidos dicarboxílicos que nos ocupan.

Moyer (118) nos da la curva representativa de la relación existente entre el pH del punto isoelectrico de la caseína y los valores de la fuerza iónica - de un electrolito de ácido acético-acetato de sodio (gráfi

co 3,31). Abramson y colaboradores (2b) reproducen la misma curva y su ministran además la curva μ H-movilidad de la caseína en las cercanías de su punto isoeléctrico, en el mismo regulador (gráfico 3,32). El autor mencionado afirma (2c) que es válido suponer que las curvas de μ H-movilidad de un mismo migrante a diferentes valores de fuerza iónica constituyen una familia de curvas paralelas.

Si aceptamos entonces que eso vale también para la caseína podremos trazar en un sistema de coordenadas μ H-movilidad (gráfico 3,32) las curvas (paralelas) que pasen por los puntos isoeléctricos que da el gráfico 3,31 y cada una de esas curvas corresponderá a una fuerza iónica dada. Para calcular las movilidades correspondientes a valores diferentes de fuerza iónica de un electrolito de μ H constante, no habrá más que trazar por ese μ H una perpendicular al eje de las abscisas (μ H) y registrar el valor en las ordenadas (movilidades) correspondientes a cada intersección de esa perpendicular con las curvas paralelas. Se obtiene así una serie de valores de movilidad en función de la fuerza iónica que representada gráficamente (gráfico 3,33) proporciona una curva análoga a la determinada experimentalmente para los ácidos glutámico y aspártico: la movilidad decrece al aumentar la fuerza iónica por encima del valor 0,02 (caseína) ó 0,025 (glutámico-aspártico). Para valores menores de la fuerza iónica, la movilidad decrece con ella.

A fin de recoger más información sobre el comportamiento encontrado para los aminoácidos dicarboxílicos en soluciones de fuerza iónica variable, hemos rog

Gráfico 3,31. pH isoelectrico de partículas de caseína en función de la fuerza iónica de un regulador de acetato (según 2b).

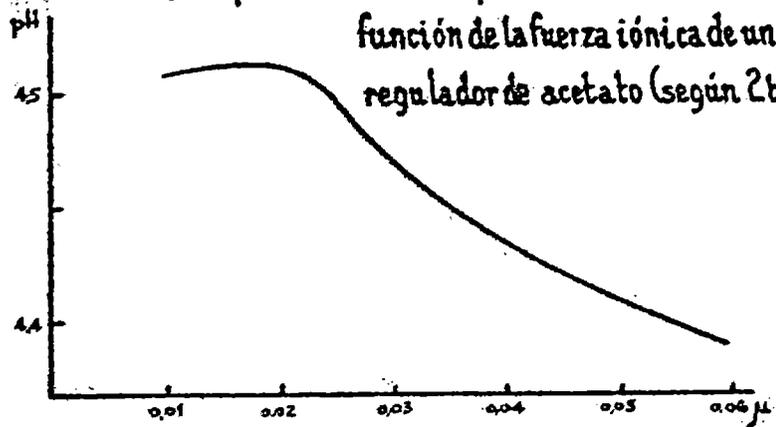
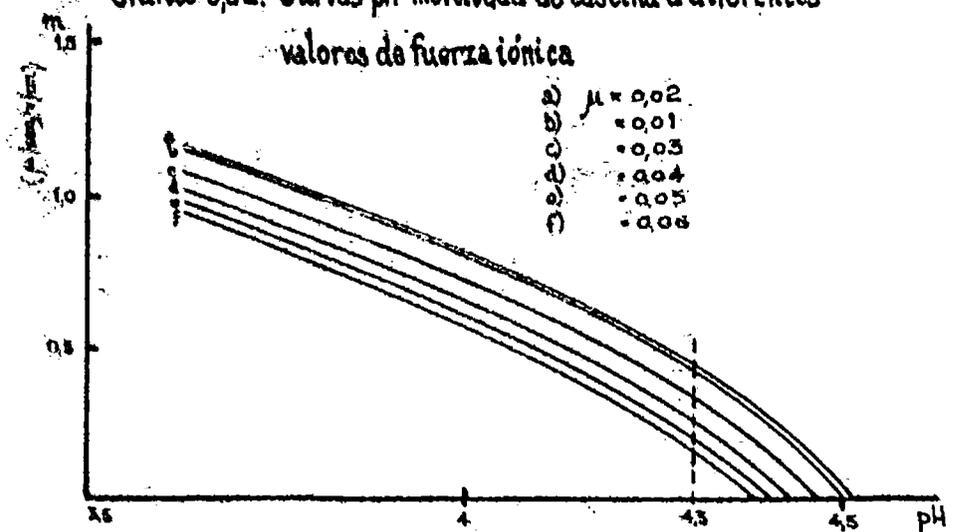
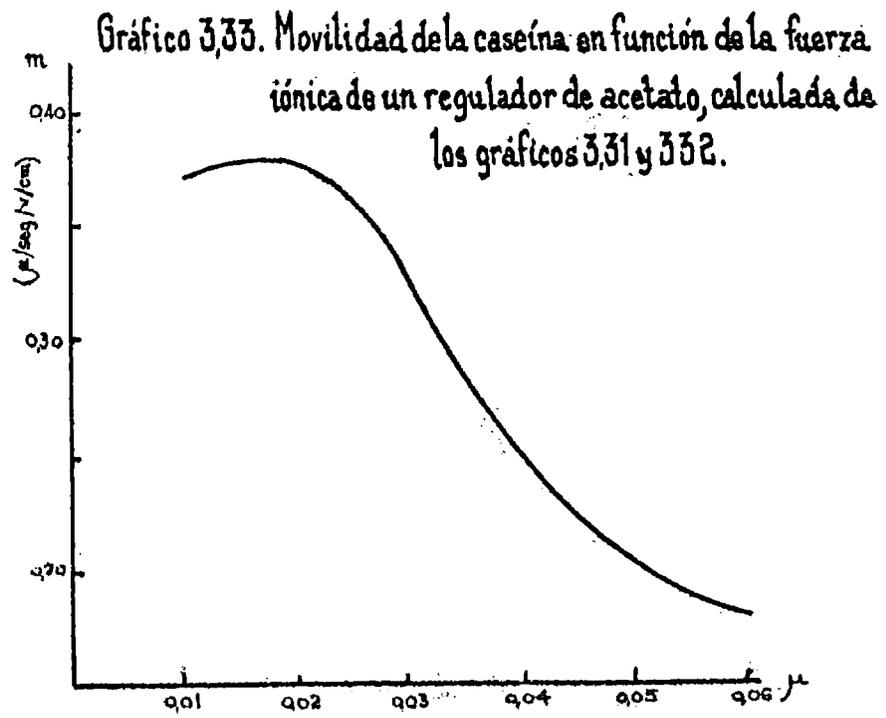


Gráfico 3,32. Curvas pH-movilidad de caseína a diferentes valores de fuerza iónica





lizado otra serie de experiencias análogas incluyendo en la mezcla el aminoácido del que la literatura da a conocer su curva fuerza iónica-movilidad. Además, y con el propósito de estudiar el efecto que tiene sobre la movilidad la presencia y naturaleza de diversos iones, hemos agregado al acostumbrado electrolito de ácido acético-acetato de sodio, cantidades variables de una sal neutra (cloruro de sodio).

Las condiciones experimentales fueron fundamentalmente análogas a las que menciona la tabla 3,4, en lo que se refiere a pH, gradiente de potencial, duración de la corrida, y papel. La fuerza iónica, en cambio, se varió de 0,0142 a 0,050 con las cantidades, expresadas en valores de fuerza iónica, de mezcla ácido acético-acetato de sodio-cloruro de sodio, que se ven en la tabla 3,41

TABLA 3,41

Movilidad de los ácidos glutámico y aspártico y de leucina en función de la fuerza iónica.

Exp. Nº	μ_{total}	μ_{ClNa}	Movilidad (cm/s/v/cm.10 ³)		
			Glu	Asp.	Ieu
58/60	0,0142	0,0071	- 4,59	- 7,47	2,30
61/65	0,020	0,0066	- 4,20	- 7,13	2,23 (*)
66/71	0,025	0,0125	- 4,11	- 6,84	1,41 (**)
72/76	0,030	0,0050	- 3,67	- 6,49	1,76
77/73	0,050	0,0250	- 2,46	- 3,96	1,16

(*) Los datos de Ieu corresponden a la exp. 61 solamente.

(**) Los datos de Ieu y Glu corresponden a las experiencias 60/71 solamente.

Electrolito: ácido acético-acetato de sodio-cloruro de sodio; pH = 4,55; gradiente de potencial, 15,1 v/cm.; duración, 120 minutos.

Los resultados (representados en el gráfico 3,34) muestran una relación algo diferente de la del gráfico 3,3. Efectivamente, los datos y curvas obtenidas ahora con el agregado de cloruro de sodio solo coinciden con los logrados en las experiencias anteriores a valores de fuerza iónica superiores a 0,025. Además, los datos de movilidad recogidos a una fuerza iónica dada son menores que los obtenidos a ese mismo valor de fuerza iónica en la experiencia anterior sin agregado de cloruro de sodio.

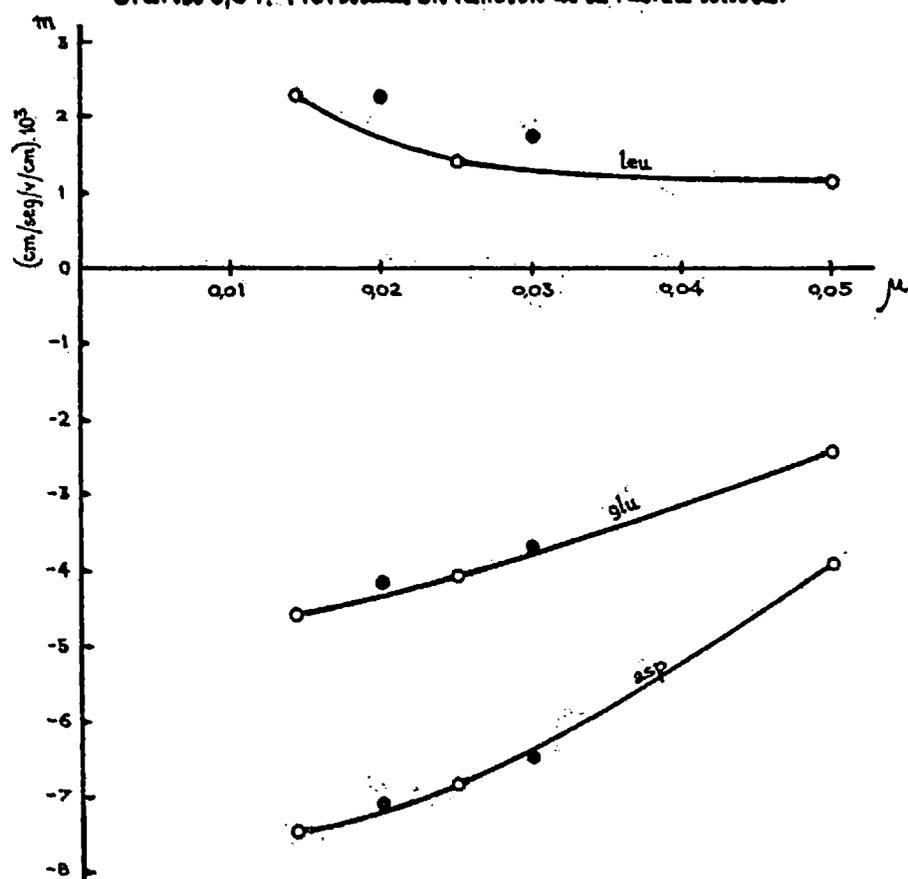
Las conclusiones que podemos sacar de ambas series experimentales son las siguientes:

Las movilidades de glutámico y aspártico decrecen al aumentar la fuerza iónica por encima del valor 0,025 en un electrolito de ácido acético-acetato de sodio o por encima de 0,0142 en un electrolito ácido acético acetato de sodio-cloruro de sodio.

De acuerdo a lo que la teoría hace esperar, la atmósfera iónica en que tendrá que moverse un migrante será, a fuerzas iónicas iguales, de mayor "densidad" en la solución con cloruro de sodio agregado; luego, las movilidades de aspártico y glutámico decrecen para valores iguales de fuerza iónica, al agregar al electrolito una cantidad dada de cloruro de sodio.

La diferencia de forma de las curvas obtenidas en ambas series para los mismos aminoácidos habrá

Gráfico 3,34. Movilidad en función de la fuerza iónica.



○ - electrolito con 1/2 de NaCl.
 ● - menos de 1/2 de NaCl.

que atribuirle a la presencia en uno de los casos de una diversa especie iónica: el ion cloruro. Su existencia en la solución de los clorhidratos de aminoácidos no debe tomarse en cuenta, dada su ínfima proporción.

El comportamiento de la leucina en las condiciones mencionadas confirma los resultados apartados por la bibliografía y provistos por la teoría.

La presencia de cloruro de sodio parece afectar en mayor grado la movilidad de la leucina que la de los aminoácidos dicarboxílicos: lo prueba el hecho de que los puntos de fuerza iónica 0,02 y 0,03, que tienen menor porcentaje de cloruro de sodio caigan fuera de la curva - engendrada por los demás. Así mismo, esos puntos corresponden a valores más altos de movilidad; esto se explica con las consideraciones anteriores.

Ya hemos anticipado que esta serie de experiencias es fructífera en otro sentido. Efectivamente el área de las manchas a obtener por el posterior revelado depende sensiblemente de la fuerza iónica del electrolito. Dijimos también que hay un valor de ésta por debajo del cual la superficie ocupada por la mancha es grande y sus bordes difusos. Al aumentar la fuerza iónica por sobre ese valor límite, la superficie ocupada por la mancha va disminuyendo, haciéndose los bordes más y más netos. (*) Esto es de gran importancia para nosotros si tenemos en cuenta que el método de evaluación que hemos de ensayar necesita precisamente para la medida de aquella área una mancha de forma regular y bordes netos. Por otra parte, el obtener manchas lo más pequeñas posibles, nos permite ay

(*) Ver nota al pie de §4,11.

mentar la cantidad de soluto sembrado y con élla, la intensidad de coloración.

Hemos estimado, mediante planimetría, el área aproximada de las manchas obtenidas en la serie anterior de corridas de fuerza iónica variable para una muestra de 1 microlitro de una solución de ácido glutámico 0,05M separado en un electrolito de ácido acético-acetato de sodio (tabla 3,42; gráfico 3,35).

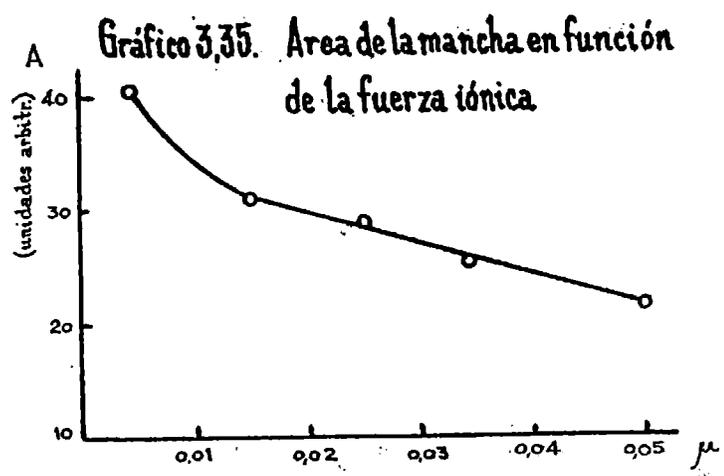
TABLA 3.42

Área de la mancha en función de la fuerza iónica.

Exp. nº	μ	Área (unidades arbitrarias).-
33	0,005	40,3
34/33	0,015	31,2
16/20	0,025	28,7
39/43	0,035	25,4
46/52	0,050	21,3

Glutámico 0,05 M (1 microlitro); electrolito: ácido acético-acetato de sodio; pH = 4,58; gradiente de potencial, -- 15,1 v/cm.; duración, 120 minutos; papel Whatman nº 1.

Los valores obtenidos corresponden a los promedios de valores individuales que varían mucho para un mismo rango de fuerza iónica, lo que no permite prever con aproximación el área de una mancha a una fuerza iónica determinada. La comparación de los datos experimentales -



permite confirmar que el área decrece al aumentar la fuerza iónica del electrolito. La relación entre ambas variables parece ser lineal para fuerzas iónicas superiores a 0,015.

Para la selección del valor de fuerza iónica adecuado al tipo de separación que buscamos será necesario entonces tener en cuenta no solo la diferencia de movilidad entre aspártico y glutámico y entre éste y los demás aminoácidos, sino también el tamaño de la mancha a obtener finalmente. Además, ese valor no debe ser muy alto para que la destilación de electrolito desde la hoja de papel no sea muy abundante y se modifiquen las demás condiciones durante la corrida.

TABLA 3.43

Distancia estimada en valores de movilidad a diferentes -- valores de fuerza iónica, entre las curvas de los ácidos -- glutámico y aspártico y el eje de las abscisas del gráfico 3,3.

μ	Glu	Asp.	Diferencia Glu-Asp.
0,005	2,3	4,7	2,4
0,010	3,0	6,0	3,0
0,015	3,7	7,1	3,4
0,020	4,3	8,1	3,8
0,025	4,7	8,5	3,8
0,030	4,6	8,3	3,7
0,035	4,4	8,0	3,6
0,040	4,3	7,6	3,3
0,045	4,2	7,2	3,0
0,050	4,1	7,0	2,9

El valor de fuerza iónica 0,025 es el que proporciona un mayor grado de separación, según puede verse en la tabla 3,43, que da las diferencias -expresadas en valores de movilidad- existentes entre las dos curvas y la curva de glutámico y el eje de las abscisas del gráfico 3,3. Así mismo, la intensidad de corriente que pasa por una hoja empapada en un electrolito tal (aproximadamente 0,16 ma/cm. para una hoja de 32 x 10 cm. de papel Whatman nº 1 y un regulador de ácido acético-acetato de sodio de pH = 4,55 a un gradiente de potencial de 15 v/cm.) no -- causa una destilación exagerada. Sin embargo, las manchas que proporcionan las corridas realizadas a esta fuerza iónica no reúnen las condiciones (color intenso, borde neto) que consideramos decisivas para una buena estimación planimétrica de las áreas, de manera que, aunque a expensas de la rapidez de separación, es preferible llevar a cabo ensayos con valores mayores de fuerza iónica para proveernos de manchas con las características requeridas. Es por eso que el valor de fuerza iónica que consideramos óptimo para una separación de glutámico y aspártico a pH 4,55 y electrolito de ácido acético-acetato de sodio, es el de 0,050. Los inconvenientes que trae el trabajo en estas condiciones son fácilmente subsanables: el tamaño de las manchas se puede aumentar sembrando mayor cantidad de soluto, lo que no trae molestias si se emplea la técnica de siembra en papel húmedo y apoyado solamente en los extremos; en estas condiciones y como probaremos más adelante, dentro de ciertos límites el área de la mancha no depende del volumen de líquido sino de la cantidad absoluta de aminoácido depositada.

Una separación equiparable a la que suministran fuerzas iónicas menores, se consigue aumentando algo la duración de la electroforesis. Finalmente, el calentamiento de la hoja no es excesivo, puesto que el promedio de la intensidad de corriente que pasa en una electroforesis de ese tipo es de solo 0,25 ma/cm., valor que está por debajo de los considerados convenientes (0,3 ma/cm.; (47)) para corridas de este tipo.

3,33 Duración de la electroforesis. El análisis del movimiento electroforético de un soluto en función del tiempo de corrida, además de proveer otra de las condiciones óptimas que buscábamos, nos habríade aclarar, siquiera en parte, el tipo de relación que los vincula.

Este punto ha sido motivo de controversia, asegurando algunos autores (47) la falta de una relación lineal entre movimiento y tiempo. Otros, en cambio, aseguran (104, 107, 108) que son necesarios ciertos requisitos técnicos para la confirmación experimental de esa relación lineal, a saber: a) empleo de puentes salinos y atmósfera de helio; b) constancia de las lecturas del miligramperímetro, lo que significa uniformidad de la zona del papel en la cual se efectúa la migración respecto a la vaina que lo rodea, a la composición iónica, gradiente de potencial y temperatura; c) horizontalidad del papel en toda su longitud e igualdad de nivel de líquido en todos los vasos (esto por un efecto "cromatográfico" que produciría el flujo de líquido a través del papel). Todo eso no significa más que eliminar el movimiento de electrolito en el papel. Si ese movimiento no se evita, sino que se mide, también -

se tiene una relación lineal (89).

Nuestras experiencias no cumplen con todos estos requerimientos, pues la hoja está colocada horizontalmente en nuestro sistema pero, debido a su propio peso y al del líquido que la embebe, adopta una forma cóncava. Por otra parte el uso de puentes salinos puede ser contraproducente para fines cuantitativos puesto que por ellos - puede producirse una pérdida de soluto de la hoja.

Para comprobarlo se realizaron las experiencias cuyos resultados aparecen en la tabla 3,5. Fue necesario utilizar como soporte, no ya una hoja ancha de papel, como antes, sino reemplazarla en cada corrida por cuatro tiras angostas (32x2 cm.) de papel de filtro. Esas tiras, humedecidas y sembradas de la manera ya mencionada, se comenzaban a correr simultáneamente pero luego se iban sacando una a una, a intervalos de treinta minutos. La diferencia de potencial se mantenía constante dentro de ciertos límites mediante ajuste desde la fuente en 450 voltios aproximadamente. Las condiciones comunes a todas las experiencias son: electrolito, mezcla de ácido acético-acetato de sodio de pH 4,55 y fuerza iónica 0,05; papel de filtro Whatman nº 1; siembra, en cada punto un microlitro de solución 0,05 M de los ácidos glutámico y aspártico como clorhidratos.

TABLA 3,5

Movimiento de los ácidos glutámico y aspártico en función del tiempo.

Exp. nº	t (min)	Movimiento: cm/v/cm. 10 ²	
		Glu	Asp.
53 y	30	4,30	8,65
79/82	60	15,10	23,75
	90	22,30	33,50
	120	28,90	50,60

Electrolito, ácido acético-acetato de sodio; pH 4,55; fuerza iónica 0,05; gradiente de potencial, 15,3 v/cm.

Las curvas del gráfico 3,4 muestran la relación existente entre el movimiento -medido en $\text{cm/v/cm} \cdot 10^2$, esto es, distancia por gradiente de potencial- de esos aminoácidos, y el tiempo.

En su trazado no se han tomado en cuenta los puntos de movimiento a los 30 minutos, por cuanto mediante el análisis estadístico se ve que el valor de su coeficiente de variación es muy elevado (tabla 3,51).

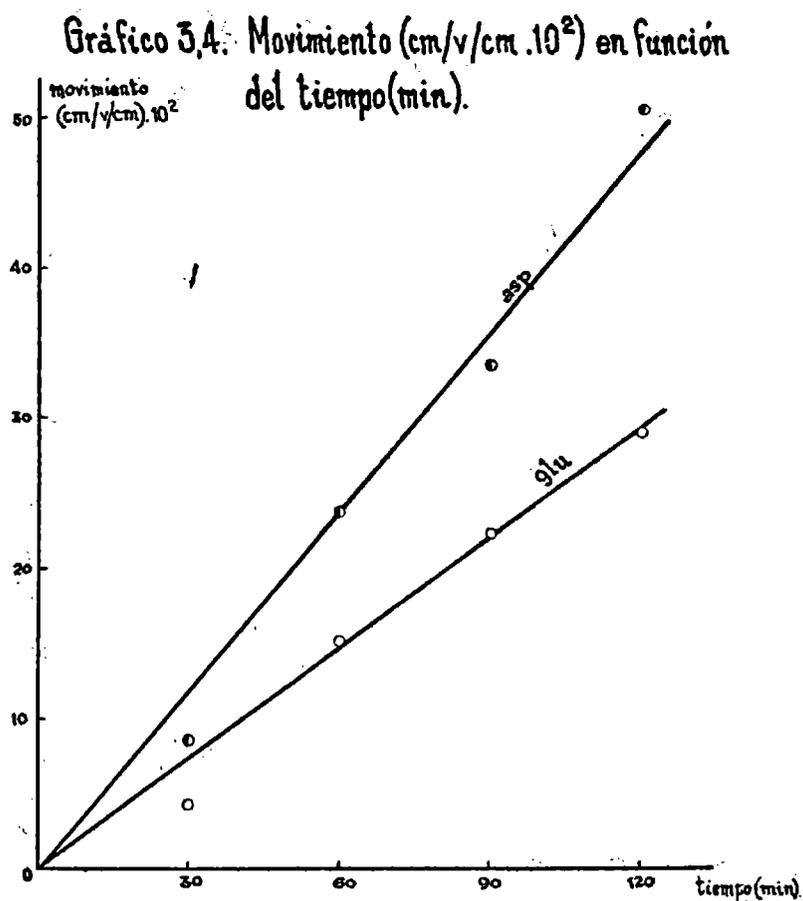


TABLA 3,51

Análisis estadístico de los resultados de las experiencias movimiento tiempo. (Acido glutámico)

Exp. no	Valores in dividuales (X)	X - T.M.	$(X - TM)^2$	Desviación standard. $\sigma = \sqrt{\frac{\sum (X-TM)^2}{n-1}}$	Resultado	Coefficiente de variación % ($100 \cdot \sigma / TM$)
n = 5	TM = 4,30		$\sum = 37,0736$	3,05	$4,30 \pm 3,05$	71
53	8,50	4,2	17,6000			
79	4,36	0,06	0,0036			
80	0,65	- 3,65	13,3000			
81	2,33	- 1,97	3,8700			
82	5,82	1,50	2,3000			
n = 5	TM = 15,1		$\sum = 131,4300$	5,77	$15,1 \pm 5,7$	38
53	15,6	0,5	0,2500			
79	20,7	5,6	31,2000			
80	6,2	- 8,9	79,0000			
81	19,5	4,4	19,3000			
82	13,8	- 1,3	1,6800			
n = 5	TM = 22,3		$\sum = 28,3200$	2,7	$22,3 \pm 2,6$	12,2
53	23,8	1,5	2,2500			
79	22,7	0,4	0,1600			
80	17,6	- 4,7	22,0000			
81	22,7	0,4	0,1600			
82	24,7	2,4	5,7500			
n = 5	TM = 28,9		$\sum = 26,2900$	2,6	$28,9 \pm 2,6$	9
53	35,3	6,4	41,0000			
79	26,0	- 2,9	8,4000			
80	21,3	- 7,6	57,5000			
81	28,6	- 0,3	0,0900			
82	33,3	4,4	19,3000			

La curva se traza pues teniendo en cuenta el origen de coordenadas y el movimiento a 60; 90 y 120 minutos.

Según se ve, la relación es sensiblemente lineal, por lo menos para este gradiente de potencial y en corridas de corta duración.

Otras experiencias de menor gradiente y mayor duración (3 horas a 200 voltios, por ejemplo) han mostrado un apartamiento bastante grande la relación lineal. Lo mismo se observa si se aumenta la diferencia de potencial a valores de por ejemplo 700 v.

En general, el valor del último punto (120 minutos) es menor al que correspondería para mantener esa relación lineal.

A nuestro juicio, la explicación reside en que en las experiencias de larga duración, aunque sean a bajo gradiente, o en las que se aplican grandes diferencias de potencial, se produce un calentamiento de la hoja relativamente mayor que con el valor crítico de aproximadamente 450 v. (que para nuestra hoja, que suministra una longitud de puente de 29,5 cm. de promedio significa un gradiente de unos 15,3 v/cm.). Ya conocemos las consecuencias de un calentamiento tal: aumento de la destilación de electrolito y del flujo de reposición; éste es el que parece frenar el desplazamiento de los aminoácidos en los casos considerados.

Parece comprobarlo el hecho de que, a cualquier gradiente de potencial, la relación lineal está mucho más próxima si se trabaja con electrolito a 4-5°C. - al iniciarse la experiencia y aunque en su transcurso no se

haga nada para mantener esa temperatura.

En definitiva, podemos decir que en condiciones determinadas tales como corta duración, gradiente de potencial de 15 v/cm/ y temperatura ambiente entre 15 y 20°C. el movimiento de los ácidos glutámico y aspártico es directamente proporcional al tiempo. Esa relación parece no poder mantenerse muy lejos de esas condiciones.

De acuerdo con esto, el lapso a adptar para una separación tipo, dependerá en última instancia de la diferencia de potencial aplicada, pero convendrá que no sea lo suficientemente grande como para ocasionar perturbaciones como las mencionadas.

3,34 Diferencia de potencial. Para el estudio de la influencia de la diferencia de potencial aplicado sobre la movilidad de los aminoácidos glutámico y aspártico, habrá que introducir otra magnitud física. Esa magnitud se llama fuerza del campo y puede definirse como equivalente a la fuerza eléctrica que actúa sobre una carga unitaria (2a).

En una electroforesis libre tipo la fuerza del campo es $X = v/l$, donde v es la diferencia de potencial aplicada y l es la longitud del recipiente. Aunque el potencial cambie con el lugar del recipiente que se considere, la fuerza del campo es constante dondequiera que se la tome en cuenta. Desde este punto de vista, la movilidad electroforética puede definirse como la velocidad electroforética para una fuerza del campo unitaria. La movilidad es una magnitud característica para cada partícula cargada en condiciones ordinarias de temperatura, concentración salina, etc., e independiente de la diferencia de potencial aplicada y de las dimensiones del aparato.

En electroforesis en papel McDonald y colaboradores (104, 107) han encontrado que la fuerza del campo o gradiente de potencial como ellos la llaman, influye linealmente sobre el movimiento de un aminoácido, si llamamos movimiento a la distancia recorrida en la unidad de tiempo. Las unidades en que se expresaran esas magnitudes serán: $(X) = \text{voltios/cm.}$ y movimiento $(n) = \text{cm/seg.}$

Ya hemos caracterizado varios de los factores que regulan la movilidad electroforética en papel; será interesante estudiar el movimiento de nuestros aminoácidos a diferentes valores de la fuerza del campo.

Las experiencias de la tabla 3,6 nos darán el material necesario para comparar el efecto de variaciones en la fuerza del campo sobre el movimiento de un aminoácido, mantenidos constantes los demás factores que rigen su desplazamiento electroforético. Se ensayan tres rangos de gradiente de potencial: 6,8; 15,2 y 23,3 v/cm, correspondientes a diferencias de potencial respectivas de 200; 400 y 700 voltios aproximadamente, para un puente de alrededor de 29,5 cm. de longitud promedio. Se computa el movimiento (expresado en micrones por segundo) a esos valores de tensión, a los 60 y 120 minutos de electroforesis, por separado. Asimismo se dan los valores de movilidad obtenidos en esas condiciones al cabo de 120 minutos.

TABLA 3,6

Movimiento de los ácidos glutámico y aspártico en función de la fuerza del campo.

Experiencias nº	X (v/cm)	MOVIMIENTO (μ /seg)				Movilidad (t_{∞} = 120) (cm/s/v./cm.10 ³)	
		t_{∞} 60 minutos		t_{∞} 120 min.			
		Glu.	Asp.	Glu.	Asp.		
45 y 83	6,8	3,41	5,84	2,36	4,31	3,49	6,38
53 y 79/82	15,2	6,76	10,63	6,12	10,70	4,01	7,02
46 y 84/85	23,3	8,42	12,31	6,55	12,82	2,80	5,16

Electrolito: ácido acético-acetato de sodio; pH 4,55; fuerza iónica 0,05; papel, Whatman nº 1 de 32 x 2 cm.; siembra 1 microlitro de 0,05 M.

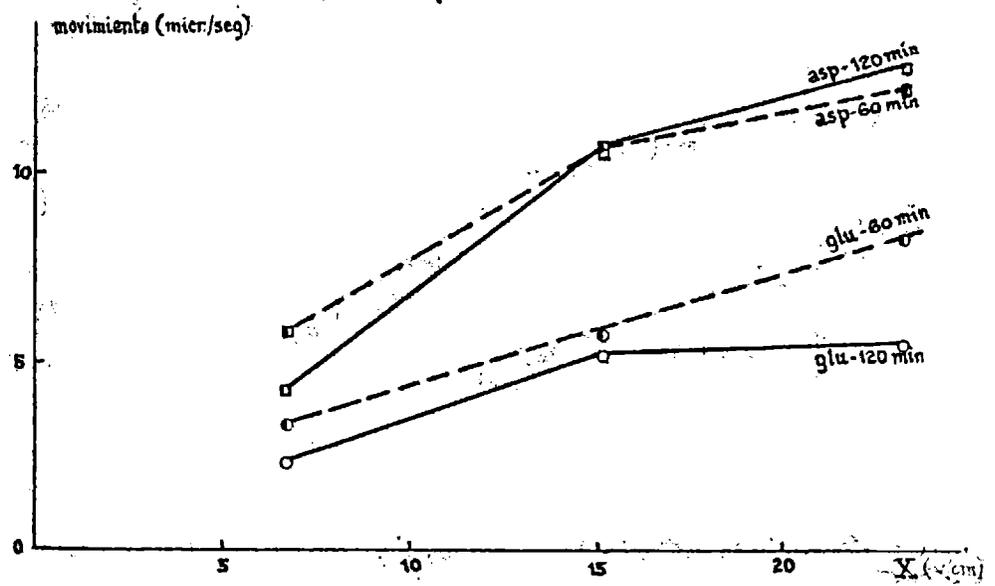
La representación gráfica de los valores obtenidos (gráfico 3,5) muestra que a los 60 minutos la relación entre movimiento y fuerza del campo es lineal solamente para el ácido glutámico. Las otras curvas presentan un carácter análogo entre ellas: el punto de gradiente 15,3 es relativamente más alto que los otros dos. Esa diferencia se observa también en los valores de movilidad, sobre todo en el que corresponde al mayor potencial.

Para encontrar una explicación de los hechos citados puede ser útil traer a colación la siguiente observación experimental: las intensidades iniciales de corridas efectuadas a temperatura ambiente de aproximadamente 20°C y en las condiciones de la tabla mencionada presentan valores que, por supuesto, están en relación directa con el potencial aplicado. Así, valores medios de intensidad han sido: a 200 v., 0,36 ma/cm.; a 450 v., 0,83 ma/cm. y a 700 v., 1,23 ma/cm.

La energía eléctrica desarrollada será pues de 0,07; 0,37 y 0,86 wátios, respectivamente.

Ahora bien, según McDonald (104) el -

Gráfico 35 Movimiento (micr./seg) en función de la fuerza del campo (v/cm).



flujo de electrolito que repone al evaporado comienza a ag-
tuar significativamente sobre el desplazamiento de los mi-
grantes a valores de energía eléctrica de 0,25 vatios, a -
25°C. Ese efecto, añade, decrece rápidamente con la temp-
ratura.

De modo que en nuestro caso y tomando
en cuenta la diferencia de temperaturas, nos encontramos -
dentro del límite de tolerancia a 450 v. y muy por encima
de él a 700 v.

Debemos suponer entonces que ya a las
dos horas de corrida se empieza a poner de manifiesto un
mayor calentamiento y flujo de reposición subsecuente oca-
sionados por tensiones más altas que 450. Es el flujo de
reposición que el aminoácido encuentra en su desplazamiento
el que lo frena y causa así los valores relativamente bajos
de movimiento observados.

Esa acción lógicamente se acentúa al
aumentar la distancia en que el migrante se aparta de la -
línea media, por lo que será más notable sobre los más ve-
loces: aspártico en este caso, sobre el cual ya actúa a los
60 minutos.

En resumen, en electroforesis en papel
efectuadas a temperatura ambiente, el movimiento de los á-
cidos glutámico y aspártico no está en relación lineal con
el potencial aplicado (entre 200 y 700 v.) en experiencias
de corta duración.

Por ello, no es indiferente la elección
de una tensión óptima para una separación tipo.

A 700 v., el desplazamiento de los mi-

grantes es casi el mismo que a 450 v., para una separación de dos horas. En ese tiempo y en las condiciones citadas, un potencial de 200 v. causa un desplazamiento de aspártico y glutámico apenas suficiente para separarlos. Para lograr una separación equivalente a la provista por tensiones más altas es necesario alargar la corrida a 2,5 y 3 horas y en tonces aparecen, según hemos comprobado experimentalmente, efectos perturbantes que reducen mucho el desplazamiento. Esos efectos consisten a nuestro juicio en un exagerado flujo de reposición motivado a su vez por el recalentamiento de la hoja de papel (veremos más adelante que la temperatura aumenta levemente durante la corrida).

El potencial a elegir parece estar en consecuencia en las inmediaciones de 450 v., lo que, en nuestro dispositivo, equivale a más o menos una fuerza del campo de 15 v/cm.

3,35 Concentración de los solutos. De las consideraciones que sobre la movilidad electroforética hemos hecho en § 3,31 se deduce que élla no varía con la concentración del migrante. Esto es cierto por lo menos para la electroforesis libre y en soluciones diluídas de proteínas (2a).

McDonald (104) encuentra, en electroforesis en papel realizadas en condiciones especiales (tiras angostas de papel, de manera que el migrante no pueda expandirse lateralmente, atmósfera de helio, siembra en forma de banda de 1,2 cm. de ancho) que la movilidad de la glicocola no varía entre concentraciones 0,027 a 2,680 molares y en corridas de 3 horas, a 24°C, 8,05 v/cm., pH 8,6 y regulador de veronal de fuerza iónica 0,1. Mide las distancias recorridas a partir del frente de la mancha.

Por nuestra parte hemos intentado poner de manifiesto el comportamiento de diferentes concentraciones de glutámico y aspártico separados los dos en idénticas condiciones. Desde el punto de vista de que es posible hacer esas condiciones exactamente idénticas al separar las diversas concentraciones de un aminoácido en la misma hoja de papel, el método que nos ocupa es particularmente apto.

Las experiencias realizadas consistieron en sembrar en una hoja de papel de filtro Whatman nº 1, uno o dos microlitros de cada una de las mezclas de ácidos glutámico y aspártico que siguen: 0,05 M; 0,075 M; 0,10 M; y 0,15 M. El electrolito fué una mezcla de ácido acético acetato de sodio. Las condiciones de la separación electroforética fueron: pH 4,55; fuerza iónica 0,050; gradiente de potencial 15,1 v/cm.; 120 y 180 minutos, según los casos (tabla 3,7).

TABLA 3.7

Movilidad de los ácidos glutámico y aspártico en función de la concentración.

Exper. n°	Durac.. (min.)	Siembra (μ l.)	Movil. Glutámico (cm/s/v/cm.10 ³)			Movil. Aspártico (cm/s/v/cm.10 ³)				
			0,05 M	0,075 M	0,10 M	0,15 M	0,05 M	0,075 M	0,10 M	
54/57	120	1	3,64	3,51	3,39	2,98	6,64	6,43	6,27	5,64
86/88	180	2	3,51	3,43	3,19	2,79	-----	-----	-----	-----

Condiciones: en el texto

Los ensayos (gráfico 3,6) muestran que la movilidad de aspártico y glutámico decrece con la concentración, en electroforesis en papel, por lo menos en el rango de molaridades que va de 0,05 a 0,30 (es decir, 2 microlitros de 0,15 M) y que hay aproximadamente una relación lineal entre el aumento de la concentración y la disminución de la movilidad. La recta representativa no es paralela al eje de las abscisas como era de esperar si bien su inclinación es poco pronunciada, lo que quizá podría atribuirse al efecto proveniente del flujo electroendosmótico y del flujo de reposición de electrolito.

En las mismas condiciones, pero con un electrolito de ácido acético-acetato de sodio-cloruro de sodio, se ensayó el efecto simultáneo sobre la movilidad de variaciones en la concentración y la fuerza iónica. La concentración varió entre 0,05 M y 0,15 M y la fuerza iónica entre 0,0142 y 0,050, con el porcentaje de cloruro de sodio que indica la tabla 3,71.

Gráfico 3,6. Movilidad en función de la concentración.

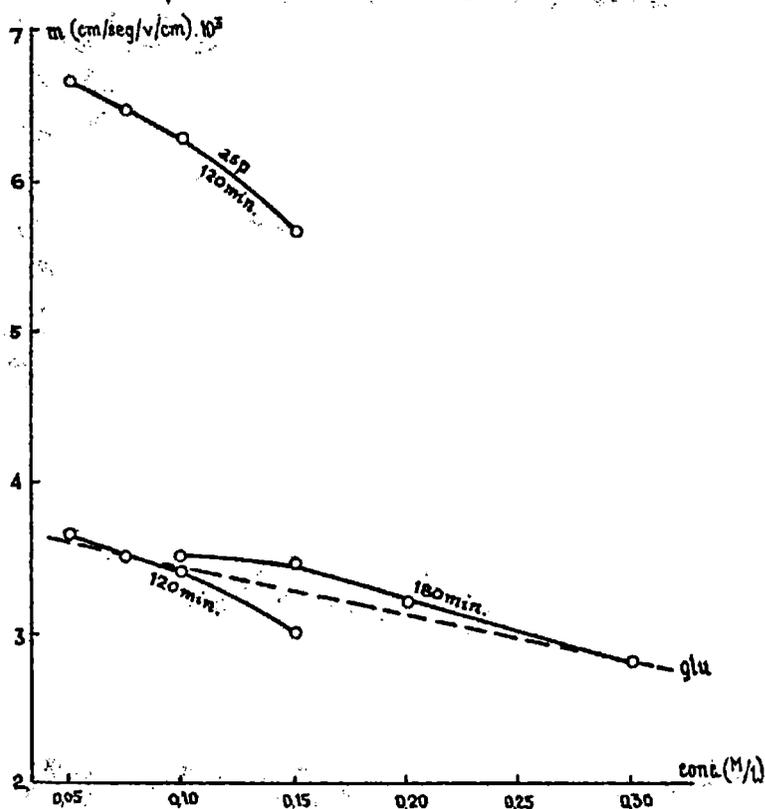


TABLA 3,71

Movilidad de los ácidos glutámico y aspártico en función de la concentración a diferentes valores de fuerza iónica.

Exper.	μ total	μ_{ClNa}	Movilidad (cm/s/v/cm. 10^3)									
			Glutámico					Aspártico				
			0,05 M	0,075 M	0,10 M	0,15 M	0,05 M	0,075 M	0,10 M	0,15 M		
58/60	0,0142	0,0071	- 4,59	- 4,23	- 3,84	- 3,49	- 7,47	- 7,15	- 6,95	- 6,64		
62/65	0,0200	0,0066	- 4,20	- 3,60	- 3,49	- 3,15	- 7,13	- 6,54	- 6,56	- 6,23		
69/71	0,0250	0,0125	- 4,11	- 4,01	- 3,72	- 3,31	- 6,59	- 6,46	- 6,18	- 5,78		
72/76	0,0300	0,0050	- 3,67	- 3,35	- 3,21	- 3,09	- 6,49	- 6,15	- 6,07	- 5,68		
78	0,0500	0,0250	- 2,43	- 2,24	- 2,24	- 2,05	- 3,91	- 3,76	- 3,67	- 3,48		

Electrolito: ácido acético-acetato de sodio-cloruro de sodio; pH 4,55; gradiente de potencial, 15,3 v/cm.; duración, 120 minutos; siembra, 1 microlitro.

Las diversas curvas de movilidad-fuerza iónica a diferentes valores de concentración así obtenidas para aspárticos y glutámico (gráfico 3,61) muestran que pertenecen a sendas familias y son aproximadamente paralelas, lo que confirma los resultados del ensayo anterior.

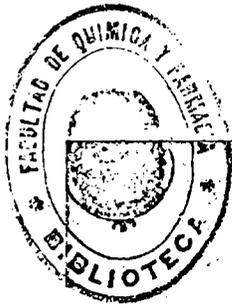
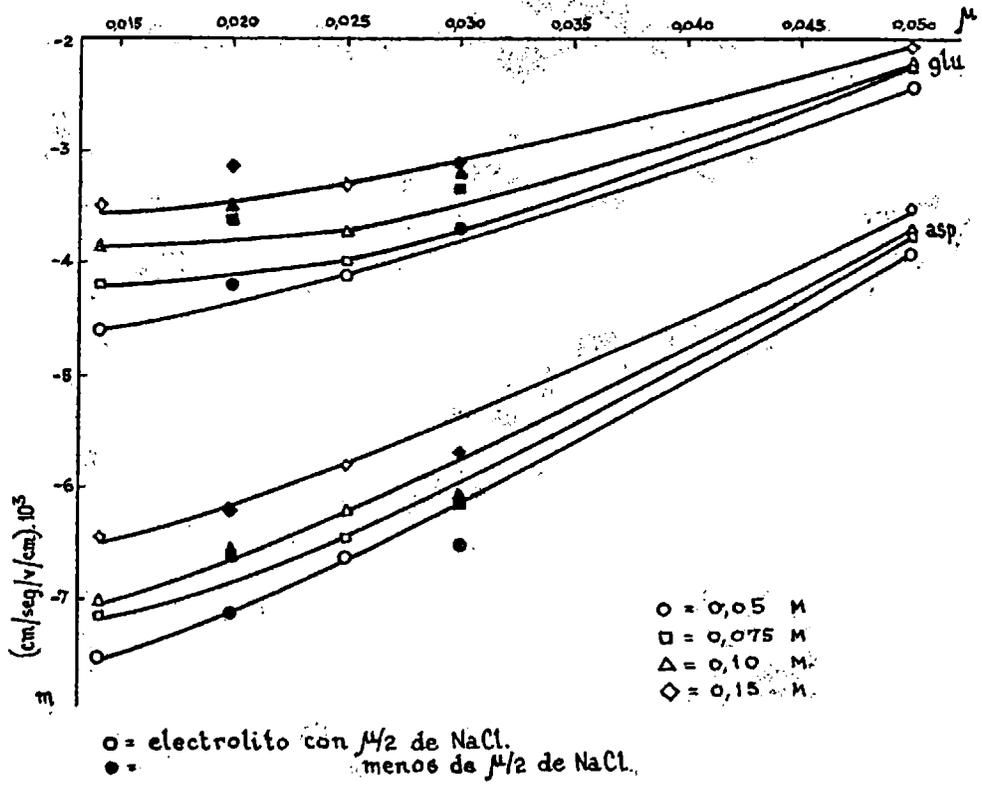


Gráfico 3,61. Movilidad en función de la fuerza iónica para amino-ácidos dicarboxílicos en varias concentraciones.



3,36 Papel de filtro. La elección del papel de filtro adecuado para hacer de soporte en una electroforesis de aminoácidos no parece ser demasiado importante, dentro de ciertos límites. Queremos decir que, por sobre un nivel dado de calidad, cualquier papel de filtro puede servir para esos fines. Las condiciones que involucra ese nivel de calidad son: buen grado y claridad de separación de las manchas de aminoácidos; poca difusión de las mismas; escaso arrastre ("trailing") y, muy especialmente, para fines cuantitativos, uniformidad.

La bibliografía sobre el tema hace mención de marcas y aún tipos variados de papel, todos ellos aparentemente aptos. Así, el S & S "Selecta 575" de Wieland y Fischer (174), el S&S nº 413 y Whatman nº 2 de Durrum (47, 48), el Eaton & Dickeman nº 613 de McDonald y colaboradores (107), el Whatman nº 1 de Biserte (13), todos se han mostrado convenientes para separar aminoácidos. Congden y Stanier (35) han analizado el comportamiento de 11 tipos de papel Whatman en la separación de aminoácidos, afirmando que todos ellos son aptos para tal fin.

El caso es distinto cuando se trata de corridas de larga duración como las de separación de proteínas, en las cuales es decisivo evitar una gran destilación de electrolito. Como para ello es conveniente colocar la hoja, no ya dentro de una gran cámara, sino entre dos placas de vidrio, es necesario emplear un papel de filtro grueso, por las causas que ya dimos en § 3,1. Papeles de esa naturaleza son el Munktell nº 20 (89) y Whatman nº 3 (9 b).

También se han mostrado aptos para eleg

troforesis de proteínas, pero no entre placas de vidrio, el mencionado Whatman nº 2, el francés Arches 301 (14), etc.

Por nuestra parte, hemos realizado unos pocos ensayos comparativos de los papeles Whatman nº 1 y 2. De éste teníamos los antecedentes mencionados y del nº 1, su aptitud demostrada para fines de aminoácidos y proteínas por Biserte (13) y en electrocromatografía de aminoácidos por Haugaard y Kroner (73).

El papel de filtro Whatman nº 1 permite, con respecto al nº 2, una mayor velocidad de los migrantes y quizá estos ocupen en aquél una mayor área, a igualdad de concentración. Esto sería lógico puesto que el 2 tiene más cuerpo, aunque la diferencia casi no es perceptible.

Lo importante es que el papel nº 1 se ha mostrado adecuado, tanto para la separación electroforética de aminoácidos como también para su posterior evaluación planimétrica. Efectivamente, las manchas obtenidas llenaban las condiciones requeridas de regularidad de forma, reproductibilidad y nitidez de los bordes.

Con ese tipo de papel de filtro hemos llevado a cabo todas las experiencias del presente trabajo.

Elas han mostrado que los valores de movilidad logrados no varían, cualquiera sea el sentido de la trama del papel a través del cual se efectúe el desplazamiento.

Este hecho parece confirmar lo que veremos más adelante (§ 3,37): que el papel no hace más que de soporte inerte en este tipo de separaciones electroforéticas.

3,37 Trataremos aquí y en conjunto, varios factores que actúan en la electroforesis en papel y de los cuales se han recogido observaciones en el curso de este trabajo.

Efecto de la temperatura.

La temperatura tiene una acción aceleradora sobre los migrantes. Es pues un factor importante en la determinación de un valor absoluto de movilidad, pero no tiene una gran significación para los fines comparativos de nuestros ensayos. Además, en la electroforesis en papel sus efectos están compensados y a veces hasta existe disminución de movilidad por el aumento de flujo de reposición que causa dicha elevación de la temperatura en el papel.

En algunas de nuestras experiencias hemos controlado la temperatura de una manera que si bien no muy exacta, da una idea de las variaciones que ella experimenta durante la electroforesis en papel.

Para eso, colocamos dentro de la cámara y con el bulbo descansando en la zona catódica del papel, un pequeño termómetro de mercurio cuya escala era fácilmente visible a través de la tapa de vidrio.

Ensayos realizados con electrolito de ácido acético-acetato de sodio-cloruro de sodio de pH 4,55 y fuerzas iónicas de 0,0142 y 0,025 proveyeron de los resultados que se ven en la tabla 3,8, y en los cuales la temperatura se leyó cada vez que se determinaron intensidades y voltaje, cada 15 minutos.

TABLA 3,8

Variación de la temperatura y la intensidad con el tiempo durante la electroforesis en papel.

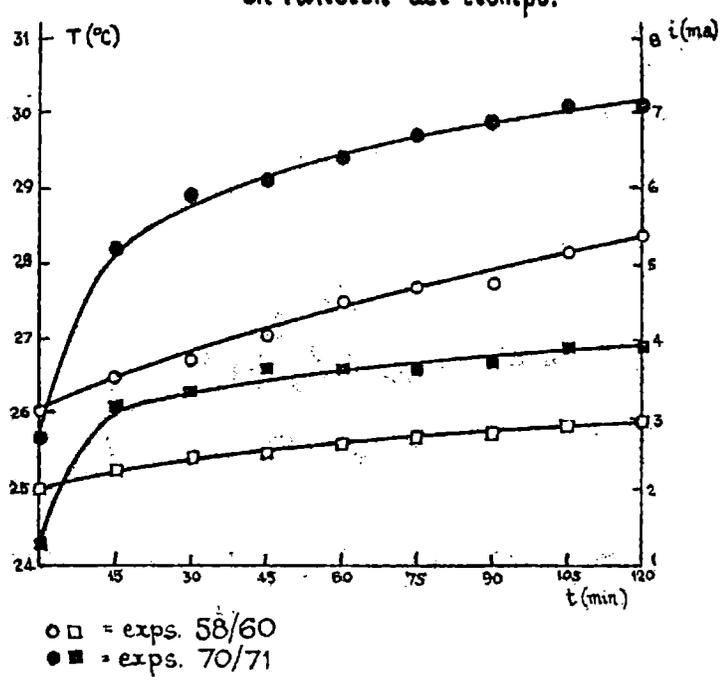
Tiempo (min.)	Exper. 70/71		Exper. 58/60	
	Temp. (°C)	Intens. (ma)	Temp. (°C)	Intens. (ma)
0	25,7	3,05	24,3	1,97
15	28,2	3,50	26,1	2,24
30	28,9	3,76	26,3	2,42
45	29,1	4,05	26,6	2,51
60	29,4	4,48	26,6	2,63
75	29,7	4,70	26,6	2,63
90	29,9	4,75	26,7	2,75
105	30,1	5,15	26,9	2,83
120	30,1	5,38	26,9	2,92

Electrolito, ácido acético-acetato de sodio-cloruro de sodio de pH 4,55 y fuerzas iónicas 0,0142 (Exp. 50/60) y --- 0,025 (exp. 70/71); gradiente de potencial, 15,6 v/cm.; duración 120 minutos.

Las curvas representativas (gráfico 3,7) muestran un trazo inicial en el que la temperatura crece rápidamente con el tiempo; luego los puntos del diagrama forman una recta de muy escasa inclinación, es decir, que la temperatura se eleva muy lentamente. Es casi constante si se trabaja a una temperatura ambiente relativamente baja (en invierno, por ejemplo).

Una forma análoga presentan las curvas que representan la variación de la intensidad con el tiempo.

Gráfico 3,7. Temperatura (o) e intensidad (■) en función del tiempo.



Flujo de reposición de electrolito.

Llamamos flujo de reposición a la corriente de electrolito que va yendo de los polos hacia la zona central del papel, sustituye al electrolito evaporado. La relación entre temperatura y flujo de reposición consiste en que un aumento de aquella, generalmente producto de un aumento de la intensidad o de un largo tiempo de corrida, causa una mayor destilación del electrolito del papel, que debe ser repuesto. Entonces asciende por efecto de sifón, por capilaridad, electrolito de los vasos. Este fenómeno, conjuntamente con el de electroendósmosis, son de consideración ineludible en determinaciones de valores absolutos de movilidad por electroforesis en papel.

En efecto, hemos comprobado experimentalmente la existencia del flujo de reposición mediante la siguiente serie de ensayos: en tiras de papel Whatman nº 1 de 32 por 10 cm. hemos sembrado un microlitro de una mezcla equimolecular de glutámico y aspártico 0,05 M, en tres puntos situados sobre la línea media transversal. Depositamos una cantidad igual de la misma mezcla en un punto situado en la zona catódica del papel y a distancias variables de la línea media.

TABLA 3.9

Distancia recorrida por los ácidos glutámico y aspártico desde diferentes puntos de aplicación.

Exp.nº	pH	(*)	Distancia (cm.)			
			Siembra central		Siembra lateral (*)	
			Glu	Asp	Glu	Asp
89	4,65	7,30	- 5,22	- 7,33	- 8,80	- 10,90
90/91	4,50	6,05	- 4,63	- 7,50	- 7,55	- 9,78
92/95	4,25	6,65	- 3,88	- 7,65	- 7,45	- 10,16
96/97	3,85	6,70	- 2,59	- 5,43	- 5,90	- 8,25

(*) En esta columna se da la distancia de la línea media hacia el cátodo a que está situado el punto de aplicación de la "siembra lateral".

Electrolito: ácido acético-acetato de sodio de fuerza iónica 0,025; gradiente de potencial 15,3 v/cm.; duración 120 minutos. Las distancias de migración están medidas desde el punto de aplicación respectivo.

La tabla 3,9 muestra como las distancias recorridas por los aminoácidos sembrados en ese punto son - con mucho mayores que las de los demás. Eso puede interpretarse como que su desplazamiento ha sido favorecido en parte del recorrido por el flujo de reposición.

El flujo de reposición puede hacerse - prácticamente nulo efectuando la electroforesis en condiciones que eviten la evaporación de regulador: a) agregando al regulador glicerol o algún otro no-electrolito de bajo peso similar; las manchas logradas por ese medio parecen - ser menos netas, aparte de que se complica la técnica de - coloración y secado (104); b) colocando la hoja entre pla-

cas de vidrio tratadas con un agente antihumectante (grasa de silicona, por ejemplo) o, cuando las intensidades sean altas, colocando las tiras en bloques de aluminio sumergidos en un baño de hielo, poniendo además una capa delgada de aislante eléctrico entre la tira de papel y el metal (49); c) sumergiendo la hoja de papel suelta (35) o entre placas de vidrio (38) en un líquido no polar inmiscible con el agua (clorobenceno, por ejemplo) (35, 38); d) recubriendo la hoja con parafina (ésta se agrega en solución en xilol y rápidamente solidifica; la capa así formada se elimina al final de la experiencia por simple calentamiento) (13); e) en general, la evaporación de la solución reguladora se reduce trabajando a baja temperatura. Con ninguno de esos sistemas se logra eliminar el flujo electroendosmótico, cuyo efecto hay que tener en cuenta en determinaciones de movilidad; f) proveer a la cámara de una camisa exterior por la que circula agua que hace de refrigerante, así como inyectar a la parte interna de la cámara gases como helio e hidrógeno saturados de agua que, excelentes conductores del calor, aceleran su disipación en las tiras de papel (104). Esto quizá sea demasiado complicado, aparte de que no se ha dado suficiente comprobación experimental de un dispositivo tal.

Otra alternativa consiste, no en tratar de anular el flujo de reposición, sino en regularlo y medirlo. En ese sentido está orientada la que Macheboeuf y colaboradores (99, 102) llaman electroreoforesis, de la que damos más detalles en otro lugar.

Flujo electroendosmótico.

Si a través de un tubo capilar lleno de líquido se establece una caída de potencial en dirección paralela a la luz del capilar, la pared del tubo adquirirá una carga de un signo dado y el líquido la contraria. Ambos tenderán a moverse hacia los polos opuestos. Como la pared del sólido está fija, solamente lo hará el líquido y se observará como un flujo de éste a través del capilar. Este fenómeno se llama electroendósmosis.

En la electroforesis en papel, este parece cargarse negativamente y el líquido, positivamente. El flujo electroendosmótico se hará, entonces en el sentido de migración de un catión, esto es, de ánodo a cátodo. En consecuencia, retardará la velocidad de los iones negativos y acelerará a los positivos. Una característica importante del flujo electroendosmótico y que lo diferencia netamente del flujo de reposición de electrolito es que el electroendosmótico tiene el mismo sentido en cualquier zona del papel que se considere; en cambio, el flujo de reposición cambia de sentido.

En cuanto al efecto que el flujo electroendosmótico tiene sobre la movilidad de los solutos, Mc Donald (104) considera que efectuando la electroforesis en papel en las condiciones propugnadas por él (cámara con camisa de refrigeración, atmósfera de helio o hidrógeno) es prácticamente despreciable.

Fundamenta esta apreciación en las razones que damos en § 2, 146.

Una estimación de la magnitud del flujo electroendosmótico puede hacerse depositando sobre la hoja

de papel una solución de una sustancia eléctricamente neutra o casi neutra. Utilizando dextrano, Kunkel y Tiselius (89) han conseguido determinar experimentalmente un coeficiente de corrección de la movilidad por flujo electroendosmótico que coincide apreciablemente con el calculado analíticamente.

Macheboeuf y colaboradores (102) en experiencias en que no se elimina sino que se regula la evaporación de electrolito en el papel, han estimado el valor de la resultante de los flujos electroendosmótico y de reposición de electrolito mediante la siembra de glucosa.

Debido a su característica uniformidad en todas las zonas del papel el efecto electroendosmótico no modificará el valor relativo de los resultados obtenidos en nuestras separaciones. Es por eso que no hemos realizado experiencias para su estudio.

Adsorción por el papel y "efecto cromatográfico".

Un punto interesante a considerar es el de un posible efecto de adsorción de los migrantes por el papel.

En general, la experiencia de diversos autores (47, 102, 104) muestra que ese efecto puede considerarse nulo en electroforesis en papel de aminoácidos y aún de proteínas.

El papel sería entonces un mero soporte inerte del electrolito en que se efectúa la migración, equivalente al tubo capilar en U de la electroforesis según Tiselius, salvo que en el papel los capilares serán muchos e irregulares, sinuosos.

Esto parece estar de acuerdo con la función que actualmente se considera que el papel tiene en cromatografía (24).

Siguiendo una idea que Macheboeuf (102) aplicó a proteínas y que consiste en efectuar la cromatografía en papel de los solutos usando como solvente el electrolito utilizado en la separación electroforética, hemos logrado resultados que parecen confirmar que el papel no tiene acción adsorbente en este tipo de fenómenos.

Las experiencias se realizaron sembrando a 5 cm. de uno de los extremos en un punto marcado con lápiz, una hoja de papel de filtro Whatman nº 1 de 32 por 1,5 cm., una vez un microlitro y otra vez 1,5 microlitros de una mezcla de glutámico, aspártico y leucina 0,05 M de cada uno de ellos. Una vez seca, la hoja se dispuso dentro de un tubo de ensayo de 40 cm. de longitud por 2,5 cm. de diámetro, en el fondo del cual se habían depositado 3 ml. del solvente, que en este caso era la mezcla reguladora de ácido acético-acetato de sodio-cloruro de sodio de pH 4,55 y fuerza iónica 0,014 utilizada en las experiencias 58 a - 60 de electroforesis.

Tapando el tubo y dejando que el extremo inferior del papel, cercano al punto de aplicación, pegara en el solvente, se esperó hasta que este ascendiera unos 16 cm. por sobre el punto de aplicación. Luego la hoja se retiró del tubo, se marcó con lápiz el frente del solvente, se secó en estufa a 90°C, se roció con anhídrido - 0,05 g/100 ml. de acetona y se secó de nuevo a 90°C (28).

El reactivo puso de manifiesto una lí

ca mancha correspondiente en consecuencia a los tres aminoácidos, situada en el frente del solvente. Este hecho debe interpretarse en el sentido de que, siendo los migrantes - completamente solubles en el solvente, no hay fenómenos de partición que retracen a algunos de ellos y siendo el papel inerte, tampoco hay separación por adsorción diferencial.

Las conclusiones de interés para nosotros están así esbozadas. Se ha confirmado que el papel no es más que un soporte inerte. Además, y quizá esto sea más importante, el flujo de electrolito en el papel (que sabemos que existe en forma de flujo de reposición^y de flujo electroendosmótico) no tiene efecto partitivo sobre los migrantes. Sí, en cambio, tiene lugar el denominado efecto cromatográfico, que no es otra cosa que el arrastre de los solutos por el electrolito.

3,4 Método de separación adoptado.

No haremos aquí más que reunir las observaciones anotadas en el estudio de variables que antecede, compaginando un método rápido y efectivo de separación de los ácidos glutámico y aspártico entre sí y de los demás aminoácidos, eventuales componentes de una mezcla, por electroforesis en papel de filtro.

El pH óptimo para esos fines debe estar en las inmediaciones de 4,50. En ese punto la separación entre glutámico y aspártico es buena, y entre aquél y el resto de la mezcla, suficiente para proporcionar manchas - netas en un tiempo relativamente corto.

Igualmente se presenta apto un valor - de fuerza iónica igual a 0,050 para un electrolito de ácido

acético-acetato de sodio de pH 4,55. Si bien la separación lograda a ese valor de la fuerza iónica no es la mejor, en cambio las manchas resultantes presentan características de nitidez e intensidad de color que hacen preferirlo. La intensidad de corriente que pasa por la hoja en electroforesis llevadas a cabo con esa fuerza iónica no es suficientemente alta como para causar una elevación de temperatura - que moleste. Un valor tipo sería, para una hoja de papel Whatman nº 1 de 32 por 10 cm., un valor de intensidad de - 0,27 ma/cm.

La duración de la electroforesis separatoria dependerá fundamentalmente de la diferencia de potencial aplicada y de la concentración de los solutos puesto que respecto a este último factor sabemos que de hecho la movilidad depende de la concentración. Habrá que fijar entonces condiciones relativas: el tiempo será de dos horas para potenciales de 450 voltios o, mejor dicho, gradientes de unos 15 v/cm., y mezclas de glutámico y aspártico hasta 0,15 M. La separación efectiva de soluciones hasta 0,45 M (es decir, siembra de tres micrólitros de una solución 0,15 M, lo que es lo mismo, según probamos en § 4,2) necesitará para el mismo potencial, una electroforesis de tres horas de duración.

El papel Whatman nº 1, tan usado en cromatografía, se ha mostrado también útil para las tareas electroforéticas, aún cuantitativas, del tipo practicado por nosotros.

La temperatura tiene gran influencia - sobre las condiciones de separación de una mezcla, sobre to

do en lo que se refiere a la evaporación de electrolito y sus efectos. Sin embargo, para los fines deseados es suficiente trabajar a temperatura ambiente, lo que se explica si se considera que la corta duración de nuestras experiencias reduce las perturbaciones.

4.- Valoración (método planimétrico).

Hemos dado ya una idea de los fundamentos de los métodos de evaluación de aminoácidos en general y ácido glutámico en particular. Todos ellos presentan inconvenientes tales como complejidades técnicas y larga duración que hacen de la determinación una tarea difícil y tediosa.

Las valoraciones post-cromatográficas en papel muestran, en relación con las demás, cierta sencillez, sobre todo en lo que se refiere a la posibilidad de efectuar muchas de ellas al mismo tiempo y en análogas condiciones. Y aunque la aproximación de los resultados no sea grande (se trata en realidad de tentativas de evaluación más que de métodos definitivos) son aplicables a la fiscalización de gran número de ensayos biológicos en los que, más que una estimación muy exacta, interesa poder obtener resultados comparables que den idea de la manera como se está realizando un proceso, por ejemplo.

En cuanto a su aplicación a aminoácidos separados por electroforesis en papel, tenemos noticia solamente del caso del análisis de retención, usado por Wieland tanto sobre electro, como sobre cromatogramas, con el resultado que mencionamos en otro lugar.

El ensayo de una estimación de aminoácidos mediante planimetría de sus manchas obtenidas por electroforesis en papel nos ha parecido de suficiente interés como para justificar la tentativa que a continuación se ve.

Consideramos entonces en primer lugar y con detalle el método propuesto originalmente así como los resultados obtenidos por otros autores; al aplicarlo. Luego, sus fases técnicas desde nuestro propio punto de vista. Después, los resultados que hemos logrado al aplicar

esa técnica y finalmente las modificaciones que ésta hubo de sufrir para dar resultados aceptables.

No es posible sacar de los resultados de nuestra experiencia conclusiones sobre el método tal como ha sido enunciado por sus autores, porque el sustrato sobre el que aplicamos la estimación planimétrica no proviene de una cromatografía sino de una electroforesis en papel. Y si bien en ambos casos se tiene al final de la separación la hoja de papel de filtro llevando las manchas de los aminoácidos, los fenómenos que han intervenido en aquélla son de naturaleza esencialmente diferente y eso parece influir, ya lo hemos dicho, sobre las características de las manchas logradas por uno u otro medio. Es esa similitud, sin embargo, la que ha hecho factible la aplicación de un método post-cromatográfico a la electroforesis en papel, con los resultados que podrán verse más adelante.

El método de determinación de aminoácidos por estimación planimétrica del área de sus manchas en un cromatograma fué dado a conocer por Fisher y colaboradores en 1943 (53), quienes anuncian haber observado que en un cromatograma unidimensional en papel de una serie de diluciones de una mezcla de aminoácidos, el tamaño de la mancha disminuye regularmente con el aumento de la dilución. Citan un ejemplo consistente en la siembra de 5 microlitros de diluciones (factor 2/3) de una mezcla de ácido glutámico, glicocola y alanina 0,062 M de cada uno de ellos. Revelan "de la manera común con anhídrida". Sobre la base de esa observación, ensayan tres maneras diferentes de estimar la cantidad de aminoácido presente, en función del -

tamaño de la mancha correspondiente.

La primera, aplicable solamente a manchas elípticas regulares, es medir la longitud de la mancha en la dirección del flujo del solvente. Hay -dicen los autores- una relación lineal entre la longitud de la mancha y el logaritmo del contenido de aminoácido.

La segunda, de aplicación más general, consiste en delinear de la mancha y medir su área con un planímetro. Gráficamente demuestran que hay una relación lineal entre esa área y el logaritmo de la cantidad de aminoácido presente. Y agregan: "Los datos que se tienen actualmente sugieren que es posible poner de manifiesto una diferencia de 2 % en la cantidad de aminoácido presente, usando los resultados por cuadruplicado."

A fin de compensar los efectos de variaciones en el papel, temperatura, solvente, etc., proponen -desarrollar cromatográficamente las mezclas tipo de aminoácidos junto a las desconocidas. Eso elimina además la necesidad de determinar los parámetros de la línea relacionando el tamaño de la mancha con su contenido (ver § 4,11).

Como complemento de esta técnica y para obtener manchas con una nitidez de borde que no siempre es posible lograr en cromatografía, aconsejan realizar la planimetría sobre copias fotográficas de los cromatogramas hechas con un papel comercial de copias por reflexión (tipo "Copycat").

La tercera manera de estimar aminoácidos en un cromatograma que han ensayado los autores es registrar con un fotomicrometro Hilger una placa negativa --

preparada a partir del cromatograma original, trazar luego la curva de transmisión y comparar los valores de las áreas comprendidas entre la curva y el eje de las abscisas con el contenido de aminoácido, para cada mancha. Afirman que hay una relación lineal entre esa área y la cantidad de aminoácido presente, pero solo para un rango restringido de cantidades de aminoácidos.

En un trabajo complementario del que estamos considerando Fisher y colaboradores (52) comunican estar ensayando un método de evaluación planimétrica en el que solamente es necesario desarrollar cuatro manchas en paralelo. Consiste en correr cantidades s_1 , s_2 , u_1 y u_2 del componente a determinar, donde las s es son conocidas y las u es, desconocidas y donde $\frac{s_1}{s_2} = \frac{u_1}{u_2} = K$.

Si las áreas correspondientes a las manchas en el cromatograma son respectivamente S_1 , S_2 , U_1 y U_2 la relación logarítmica da:

$$\lg \frac{u_1}{s_1} = \frac{(U_1 + U_2) - (S_1 + S_2)}{(U_1 - U_2) + (S_1 - S_2)} \cdot \lg K$$

Prometen dar posteriormente pruebas de la aproximación de un 2 % que permite un cálculo de este tipo.

Block (16, 19a) comunica haber encontrado una relación lineal estricta realizando de 6 a 10 análisis de réplica para cada valor del tipo y del desconocido. Y agrega que se obtienen fácilmente aproximaciones de ± 5 % cuando la mancha tiene bordes netos. El método no puede usarse cuando hay superposición o distorsión de las

manchas.

Fromageot y colaboradores han dado más detalles de una valoración según el método precedente, de varios aminoácidos componentes de una proteína (60) o existentes en un medio de cultivo (59). En conjunto, aquéllos componen aproximadamente la siguiente técnica: sobre el papel (generalmente Whatman nº 1) se depositan, frente a siembras de 5 microlitros del desconocido, iguales volúmenes - de una escala testigo de concentraciones escalonadas como por ejemplo: 0,30; 0,45; 0,60; 0,75; 0,90; 1,05; 1,20; 1,35 y 1,50 gamas/microl. (una alternativa es usar una pipeta capilar -la misma para todos- tal que de una mancha de 5 a 6 mm. de diámetro). Después de llevar a cabo el desarrollo cromatográfico, la hoja se seca a cerca de 100°C. y se rocia con ninhidrina de 0,2 g/100 ml. de butanol anhidro. - El color se consigue calentando a 90-100°C durante 5 minutos. La estimación de las áreas se efectúa en una cámara oscura e iluminada la hoja con luz amarilla, por transparencia, ya delineando con lápiz y midiendo luego las superficies con un planímetro, ya realizando directamente la planimetría sobre el papel así iluminado.

Los autores han comparado el método de Fisher con estimaciones realizadas mediante métodos particulares de cada aminoácido, obteniendo los resultados que reproducimos en la tabla 4,1, correspondientes a la composición de la lisozima. Los números entre paréntesis de la tabla indican la cantidad de ensayos de réplica llevados a cabo con la técnica planimétrica y σ es la desviación standard del término medio (42, 70).

TABLA 4.1 según Fromageot y colaboradores (60).

Aminoácido	Glicocola	Alanina	Treonina	Valina	Isoleucina
Método de Fisher.- (mg de aminoácido x 100mg de <u>li</u> sozima.	5,3 (11) $\sigma=0,13$	6,1 (11) $\sigma=0,70$	5,2 (7) $\sigma=0,31$	7,0 (4) $\sigma=0,45$	6,2 (4) $\sigma=0,12$
Método particular. (id)	5,8	---	5,2	7,0	---

Los autores llegan a la conclusión de que la fidelidad y la precisión del método dependen, por un lado de factores inherentes al método mismo: precisión del volumen de solución depositada y homogeneidad del desarrollo y del revelado, y por otro lado, de la naturaleza de los aminoácidos, algunos de los cuales dan manchas mejor delimitadas que otros.

El método de Fisher ha sido aplicado asimismo a la estimación de potasio en medios biológicos. Beerstecher (10) encuentra que la relación entre el área de las manchas y la concentración es lineal en este caso y propone un método gráfico tal como el que hemos visto pero con un tipo de siembra inspirado en el propuesto por Berry y Cain (12). Ensayó también el cálculo mediante una fórmula que relaciona aquellas variables pero aclara que con ella es más fácil cometer grandes errores.

4,1 Estudio de las operaciones técnicas. El método planimétrico para determinación de aminoácidos mediante la medi

da de sus manchas en el papel se compone de una serie de pasos sucesivos cuyas condiciones es necesario precisar si se busca obtener un método rápido y efectivo y que suministre resultados correctos.

Esos pasos componen en conjunto una técnica cuyos detalles ya hemos dado, aunque desde un punto de vista cualitativo. No haremos ahora más que desarrollar su aspecto cuantitativo.

Ellos son a saber: siembra, revelado, delineado y estimación planimétrica del área de las manchas.

4,11 Siembra. Para una siembra cuantitativa son necesarios todos los requisitos mencionados en § 3,231 y que configuran una técnica que habrá de proveer manchas apropiadas.

Pero además de todo eso, es de importancia capital para una buena evaluación que las manchas posean las siguientes características:

a) Forma regular: toda irregularidad supone, según nuestra experiencia, una posibilidad de error; la mancha de aminoácido parece tener una zona central de mayor densidad de concentración, esto es, mayor concentración por unidad de superficie y una faja, rodeándola, en la que la densidad es mucho menor.

Las irregularidades en la forma hacen que esa faja no tenga un ancho uniforme y se haga más difícil su delimitación. Las manchas a obtener deben ser entonces sensiblemente circulares o elípticas. En ese sentido juega un papel muy importante la fuerza iónica del electrolito en que se efectúa la separación: ya hemos dicho que

a una fuerza iónica creciente corresponde una disminución del tamaño de la mancha (*). Como es lógico, al disminuir su tamaño, la forma de aquélla se hace más regular. Habrá que utilizar en consecuencia una solución reguladora de -- fuerza iónica relativamente alta. Su valor absoluto dependerá del tipo a que pertenezca esa solución.

Otros factores que actúan modificando la forma de la mancha son: la cercanía de los bordes del papel, la distancia recorrida y los aminoácidos acompañantes en la mezcla.

La mayor o menor cercanía de los bordes del papel: una mancha muy cercana al borde sufre por lo general una deformación lateral. Eso puede evitarse ubicando el punto de aplicación suficientemente alejado de aquél: la magnitud de esa distancia dependerá como es natural del tamaño de la mancha a obtener.

La distancia recorrida por el migrante: a medida que esa distancia va aumentando, la forma de la mancha va pasando de circular a elíptica, con el eje mayor en la dirección del movimiento; al mismo tiempo, el borde

(*) Al anotar lo que antecede no hemos podido dejar de asociar la existencia de las dos zonas mencionadas y su comportamiento frente a variaciones en la densidad iónica del medio circundante con la doble capa eléctrica que la teoría interpreta que existe en torno a toda partícula cargada en un medio tal como el que consideramos. Se nos antoja que aquéllas pueden considerarse como una visualización grosera pero ilustrativa, del comportamiento de la doble capa eléctrica ante condiciones variables. Las similitudes no son pocas: el carácter difuso de la zona externa y el más compacto de la interna; la diferente densidad de concentración apreciada en ambas zonas -baja en la externa, mayor en la interna- equivaldría a la diferente densidad de carga que se interpreta (21) que existe en la capa eléctrica externa y que va de un gran valor cerca de la superficie de la partícula hasta cero en un punto situado más externamente; su modo de variar con un aumento de la fuerza iónica del medio; la zona externa se va reduciendo hasta confundirse finalmente con la interna, correspondería a la variación del espesor efectivo de la doble capa, el cual "si se mantiene constante la densidad de carga en la partícula decrecerá con un incremento de la fuerza iónica".

se va haciendo más y más difuso. Por eso, el tiempo de corrida debe ser lo más corto posible y con él la distancia recorrida.

Los aminoácidos acompañantes en la mezcla: la existencia de aminoácidos de velocidades muy cercanas hace que por lo general se deforme una de las manchas vecinas. Así, hemos observado que, efectuando la separación durante un tiempo, relativamente corto, o sembrando cantidades grandes de aspártico y glutámico, las manchas correspondientes a estos aminoácidos aparecen deformadas ya la "cola" del aspártico, más veloz, toma una forma cóncava adaptándose a la convexidad de la mancha de glutámico, ya es ésta la que forma una especie de vaina de la otra. Sin embargo, las manchas no se mezclan; salvo que los bordes sean muy difusos, queda siempre una banda de papel no coloreada entre las dos.

Un efecto análogo, pero en sentido lateral, se produce si los puntos de aplicación de las mezclas son muy cercanos. Lo mismo que la distancia a los bordes del papel, la distancia entre punto y punto de aplicación dependerá de la cantidad de aminoácido depositada.

b) Bordes netos: esto se consigue haciendo que la faja de baja concentración, difusa, se reduzca a un mínimo y con élla los errores posibles, por las razones mencionadas.

Son varios los factores que, combinados permiten obtener manchas de borde neto en el papel: el aumento de la cantidad de aminoácido sembrada, el de la fuerza iónica de la solución reguladora, el de la concentración de la solución de ninhidrina y un tipo de siembra realizado sobre la hoja apoyada solamente en sus extremos.

El primero de esos factores depende fundamentalmente de la solubilidad de la sustancia a valorar. La fuerza iónica, de la concentración y valencia de los iones componentes de la mezcla reguladora; a su vez dependen de ella, a igualdad de las demás condiciones, la intensidad de corriente que ha de pasar por la hoja y los factores molestos que se presentan si la intensidad se eleva demasiado. La concentración de la solución de ninhidrina depende de la solubilidad de la ninhidrina, que es alta o por lo menos, suficiente, en varios de los solventes más comunes. El cuarto factor, combinado con una siembra sobre la hoja húmeda, da manchas excelentes en lo que se refiere a sus bordes.

c) Tamaño relativamente grande: es lógico pensar que al efectuar la medición del área de la mancha, habrá de cometerse un error relativamente mayor si la mancha es más chica. A ese error habrá que sumarle el proveniente de un delineado no muy exacto debido a la difusión en los bordes, que sabemos que aumenta al disminuir el área, si esa disminución proviene de una menor concentración; en cambio, el borde de la mancha no se hace más difuso si su tamaño se reduce por otros medios: mayor fuerza iónica, siembra sin apoyo, etc.

El tamaño aumenta por supuesto con la concentración. También, como decimos más arriba, al sembrar sobre una placa de vidrio. La prueba experimental se muestra en la tabla 3,1 en las que aparecen las áreas (medidas en unidades arbitrarias) correspondientes a cuatro concentraciones de glutámico sembradas de a uno o dos microlitros en el papel ya apoyado sobre una placa de vidrio, ya soste

nido solamente en sus extremos. Según puede verse, en algunos casos, la relación entre las áreas es de casi 1:2.

Sin embargo, para fines cuantitativos resulta mejor realizar la siembra sobre la hoja libre apoyada solamente en sus extremos.

Efectivamente, las manchas obtenidas así tienen un borde más neto y el inconveniente de su menor área se puede salvar aumentando la cantidad de soluto a depositar sobre el papel.

Como detallamos más adelante (§ 4,2) - creemos haber comprobado que efectuando la siembra sobre papel húmedo no apoyado, pueden depositarse cantidades repetidas de solución en un mismo punto y obtener manchas equivalentes a las logradas si se siembra sobre la hoja seca, repetidas veces, pero secando el papel en los intervalos. Esto es decisivo para la aplicación del método que damos a conocer.

También el tipo de papel que se use como soporte en la corrida electroforética, tiene importancia sobre el tamaño de la mancha. Papeles más gruesos dan manchas que ocupan una superficie menor. Han sido especificadas otras características (grado de pureza, propiedades de flujo, fuerza de humectación, absorbabilidad, textura) de importancia en la elección del papel a emplear en técnicas diversas (9a).

En general, en lo que respecta al área de las manchas, es difícil obtener reproductibilidad de sus valores en corridas diferentes. Eso se explica teniendo en cuenta lo numeroso de los factores que intervienen en una

separación electroforética en papel y lo difícil de su fiscalización.

Por eso conviene dejar de lado cualquier intento de comparar áreas obtenidas en diferentes hojas de papel. En cambio, se hace necesario correr paralelamente, esto es, en la misma hoja de papel y por ende en las mismas restantes condiciones, una solución testigo de concentración conocida.

Pero aquel aparente inconveniente trae consigo una ventaja quizá mayor: es la de eliminar la necesidad de una fiscalización rigurosa del volumen depositado de solución, en el sentido de que solo es imprescindible sembrar el mismo volumen -o un múltiplo entero del volumen- de soluciones testigo y problema, aunque se desconozca su valor absoluto.

Pueden entonces depositarse las soluciones de aminoácidos sobre el papel de filtro mediante no más que una pipeta capilar de aforo simple que el mismo operador puede realizar dándole la capacidad requerida (97). La pipeta se enjuaga cada vez con agua y con la solución a cargar. Se ha comprobado que al tercer lavado con agua no quedan en el capilar restos de aminoácidos detectables por la ninhidrina.

Una variación del volumen de solución depositado sobre la hoja no parece modificar sensiblemente el área de la mancha resultante, si la cantidad absoluta sembrada es la misma. La serie de experiencias cuyos resultados damos en la tabla 4,21 lo confirma.

Analizando y sopesando todos los deta-

lles mencionados hemos encontrado como la más adecuada a nuestros fines la técnica de siembra que describimos a continuación: una hoja de papel de filtro Whatman nº 1, de 32 cm. de longitud por 14 cm. de ancho se marca con lapiz, en su línea media transversal, en cinco puntos equidistantes entre sí y de los bordes del papel. Se trazan además las líneas de costumbre que sirven para ubicar los solutos en la hoja y esta en el aparato.

Conviene anotar en cada punto la cantidad y tipo de solución sembrada: todo lo que favorezca la ubicación de los migrantes y sus características, es útil, sobre todo si se tiene en cuenta el complicado manipuleo a que hay que someter la hoja de papel.

Una vez marcada, la hoja se sumerge en la solución reguladora que hará de electrolito y luego se seca parcialmente, o mejor dicho, se priva de un exceso de humedad colocándola entre dos hojas de papel de filtro común, durante un momento. Después se la ubica colgando libre en el aire, entre dos soportes y se depositan en ella los tipos y cantidades de soluciones necesarios. Se lleva luego al aparato electroforético donde se la deja, con sus extremos sumergidos en el electrolito, unos 15 minutos antes de hacer pasar la corriente.

4,12 Revelado. Son varios los factores importantes en el revelado de manchas que sirvan para una determinación planimétrica: secado previo de la hoja de papel de filtro (electrograma); concentración de aminoácidos y de ninhidrina; manera de poner ambos en contacto, secado final de la hoja de papel de filtro.

Secado previo: finalizada la separación

el método más sencillo para dejar secar la hoja es dejarla al aire el tiempo suficiente que por lo general es de varias horas. Ese tiempo puede reducirse, ya haciendo circular aire fresco mediante un ventilador, ya aumentando la temperatura, ya combinando ambos factores. Fowden y Penney (57) trabajando con cromatogramas en papel obtuvieron a 75 y 100°C recuperaciones de 86 y 74 % de los aminoácidos depositados. En cambio las pérdidas fueron despreciables secando a temperaturas menores de 50°C, hecho comprobado también por Novellie (122) y Brush y colaboradores (22). Estos últimos encontraron que hay pérdidas a 60, 85 y 110°C y que la temperatura óptima para el secado de cromatogramas con fenol como solvente es de 27°C.

En consecuencia, es conveniente no aumentar la temperatura mientras se tema causar una descomposición estimable de los áulutos. Por eso, y en primera instancia, nos limitaremos a acelerar el secado mediante un ventilador, con lo que la operación dura de 15 a 30 minutos aproximadamente, según la temperatura ambiente.

Respecto a la concentración de aminoácidos necesaria para evaluarlos en el papel, repetiremos - que dan color neto con la ninhidrina, después de separadas electroforéticamente, hasta 3 gamas de aminoácido.

Las manchas así obtenidas padecen del defecto, grave para fines cuantitativos, de su escaso tamaño y de la difusión de sus bordes. Resulta pues necesario trabajar con concentraciones más altas. Un tipo de escala de concentraciones útil para una determinación planimétrica nos parece la que sigue: 0,05; 0,075; 0,10 y 0,15 molar,

que corresponden a las siguientes concentraciones expresadas en gramos de ácido glutámico por litro: 7,36; 11,04; - 14,71 y 22,07, respectivamente. Esta serie tiene la ventaja de presentar relaciones simples entre sus molaridades, permitiendo por ello la aplicación de la fórmula propugnada por Fisher y colaboradores (52) si consideramos dos de esos valores como testigos y dos como desconocidos.

Sin embargo, la siembra de un microlitro de esas soluciones en cada punto de una hoja apoyada sobre una placa de vidrio, no suministra manchas suficientemente netas y grandes para una planimetría. Por los motivos mencionados en § 4,11 nos parece más conveniente sembrar una mayor cantidad sobre la hoja sin apoyar. Se consigue de ese modo aumentar el tamaño de la mancha y la nitidez de sus bordes. Así, en una de las series de experiencias realizadas para poner a punto el método utilizamos la siguiente escala de diluciones de ácido glutámico: 12,21; 14,43; 16,65; 18,87; 21,09 y 22,20 g/1000ml. Sembrábamos por lo menos tres microlitros de esas soluciones sobre una hoja no apoyada.

La concentración de la solución de ninhidrina debe ser suficiente para la obtención de manchas netas. A pesar de que en la literatura se propugna, para ensayos cuantitativos, el uso de concentraciones mayores, hemos encontrado como valor adecuado para nuestros fines - el de 0,1 g. de ninhidrina en 100 ml. de acetona. Tentativas realizadas con mayores concentraciones no han mostrado mayor utilidad que justifique el reemplazo. Es que el color más o menos intenso, dentro de ciertos límites, que --

pueda dar una diferente cantidad de ninhidrina al ser puesta en contacto con el aminoácido tiene que causar una diferencia en el resultado final bastante menor que los errores que en escala más amplia se cometen forzosamente en otras etapas de la técnica, como por ejemplo, el delineado.

Sin embargo, por debajo del valor mencionado se notan en mayor grado efectos disturbantes, por lo que lo consideramos el límite inferior para la obtención de resultados satisfactorios.

No nos parece necesario purificar previamente la ninhidrina por las razones que dimos más arriba.

Por otra parte, no hay que olvidar que, de acuerdo a lo dicho en § 4, si vamos a correr paralelamente, esto es, en la misma hoja, testigos y desconocidos y que las condiciones del revelado han de ser entonces parejas para todos.

No hay mayor discusión en cuanto a la ventaja de bañar los electrogramas con la solución reveladora y no rociarlos con ella. Es evidente que se gana así en homogeneidad y esto es importante puesto que el resultado saldrá de la comparación de las manchas obtenidas. Aunque a primera vista parezca lo contrario, el consumo de reactivos no es mayor. Para bañar una hoja de papel de 200 cm², se necesitan no más de 4 ml. de solución de ninhidrina.

La reacción entre ésta y los aminoácidos en el papel se produce en frío, de modo que la técnica más sencilla y de menor riesgo para un método cuantitativo

ha de ser dejar la hoja en la oscuridad durante el tiempo necesario para que las manchas adquieran la máxima intensidad de color. Aquél, según dijimos ya, depende de la temperatura. Dejando la hoja de papel bañada con ninhidrina a una temperatura ambiente de 10 a 15°C el punto de máxima intensidad se produce a las 18 horas aproximadamente. A 25°C el lapso se reduce a unas 10 horas más o menos. A 37° se consiguen manchas muy intensas al cabo de 4 ó 5 horas. A 90°C hay pleno color después de 5 minutos. Pero ya dijimos que se ha comprobado que el calentamiento ocasiona una destrucción parcial del aminoácido. Limitémonos entonces al uso de la operación que engendra menos peligros: el revelado a temperatura ambiente. Con ella hemos obtenido los resultados satisfactorios que más adelante damos a conocer.

Resumiendo, la técnica que hemos adoptado en lo que se refiere al revelado comprende el uso de una solución de ninhidrina al 0,1 g/100 ml. en acetona; -- con esa solución se baña el electrograma, el cual luego se deja durante 18 horas en la oscuridad. Al cabo de dicho lapso se procede al delineado de las manchas resultantes. Esa operación se describe a continuación.

4,13 Delineado. Ya hemos anotado que no consiste más que en marcar con lápiz el borde las manchas puestas de manifiesto mediante el revelado. Sin embargo, en lo que se refiere a fines cuantitativos es una fase delicada de la determinación y es en ella donde a nuestro juicio se cometen los errores de mayor magnitud. Estos pueden aminorarse en mucho aplicando una técnica convencional de delineado aconsejada por la práctica y que se logra fácilmente con alguna experiencia.

Como es lógico, el aminoácido ocupa después de la separación en el papel un área bastante mayor que la que abarcaba al ser sembrado. Al difundirse, los bordes de la mancha, bien netos al principio, van perdiendo gradualmente esa cualidad. La mancha revelada de un aminoácido presenta, ya lo hemos dicho, una zona central de gran intensidad de color y una faja que la rodea en que el color es más tenue. Nuestra experiencia indica que en la mayoría de los casos la zona interna adopta formas mucho más regulares que la faja adyacente. Es en ésta, en cambio donde aparecen irregularidades debidas a arrastre, difusión, etc. Parece correcto pensar entonces que una estimación del área de la mancha deba dejar de lado todas esas variantes eventuales y considerar en cambio como área efectiva de la mancha la ocupada por la zona central más intensa. La experiencia no ha hecho más que confirmar esa suposición. También la experiencia nos indica que es en la zona de color intenso donde está ubicada la mayor parte de la masa del migrante. En la faja externa en cambio, la cantidad de aminoácido parece ser muy baja, ocupando a pesar de ello una gran superficie. Otra razón más para no tenerla en cuenta al hacer la planimetría.

Para conseguir una mejor visualización de las dos zonas mencionadas es conveniente colocar la hoja a delinear sobre una placa de vidrio despulido tras de la cual se ubica una fuente luminosa intensa y trabajar en un cuarto oscuro. Observando cuidadosamente la mancha se llega a distinguir una línea imaginaria de separación que se marca con un lápiz de punta fina. La figura resultante

debe adoptar una forma circular o elíptica, lo más regular posible: adaptarse a las aparentes irregularidades de la mancha es fuente de graves errores. Es fácil, entonces, con alguna experiencia, lograr delineados reproducibles.

4,14 Medición planimétrica. La última etapa de la técnica de evaluación que consideramos consiste en la estimación de las áreas de las manchas producto de la electroforesis en papel, mediante el planímetro.

Son conocidos el mecanismo y las bases teóricas del funcionamiento de ese aparato. La fase técnica no consiste en otra cosa que fijar la parte correspondiente del aparato en un punto externo a las manchas, luego marcar con lápiz en el borde ya delineado, el punto de partida y llegada del extremo móvil del planímetro y finalmente recorrer, en el sentido de las agujas del reloj, la circunferencia que rodea a la mancha, el número de veces - que sea necesario para obtener valores similares (planimetría indirecta). No es necesario ajustar el planímetro para que dé valores en centímetros cuadrados: como solamente hemos de comparar las áreas obtenidas, sus magnitudes - pueden expresarse en unidades arbitrarias.

Un sistema que da resultados aceptables a nuestro juicio es dar cinco vueltas a la mancha con el planímetro para cada estimación; sacando el promedio, repitiendo tres veces la operación y promediando nuevamente es como hemos logrado, salvo indicación en contrario, los datos que aparecen en las tablas.

Una de las variantes que hemos intentado sobre la técnica tal como se acaba de describir, es lle

var a cabo la planimetría sobre la mancha sin delinear (planimetría directa). Pensábamos con ello eliminar ese error fijo y definitivo que puede cometerse al medir el área de una mancha delineada imperfectamente. Sin embargo, los resultados muestran que la planimetría directa da, para una misma superficie, valores muy desparejos, por lo que no resulta conveniente. Ante el problema de no poder repetir al cabo de un tiempo esas determinaciones directas (puesto que el color provisto por la reacción con la ninhidrina es efímero) se sacaron copias fotográficas de algunos electrogramas. También buscábamos con eso corroborar lo afirmado por Fisher y colaboradores (53) de que los bordes de las manchas pueden hacerse más netos sacando copia fotográfica en un papel adecuado. A pesar de que se obtuvieron de manera bastante diferente, nuestros resultados confirmaron que hay cierta ventaja en su uso, aparte de que es posible conservar así las manchas sin delinear para la estimación repetida de sus áreas.

4,2 Parte experimental.

Veamos ahora la parte experimental de la que son fruto muchas de las consideraciones que anteceden. Si bien algunas de las experiencias mencionadas han suministrado resultados dispares, presentan interés en cuanto al aporte que significan para la caracterización y afinado de la técnica definitiva.

Las iremos tratando en el orden en que aparecen sus representaciones en los gráficos 4,1 a 4,9 y tomando en cuenta al mismo tiempo sus resultados que pueden verse en la tabla 4,2.

TABLA 4,2
Area de una escala de concentraciones de ácido glutámico según diferentes tipos de planimetría.

Experiencia n°	Tipo de planimetría	AREA DE LA MANCHA				0,15 M
		0,05 M	0,075 M	0,010 M	0,010 M	
98	I.E.	13,00	18,13	19,63	22,00	
99	"	12,38	15,25	15,63	19,00	
100	"	23,13	27,64	26,38	30,25	
101	"	19,88	26,13	28,25	28,38	
102	"	20,50	24,63	26,63	30,63	
103	"	18,13	24,13	23,13	26,63	
104	"	11,63	16,88	17,75	18,13	
105	"	10,40	13,80	16,70	19,90	
106	"	17,60	22,10	23,10	24,10	
107	"	19,80	21,80	23,00	27,40	
108	"	20,33	24,73	26,73	34,27	
108 (F.C.)	D.E.	10,92	14,88	17,92	21,96	
109	I.E.	23,20	27,40	31,33	35,73	
109 (F.C.)	D.E.	13,00	18,16	21,52	24,72	
110	I.E.	19,27	22,93	23,67	30,93	
110 (F.C.)	D.E.	15,68	18,76	21,48	26,44	
2 seg.						
110 (F.C.)	D.E.	12,73	15,60	17,87	21,00	
3 seg.						
111	I.E.	16,73	18,60	21,67	26,27	
111	I.I.	10,00	10,20	15,00	15,93	

Experiencia n°	Tipo de planimetría	AREA DE LA MANCHA			
		0,05 M	0,075 M	0,10 M	0,15 M
112	I.E.	28,67	31,00	34,73	42,93
112	I.I.	15,93	21,20	23,13	29,47
112	D.E.	26,13	32,00	33,53	44,00
112	D.I.	13,47	20,13	21,00	25,27
113	I.E.	32,13	37,80	43,10	58,60
113	I.I.	20,27	24,20	28,10	36,47
113	D.E.	28,88	34,72	38,80	55,28
113	D.I.	17,48	19,32	25,48	32,92
114	I.E.	24,43	33,20	39,67	43,07
115	I.E.	11,27	12,47	16,73	18,07
115	I.I.	6,27	7,67	11,27	12,00
116	I.E.	16,07	21,73	22,60	26,73
116	I.I.	8,07	12,40	15,60	17,73
117	I.E.	19,20	26,27	34,13	43,00
117	I.I.	10,27	17,87	23,60	28,27
118	I.E.	25,80	30,07	33,93	38,67
118	I.I.	34,40	36,73	41,27	51,87

I.E. = Planimetría indirecta externa (ver texto).

I.I. = Planimetría indirecta interna.

D.E. = Planimetría directa externa.

D.I. = Planimetría directa interna.

F.C. = Fotocopia.

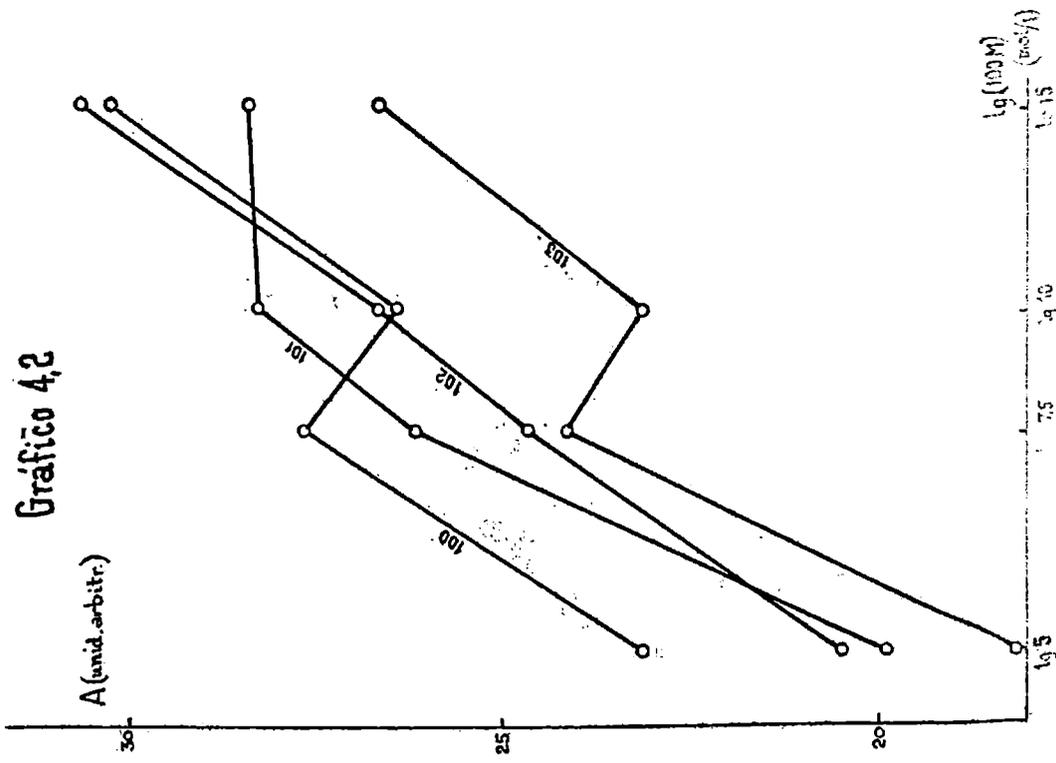
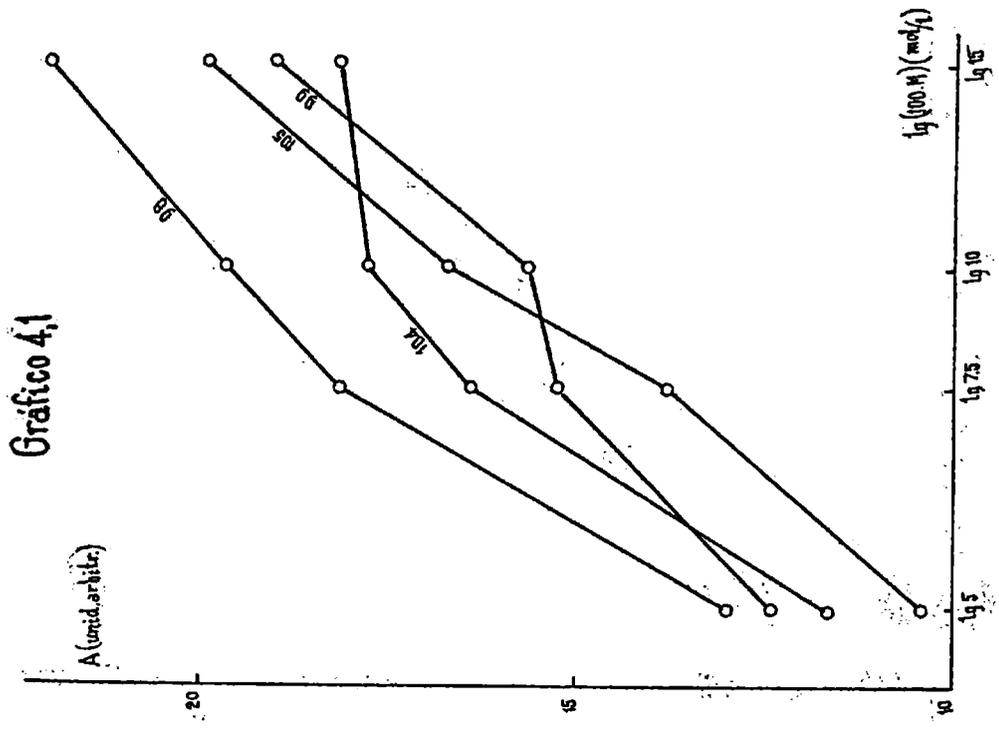
2 seg. = tiempo de exposición.

Las experiencias se realizaron en la siguiente forma: en una faja de 32 por 10 cm. de papel de filtro Whatman nº 1 apoyada sobre una placa de vidrio se depositó, en cada uno de cuatro puntos marcados, un microlitro de una mezcla de ácidos glutámico y aspártico de cada una de las siguientes molaridades: 0,05; 0,075; 0,10 y 0,15.

La separación se efectuó en un electrolito de ácido acético-acetato de sodio de pH 4,55 y fuerza iónica 0,050; la diferencia de potencial aplicada fué de -450 voltios de promedio (experiencias 100 a 103 y 106 a 110)

Algunos ensayos difirieron levemente: uno se efectuó a pH 4,35 (experiencia 98); otro, a 700 voltios (exp. 99) y dos, con agregado de cloruro de sodio al electrolito (exp. 104 y 105). Las corridas duraron dos horas, al cabo de las cuales se bañó la hoja con una solución de 0,1 g. de ninhidrina en 100 ml. de etanol de 95 %. Luego se la dejó a temperatura ambiente durante 18 horas, al cabo de las cuales se delinearon las manchas con lápiz sobre una fuente luminosa. Una vez realizada la planimetría las manchas resultaron tener las áreas que, expresadas en unidades arbitrarias, se ven en la tabla

Las representaciones gráficas de esos valores en un sistema de coordenadas en que las abscisas son el logaritmo de las concentraciones expresadas en molaridad y las ordenadas las áreas, en unidades arbitrarias, dan curvas de formas variables que se apartan de la recta que era lo esperado de acuerdo con la literatura citada. En efecto, del total de trece experiencias (gráfico 4,1; 4,2 y 4,3) y salvo dos o tres que dieron relación lineal entre -



las variables, las demás difieren más o menos de esa relación: algunas con tres puntos en línea y el cuarto más o menos alejado y otras con sus puntos alineados en forma de S de mayor o menor curvatura.

La aplicación de la fórmula propugnada por Fisher y colaboradores (52) a los mismos resultados no proporciona mejores aproximaciones que el método gráfico.

Por si estas diferencias fueran debidas a poca nitidez del borde o escasa área de las manchas ensayó, en primer lugar, revelar con ninhidrina en solución más concentrada un electrograma obtenido en condiciones análogas (exp. 111, cuya curva se incluye también en el gráfico 4,3). La tentativa no dió resultados más satisfactorios que los precedentes.

En las experiencias 112, y 113 se trató de lograr manchas más grandes depositando el doble de la cantidad de solución de aminoácidos usada hasta entonces. La siembra consistió en depositar dos veces en cada punto un microlitro de las soluciones mencionadas. La mayor cantidad de solutos aplicada hizo necesario extender el tiempo de corrida a tres horas para conseguir una buena resolución. Las demás condiciones fueron idénticas. Análoga fué la experiencia 114, salvo que el reactivo revelador tenía una concentración de 0,2 g. de ninhidrina en 100 ml. de etanol.

Como también los resultados de estos ensayos (gráfico 4,4) se alejan de la recta esperada y con el objeto de descartar errores de estimación del área ocasionados por la manera de delinear la manchas, se procedió a

Gráfico 4.3

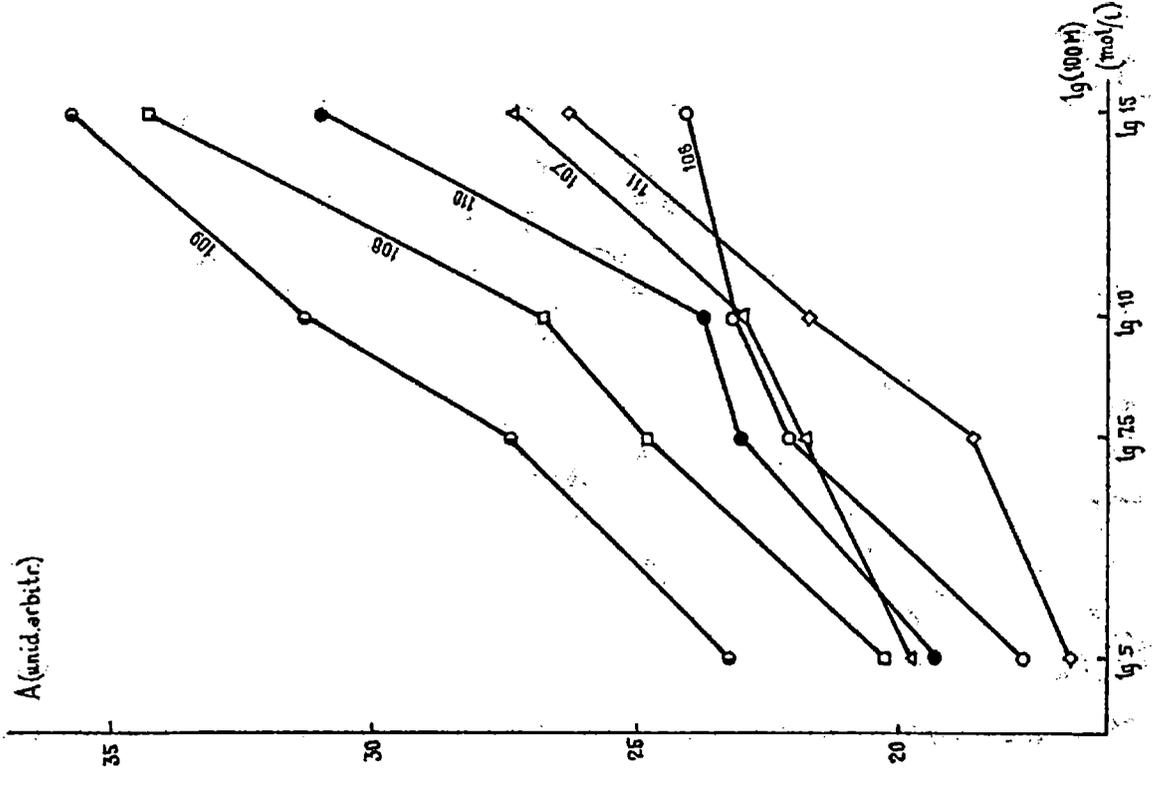
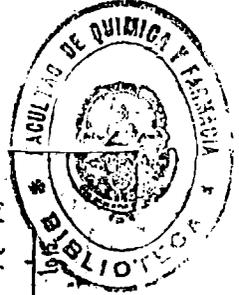
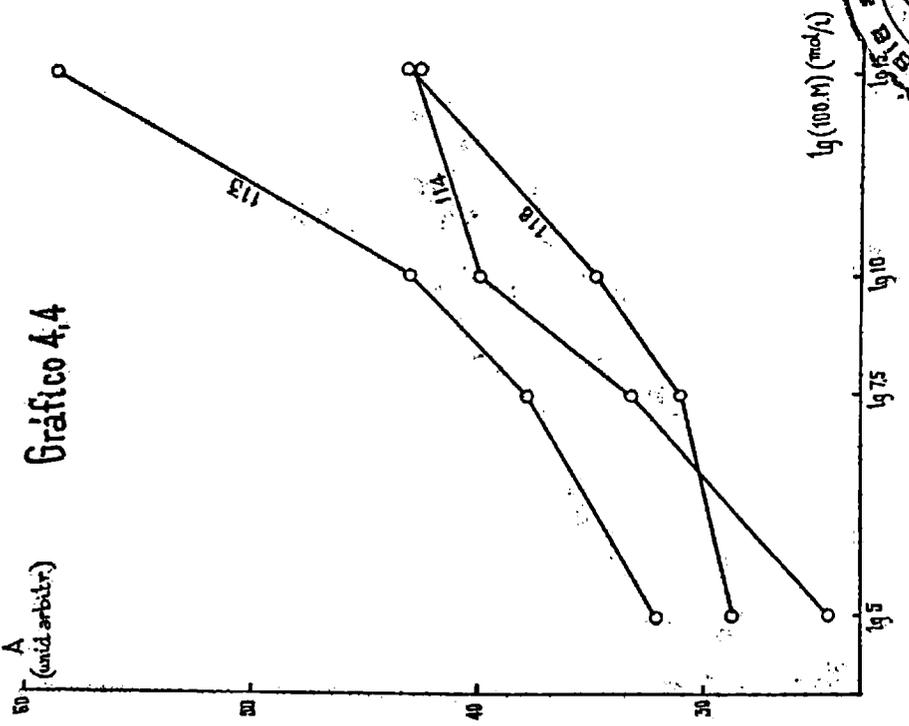


Gráfico 4.4



estudiar otros tipos de planimetría aplicados a estos mismos ensayos.

Llamaremos indirecta a la planimetría que hemos venido mencionando y que, como hemos dicho incluye el delineado previo de las manchas realizado colocando la hoja que las lleva sobre una placa de vidrio tras la cual se ubica una fuente luminosa. En este caso la planimetría no consiste en otra cosa que seguir la línea marcada previamente con lápiz. Esta línea puede denotar el borde de la zona de mayor intensidad de color y entonces da lugar a lo que llamamos planimetría indirecta interna o bien el de la faja menos coloreada, es decir, el borde externo de la manchas y entonces la planimetría es indirecta externa.

El otro procedimiento empleado es el que llamaremos planimetría directa, que consiste en recorrer el borde la mancha sin delinear con la punto móvil del planímetro. Eso puede hacerse sobre el papel iluminado por transparencia y en ese caso existe la posibilidad de llevar a cabo también una planimetría interna o externa, según se considere el borde de la zona más densa o el de la faja que la rodea.

Una variante de esta planimetría directa consistió en realizarla sobre copias en papel fotográfico del electrograma. Para obtenerlas hemos impresionado el papel colocándolo sobre la hoja de papel de filtro ubicada como en los casos anteriores; el tiempo de exposición y las condiciones del revelado fotográfico se determinan empíricamente con unos pocos ensayos. El papel impresiona

Gráfico 4,5
Experiencia 112

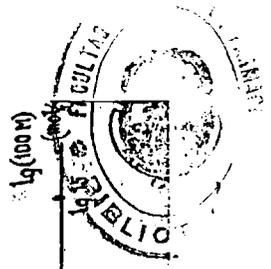
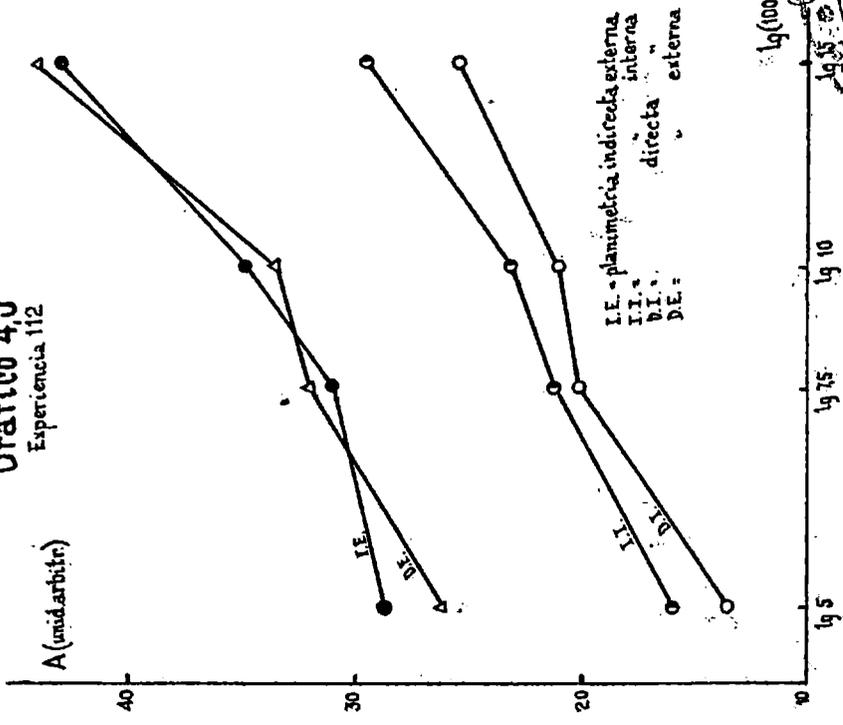
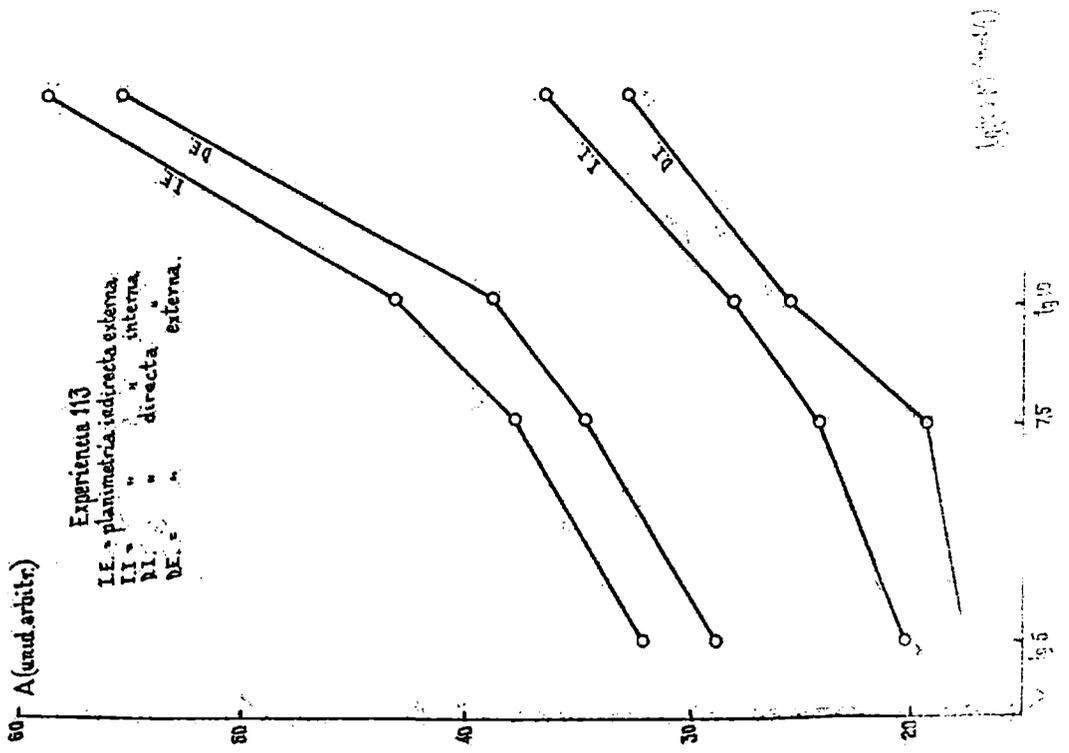


Gráfico 4,6

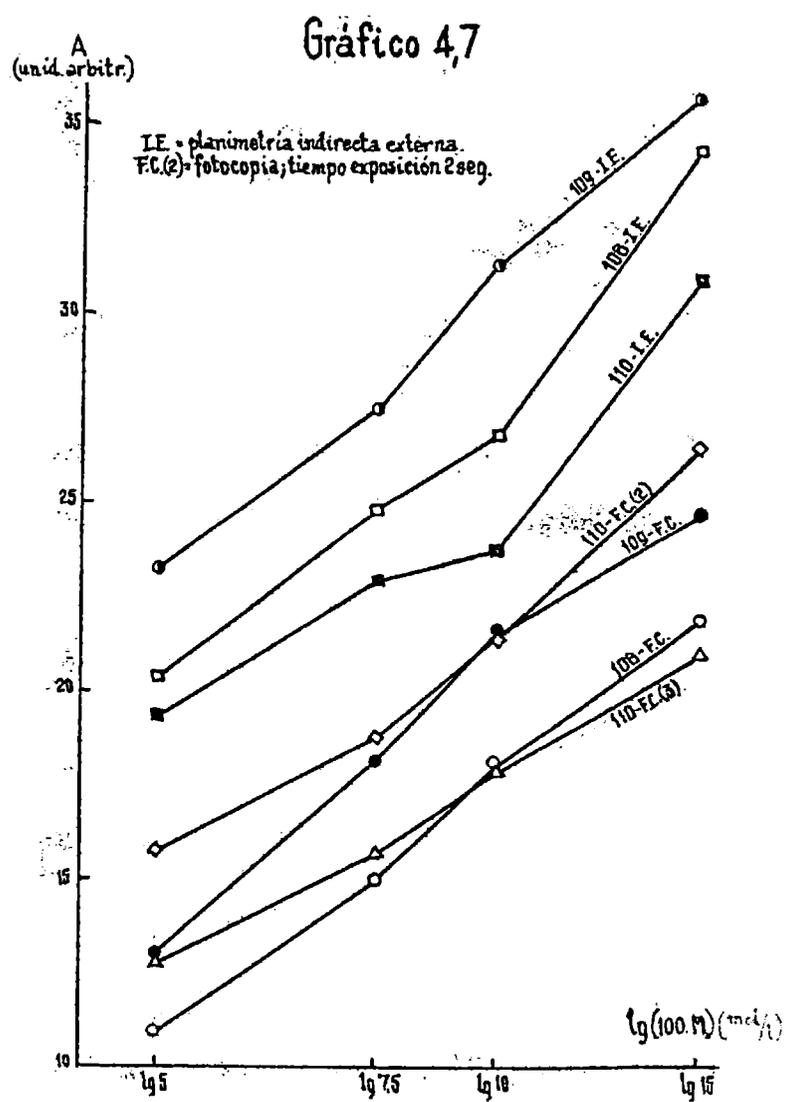


do presenta a los solutos como manchas blancas sobre fondo negro. En este caso resulta un poco difícil determinar la línea imaginaria entre las dos zonas por lo que nuestras estimaciones se reducen al área externa de la manchas. Los requisitos más importantes que debe reunir una fotocopia del tipo mencionado son que el área de las manchas no sea demasiado chica y que el borde sea neto. Ambos factores - se fiscalizan en parte variando el ennegrecimiento del fondo, esto es, el tiempo de exposición y la intensidad de la fuente luminosa.

El análisis de las manchas provistas - por los ensayos 112, y 113 en diferentes formas de planimetría (gráficos 4,5 y 4,6) no permite decidir por el momento cual de éstas es la más ventajosa, ya que con todas ellas se obtienen curvas que aparentemente pertenecen a la misma familia pero cuyos puntos no están en línea recta. Sin embargo, una ventaja manifiesta de la planimetría indirecta que nos indujo a adoptarla es que permite fijar el borde de las áreas en forma permanente, ya que la coloración obtenida con la ninhidrina desaparece muy pronto.

En cuanto a las medidas planimétricas sobre fotocopias, comparadas en el gráfico 4,7 con las efectuadas sin ese artificio, muestran una mayor aproximación a una función lineal. Esta observación coincide con la ya mencionada afirmación de Fisher y colaboradores de que el borde de las manchas aparece más neto, lo que permite efectuar estimaciones más exactas.

Sin embargo, esta ventaja no nos parece de suficiente magnitud como para compensar la complica-



ción técnica que significa, por lo cual no la hemos continuado aplicando.

Hemos ensayado en cambio otras modificaciones en la técnica que se detallan a continuación.

Un ensayo fué modificar la técnica de siembra, no depositando la mezcla a separar sobre la hoja de papel de filtro apoyada sobre una placa de vidrio sino manteniéndola suspendida en el aire mediante el ajuste de sus extremos a un soporte.

Ese artificio permite, como hemos dicho ya, depositar una cantidad mucho mayor de aminoácidos sin que éste ocupe por eso una superficie más amplia. La alta concentración hace que el delineado sea más fácil de efectuar debido a una mayor densidad de color y nitidez - de los bordes, porque al sembrar sobre el papel sin apoyar y a pesar de la difusión natural en toda corrida electroforética, que está estrechamente ligada a la fuerza iónica - del electrolito, se evita la difusión "in situ", en el momento de positar la mezcla.

Con esta variante en la técnica se efectuaron las experiencias posteriores.

La primera de ellas (exp. 115) es análoga a todas las anteriores salvo que se sembró de la manera citada. El área de las manchas que se obtienen así es muy pequeña.

Ensayos efectuados con mayores cantidades, algunos de cuyos resultados representamos en los gráficos 4,8 y 4,9, fueron efectuados sembrando dos y tres microlitros en cada punto y sus áreas delineadas fueron medi-

Gráfico 4.8

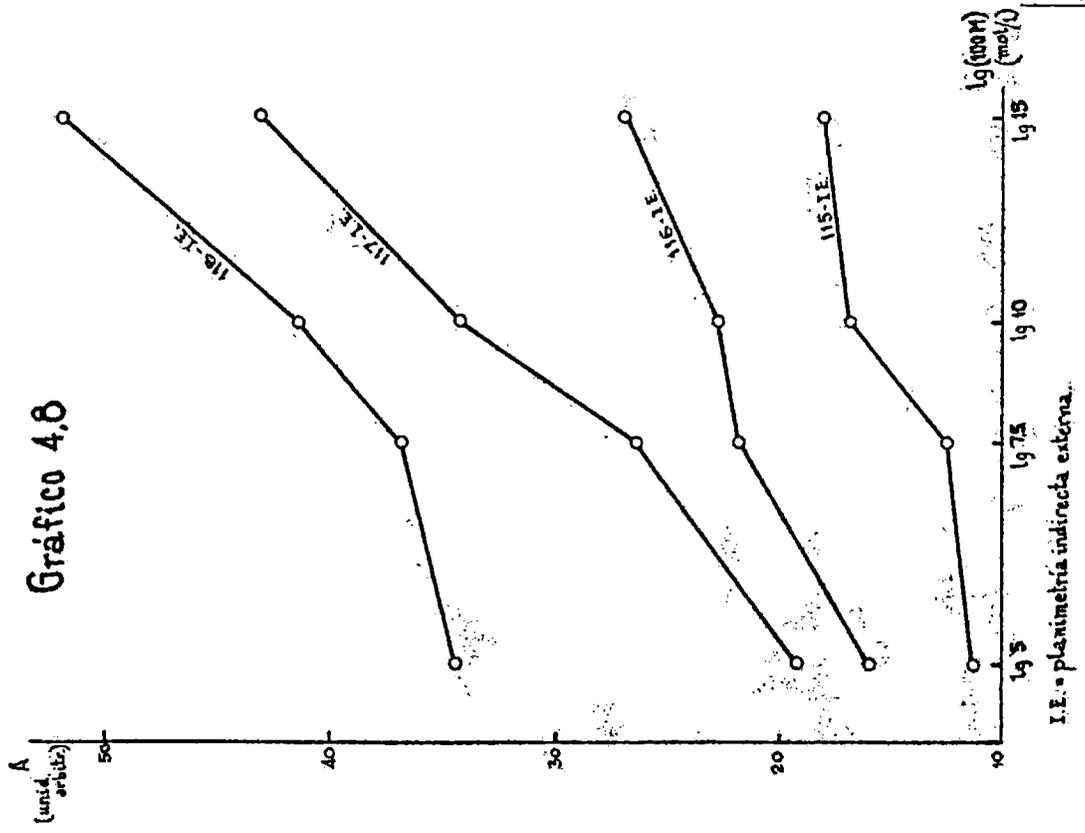
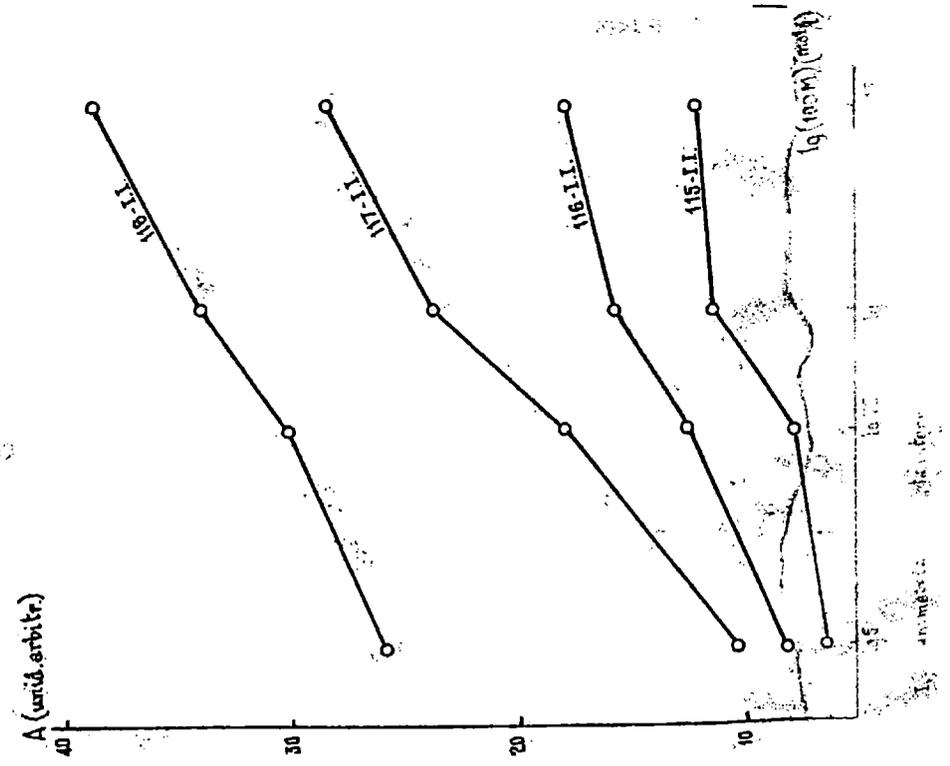


Gráfico 4.9



das por sus bordes externo e interno. De estas curvas podemos deducir que por el aumento de la cantidad de aminoácido depositada se consigue una gradual aproximación a la relación lineal, hecho atribuible a que la técnica de siembra ha permitido hacer mayor el área de la mancha conservando los bordes nítidos.

Con los dos gráficos precedentes podemos apreciar también que el tipo de delineado interno provee de una mayor uniformidad en los resultados que el externo. En éste, además de la posibilidad de cometer un error de lectura ocasionado por la irregularidad de los bordes, es fácil otorgar a la mancha un área superior a la que realmente tiene, dado que es el borde de la faja externa el que presenta los conocidos efectos de arrastre ("trailing") y difusión. El arrastre es más intenso a las mayores concentraciones como puede comprobarse empíricamente. Es entonces en la mancha más grande donde es fácil cometer un error por exceso atribuyendo a la mancha un área que no tiene.

Habiendo llegado a este punto de nuestra búsqueda es necesario hacer algunas consideraciones sobre el método ensayado.

La cantidad de ensayos realizada, variando condiciones de corrida y formas de interpretación, sin lograr más que en limitadas ocasiones un resultado más o menos efectivo y mediante sistemas diferentes hace que nos parezca muy difícil encontrar un artificio que permita mayor constancia en los resultados por lo que consideramos este punto como el límite técnico alcanzado, el que, sin embargo, dista de ser satisfactorio.

Tampoco tuvieron éxito los ensayos llevados a cabo en el sentido de encontrar una fórmula común que diera la ubicación de cualquier punto de una escala de concentraciones de un electrograma en función de otros dos, cualquiera fuera la relación existente entre área y concentración. Aceptamos por ello la vigencia de una relación logarítmica entre esas dos variables, similar a la que se ha encontrado que existe en cromatografía en papel.

Los inconvenientes, ya anotados, de una estimación gráfica del tipo ensayado, nos llevaron a buscar una solución de tipo analítico.

En efecto, si aceptamos la relación logarítmica mencionada y consideramos la curva representativa de esa relación, podemos llegar a reemplazar, siquiera aproximadamente, un trozo de esa curva por una recta, si los puntos que la determinan están suficientemente cercanos. Si experimentalmente determinamos esos dos puntos y el valor en una de las coordenadas (área) de un tercero intermedio a las de los otros dos, podremos conocer, gracias a la suposición mencionada, el valor correspondiente a este último punto sobre la segunda coordenada (concentración).

Esto que parece de una escasa aproximación, puede valer si tomamos puntos de referencia lo más cercanos posible, si tenemos en cuenta la escasa curvatura de la línea que representa la relación existente entre área y concentración y los errores comparativamente más grandes que se cometen ineludiblemente en el proceso preparativo de la hoja de papel ya planimetrada.

Los que hicimos en la práctica fué con

probar la validez de ese razonamiento en una disposición en cierto modo inversa, de las cosas; porque tomamos como mancha testigo, proveniente de una solución de aminoácido de concentración conocida, a la intermedia. Las otras dos, de áreas lo más cercanas posible a la de la anterior pero una más grande y otra más chica, debían provenir de la solución de concentración desconocida.

En resumen, la siembra se circunscribía así a tres puntos: a_1 , a_2 y b ; en solo uno de ellos conocíamos la cantidad de aminoácido depositada: C_b , pero la relación que ligaba sus concentraciones era $C_{a_1} < C_b < C_{a_2}$.

Una disposición tal exigía la preparación de dos soluciones del desconocido, si se quería depositar el mismo volumen de líquido en cada punto del papel. Para evitar eso, parecía útil llegar a comprobar si la siembra de volúmenes diferentes podía modificar de por sí el tamaño de la mancha resultante, aparte de la variación causada por la diferente concentración. En cromatografía en papel y en general en las técnicas de sembrado sobre el papel seco, está comprobado que el volumen de solución depositada no tiene acción sobre el área de la mancha final si se tiene la precaución de sembrar en pequeñas porciones y secando el papel en los intervalos. Pero la técnica adoptada por nosotros trabaja con el papel húmedo y no podemos valernos del artificio mencionado.

Había entonces que ensayar experimentalmente aquella influencia. Eso se efectuó en los ensayos 118 a 124 y 129 a 134.

Las condiciones experimentales fueron

análogas a las de ensayos anteriores, lo mismo que el papel y el método de trabajo. La siembra se hizo en tres puntos, depositando en ellos con una pipeta de capacidad aproximadamente igual a 3 microlitros: 9 microlitros de solución de ácido glutámico 0,05 M; 6 microlitros de 0,075 M y 3 microlitros de 0,15 M. Es decir, estimábamos la influencia del volumen de solución depositado, colocando cantidades diferentes de soluciones de concentraciones también diferentes pero equivalentes a la misma cantidad absoluta de aminoácido: -- 22,07 gamas.

TABLA 4,21

Areas correspondientes a 22,07 gamas de ácido glutámico depositadas: A) en tres concentraciones diferentes y B) en tres concentraciones iguales, separadas en iguales condiciones.

A				B			
Exp. nº	AREA (ū arbitrarias)			Exp. nº	AREA (ū arbitrarias)		
	9 mic. 0,05 M	6 mic. 0,075M	3 mic. 0,15 M		3 microlitros de 0,15M		
119	30,87	29,80	31,07	129	38,33	38,87	41,00
120	29,80	32,00	30,40	130	35,13	35,60	31,53
121	28,47	28,73	28,87	131	28,80	28,93	29,53
122	26,27	25,63	28,13	132	32,53	30,60	31,80
123	31,27	31,47	32,07	133	34,13	33,87	35,80
124	29,27	29,87	30,80	134	36,33	34,07	35,13

La tabla 4,21 con los valores obtenidos expresados en unidades arbitrarias de superficie; demuestra que las diferencias entre ellos (A), son del mismo orden que

las que existen entre los obtenidos sembrando por igual 3 microlitros de glutámico 0,15 M (22,07 gamas/microl.) en cada punto. En consecuencia, el área de las manchas resultantes no depende en la técnica húmeda de siembra y dentro de los límites ensayados, del volumen de solución sino de la cantidad absoluta de aminoácido depositada.

Mediante esta comprobación fué posible llegar a efectuar las primeras evaluaciones de ácido glutámico que, partiendo de una siembra sencilla, dieron resultados bastante aproximados.

La serie de experiencias 122 a 123 constituyen el ensayo experimental de ese criterio. En ella se separó el glutámico por electroforesis en las condiciones de costumbre. La hoja de papel de filtro se marcó en 5 puntos separados de los bordes y entre sí por una distancia de 2,3 cm. En ellos se depositaron diferentes soluciones de clorhidrato de ácido glutámico (*) en la cantidad y concentración que se indica a continuación: punto 1, (a): 9 microlitros de solución 0,05 M (7,36 g/l); punto 2, (b): 6 microlitros de 0,075 M (11,04 g/l); punto 3 (c): 3 microlitros 0,15 M (22,07 g/l); estas tres hacen de testigo; punto 4: 3 microlitros de solución de glutámico 0,10 M (14,71 g/l); punto 5: 6 microlitros de la misma solución que suponemos desconocida y cuya concentración (14,71 g/l) intentamos confirmar.

La siembra se realizó con una única pipeta capilar aforada a 3 microlitros y por la técnica húmeda

(*) Monoclorhidrato de ácido glutámico Pfanstiehl, P.F. 202 - 204°C.; Amino-nitrógeno 7,36 %; Humedad 0,15 %; Cenizas 0,2 %.

da, sin apoyo. Las manchas puestas de manifiesto mediante una solución acetónica de ninhidrina de 0,1 g/100 ml., se delinearón en la forma indirecta-interna descrita antes. - La planimetría consistió en dar por 3 veces 5 vueltas al perímetro de cada manchas y promediar.

El cálculo de la concentración de la solución supuesta desconocida se realizó mediante la fórmula:

$$C = \frac{P}{2A} \left(\frac{A_1}{U_1} + \frac{A_2}{U_2} \right)$$

donde: P = masa de aminoácido testigo sembrada (gammas)

A = área de la manchas testigo de aminoácido (unidades arbitrarias).

A_1 = Área de la mancha menor del desconocido (unidades arbitrarias).

A_2 = Area de la mancha mayor del desconocido (unidades arbitrarias).

U_1 = Volumen de solución sembrada para obtener A_1 (microlitros).

U_2 = Volumen de solución sembra para obtener A_2 (microlitros).

Los resultados se obtienen en gammas/microlitros o, lo que es lo mismo, g/l de glutámico y son los que se ven en la tabla 4,22.-

TABLA 4,22

Exper. n°	A _a	A _b	A _c	A _m	A ₁	A ₂	C _a	C _b	C _c	C _m
122	26,27	25,07	28,13	26,42	23,47	34,00	17,00	17,81	15,87	16,89
123	31,27	31,47	32,07	31,60	24,00	35,13	14,68	14,55	14,30	14,51
124	29,27	29,87	30,80	29,98	22,40	38,13	15,63	15,32	14,86	15,27
125	37,73	40,33	35,73	37,93	24,60	41,53	13,26	12,49	14,02	13,26
126	29,47	30,00	31,60	30,36	25,20	33,53	16,86	15,44	14,65	15,65
127	28,53	27,33	27,47	27,78	26,40	35,60	17,09	17,82	17,75	17,53
128	36,93	36,07	35,47	36,16	28,33	45,07	15,19	15,56	15,81	15,53

C^{teórico} =
= 14,71 g/l

A_a, A_b, A_c = área de la primera, segunda y tercera mancha testigo, respectivamente.

A_m = área de la mancha testigo promedio.

A₁ = área de la mancha menor del desconocido.

A₂ = área de la mancha mayor del desconocido.

C_a, C_b, C_c = concentraciones calculadas según A_a, A_b y A_c, respectivamente.

C_m = concentración calculada según A_m.

Análisis estadístico de C_m (42,70):

Termino medio, T.M. = 15,52; desviación standard σ = 1,42; coeficiente de variación V = 9,4 %;

resultado R = 15,52 ± 1,42.

Los datos finales de la concentración supuesta desconocida (C_m) están calculados aplicando en la fórmula el promedio de las áreas de los testigos (A_m). Puede verse que, para un teórico de 14,71 g/l, el término medio obtenido es bastante cercano y la desviación standard suficientemente pequeña. Sin embargo, haciendo el análisis estadístico de los datos de las columnas C_a , C_b y C_c vemos que los de esta última (T.M. = 15,32; σ = 1,29; V = 8,4 %; R = 15,32 \pm 1,29) tienen un término medio apenas más aproximado que el otro pero una desviación standard bastante menor. Eso puede interpretarse como que si bien las áreas - testigo obtenidas mediante siembra de diferentes volúmenes son aproximadamente iguales, la siembra más conveniente consiste en depositar el menor volumen de la solución testigo más concentrada (C_c).

En atención a eso se realizó una segunda serie de ensayos cuantitativos respetando en líneas generales la técnica y disposición de la anterior pero con algunas variantes: el testigo se sembró en forma de 3 micro litros de solución 0,15 M en 3 puntos de la hoja; se usó como desconocido una fracción de la solución 0,10 M anterior que se había conservado (en heladera y bajo capa de toluo) mientras se efectuaba la primera serie. La tabla 4,23 muestra que el término medio es sensiblemente análogo al anterior pero que la desviación standard ha disminuido mucho.

TABLA 4,23

Exper. n°	A _a	A _b	A _c	A _m	A ₁	A ₂	C _a	C _b	C _c	C _m
130	35,13	35,60	31,53	34,09	28,67	36,80	14,78	14,59	16,47	15,28
131	28,80	28,93	29,53	29,09	27,07	35,93	17,24	17,15	16,79	17,06
132	32,53	30,60	31,80	31,64	22,80	39,87	14,49	15,42	14,79	14,90
133	34,13	33,87	35,80	34,60	28,67	38,07	15,43	15,54	14,70	15,22
134	36,33	34,07	35,13	35,18	27,73	40,33	14,54	15,51	15,03	15,03

Término medio para $C_m = 15,50$

Desviación standard = 0,89

Coefficiente de variación = 5,7 %

Resultado = $15,50 \pm 0,89$

Se imponía, en vista de los buenos resultados obtenidos efectuar un ensayo más amplio, con valores del desconocido que en lugar de ser de 14,71 g/l como el del anterior, abarcaran un rango relativamente grande de concentraciones (de 12,21 a 21,09 g/l).

Tal fué el objeto de la serie de experiencias 135 a 155, en la que se ensayó una escala de 5 concentraciones de ácido glutámico frente a un mismo testigo. Este tenía una concentración de 22,2 g/l y las soluciones de la escala, que numeramos del 1 al 5: solución nº 1: -- 12,21; nº 2: 14,43; nº 3: 16,65; nº 4: 18,87; nº 5: 21,09 g/l. La escala presenta la característica requerida; que la mancha de 3 microlitros del testigo sea de área intermedia entre la de 3 y 6 microlitros de desconocido.

Se realizaron 4 ó 5 ensayos, según los casos, con cada uno de esos valores.

Las experiencias 135 a 148 son similares a las de la serie anterior: tres siembras de 3 microlitros de testigo, una de 3 microlitros y otras de 6 microlitros del desconocido. Los cálculos se efectúan tomando en cuenta el área individual de cada testigo y además el área promedio (tabla 4,24).

Las experiencias 149 a 154, en cambio muestran una variante: las siembras del testigo son solo dos pero se efectúan dos siembras de 3 microlitros del desconocido, además de la acostumbrada de 6 microl. (tab.4,25).

La excepción de este grupo es la experiencia 155, con dos siembras testigo, una de 3 microlitros

del desconocido y dos de 6 microlitros del mismo (tabla - 4,26). En estas dos últimas series de experiencias, al aplicar la fórmula para calcular concentraciones obtendremos cuatro datos provenientes de la combinación de dos valores de área testigo y dos de desconocido menor.

TABLA 4,24

Exp. n°	A _a	A _b	A _c	A _m	A ₁	A ₂	C _a	C _b	C _c	C _m	C _{teórico}
1	36,27	36,40	36,73	36,47	20,67	37,40	12,04	12,00	11,87	11,97	12,21
136	34,20	35,47	30,47	33,38	21,13	35,00	12,54	12,08	14,03	12,88	
137	27,00	- -	26,93	26,97	16,00	29,13	12,53	- -	12,64	12,59	
138	26,33	25,80	28,93	27,02	19,07	28,73	14,04	14,37	12,81	13,74	
139	31,33	26,87	29,07	29,09	18,13	31,87	12,03	14,07	13,00	13,03	
2	33,73	33,27	33,67	33,56	24,67	40,07	14,71	14,90	14,74	14,78	14,43
141	29,93	31,40	31,33	30,89	22,87	36,53	15,21	14,53	14,53	14,76	
142	26,47	24,67	24,40	25,18	16,93	29,67	13,34	14,30	14,40	14,01	
3	36,40	36,20	33,87	35,49	29,53	46,80	16,13	16,21	17,34	16,56	16,65
144	31,00	33,80	34,20	33,00	25,60	44,73	17,11	15,75	15,57	16,14	
4	36,87	40,00	37,00	37,89	32,93	51,93	17,73	16,35	17,67	17,25	18,87
146	36,87	36,20	37,47	36,85	34,00	53,47	18,28	18,62	17,99	18,30	
5	36,73	34,87	35,87	35,82	33,60	52,20	18,01	19,00	18,47	18,49	21,09
148	34,00	34,47	36,40	35,20	32,13	56,40	19,69	19,43	18,40	19,17	

TABLA 4,25

Exp. n°	A _a	A _b	A _m	(A ₁) _I	(A ₁) _{II}	A ₂	C _a	C _b	C _c	C _d	C _m	C _{teórico}
2	29,93	28,27	29,11	22,73	23,93	35,00	14,89	15,33	15,82	16,30	15,59	14,43
3	28,47	26,47	27,47	21,87	22,67	36,60	15,67	15,98	16,87	17,21	16,43	16,65
4	26,93	27,27	27,10	23,93	24,67	38,87	17,63	17,92	17,93	18,23	17,93	18,87
152	29,40	31,67	30,54	29,07	29,67	40,93	18,66	17,34	18,88	17,55	18,11	
5	29,60	28,60	29,10	24,80	28,67	45,87	17,98	18,46	19,44	19,95	18,96	21,09
154	36,67	32,60	34,64	31,73	32,33	54,47	18,02	20,25	17,84	20,04	19,04	

TABLA 4,26

Exp. n.º	A_a	A_b	A_m	A_1	$(A_2)_I$	$(A_2)_{II}$	C_a	C_b	C_c	C_d	C_m	$C_{teórico}$
3	155	30,07	29,60	29,84	23,93	40,73	16,39	16,39	16,69	16,69	16,54	16,65

$(A_1)_I$ y $(A_1)_{II} =$ primera y segunda mancha menor del desconocido.

$(A_2)_I$ y $(A_2)_{II} =$ primera y segunda mancha mayor del desconocido.

Los datos provistos por los ensayos mencionados se analizan estadísticamente (42,70) en las tablas 4,27 y 4,28. En la primera los resultados se calculan con respecto a cada valor parcial de concentración consignado en las tablas 4,24 a 4,26 (C_a, C_b, C_c, C_d). En la segunda tabla, en cambio, los cálculos se basan en el promedio de concentración de cada experiencia (C_m).

TABLA 4,27

Análisis estadístico de los resultados individuales de las tablas

Exp. nº	Valores individuales	σ	Resultado experimental	Result. teórico	V (%)	σ_M
1	135 11,87; 12,00; 12,04 136 12,08; 12,54; 14,03 137 12,53; 12,64 138 14,04; 12,81; 14,37 139 12,03; 13,00; 14,07					
	n=14; T.M. = 12,86	0,90	12,86 \pm 0,90	12,21	7,2	0,25
2	140 14,71; 14,90; 14,74 141 15,21; 14,53; 14,53 142 13,34; 14,30; 14,40 149 14,89; 15,33; 15,82; 16,30					6
	n = 13; T.M. = 14,85	0,73	14,85 \pm 0,73	14,43	4,9	0,21
3	143 16,13; 16,21; 17,34 144 17,11; 15,75; 15,57 155 16,39; 16,69; 16,39; 16,69 150 15,67; 15,98; 16,87; 17,21					
	n = 14; T.M. = 16,43	0,56	16,43 \pm 0,56	16,65	3,4	0,16
4	145 17,73; 16,35; 17,67 146 18,28; 18,62; 17,99 151 17,63; 17,92; 18,23 152 18,66; 17,34; 18,88; 17,55					
	n = 14; T.M. = 17,91	0,65	17,91 \pm 0,65	18,87	3,6	0,18
5	147 18,01; 19,00; 18,47 148 19,69; 19,43; 18,40 153 17,98; 18,46; 19,44; 19,95 154 18,02; 20,25; 17,84; 20,04					
	n = 14; T.M. = 18,93	0,86	18,93 \pm 0,86	21,09	4,5	0,24

σ = desviación standard = $\sqrt{\sum d^2/n-1}$, donde "d" es la diferencia entre los valores individuales y el término medio (T.M.) y "n" es el número de valores individuales.

V = Coeficiente de variación = $\frac{\sigma}{T.M.} \cdot 100 \%$

σ_M = Desviación standard del término medio = $\sigma/\sqrt{n-1}$

TABLA 4,28

Análisis estadístico de los promedios de las tablas

	Exp. n°	Prom. indiv.	σ	Resultado experimental	Resultado teórico	V (%)	σ_M
1	135	11,97					
	136	12,88					
	137	12,59					
	138	13,74					
	139	13,03					

	n = 15;	T.M. = 12,84	0,65	12,84 \pm 0,65	12,21	5,1	0,33
2	140	14,78					
	141	14,76					
	142	14,01					
	149	15,59					

	n=4;	T.M. = 14,79	0,57	14,79 \pm 0,57	14,43	3,9	0,33
3	143	16,56					
	144	16,14					
	155	16,54					
	150	16,43					

	n=4;	T.M. = 16,42	0,20	16,42 \pm 0,20	16,65	1,2	0,12
4	145	17,25					
	146	18,30					
	151	17,93					
	152	18,11					

	n=4;	T.M. = 17,90	0,46	17,90 \pm 0,46	18,87	2,6	0,26
5	147	18,49					
	148	19,17					
	153	18,96					
	154	19,04					

	n=4;	T.M. = 18,92	0,29	18,92 \pm 0,29	21,09	1,5	0,17

Comparando los datos provistos por ambas pablas entre si se deduce: a) que el cálculo basado en los promedios es más aproximado ^{que} al de los valores individuales;

b) L_{25} estimaciones tienen un punto de mayor aproximación al valor real cuando el desconocido presenta una concentración vecina a 16,65 g/l. Por debajo de ese valor, los datos experimentales van aumentando levemente por sobre el real; el límite inferior de concentración a estimar será aquel - que provea de una mancha del desconocido que no sea demasiado pequeña y por ende de bordes tan difusos que la estimación de su área se haga incierta. Por encima del valor mencionado de 16,65 g/l, el apartamiento del valor real es mayor y ya para concentraciones de 21,09 g/l. es tan grande que hay que considerar que el límite está por debajo de ese valor y aproximadamente en 19 g/l;

c) Los valores de la desviación standard son también más bajos a la concentración óptima mencionada. En este sentido quizá convenga aclarar que las desviaciones standard calculadas dan idea del apartamiento de los valores individuales del término medio experimental, pero no del valor real de concentración.

Mejor idea de la dispersión de los resultados dan los valores del coeficiente de variación V , según los cuales vemos que aquella es mayor a concentraciones de la escala menores de 16,65 g/l.;

d) La dispersión de los valores del término medio (desviación standard media) es escasa y muy similar en todos los casos;

e) El sistema consistente en sembrar dos manchas de testigo, dos del desconocido a menor concentración y una del desconocido a mayor concentración parece proporcionar una mayor aproximación a la que provee de tres de testigo y una de cada desconocido. (comparar experiencias 145 y 146 con 151 y 152; y experiencias 147 y 148 con 153 y 154). Parece lógico que así sea, pues es en la mancha menor del desconocido donde se cometen los mayores errores de delineado y estos se subsanan en parte con el duplicado. En cambio, no parece ser necesario duplicar la gran mancha de 6 micro litros de desconocido, puesto que los valores obtenidos con dos manchas de esa concentración (experiencia 155) resultaron iguales.

El análisis precedente lleva a las siguientes conclusiones:

El conjunto de técnicas adoptado demuestra ser suficiente para dar estimaciones bastante aproximadas sin necesidad de corridas de réplica y aún en una sola corrida con solamente cinco manchas de aminoácido, incluyendo testigo y desconocido.

La disposición será la siguiente: dos manchas de testigo, dos manchas menores del desconocido y una mancha mayor del mismo.

Los volúmenes sembrados de solución - testigo y desconocidos menor y mayor han de estar respectivamente en la relación 1:1:2. Para una concentración de testigo de 22,2 g/l, el desconocido conviene que tenga una lo más cercana posible a 16,65 g/l. y que no sea menor de

12 ni mayor de 19 g/l. Esa concentración de testigo parece ser el límite máximo admisible en las condiciones en que se efectúa la electroforesis. Mayores concentraciones y por ende áreas mayores implicarían el uso de hojas de papel más anchas así como modificaciones en las dimensiones del aparato. En este sentido, nos limitamos a dar condiciones de utilidad comprobada.

Consideramos aceptables las restricciones impuestas si se piensa que con ellas se evita una tarea tan tediosa como es efectuar 10 a 20 experiencias de réplica.

Ensayos realizados aplicando la técnica propuesta a hidrolizados clorhídricos de gluten han mostrado su viabilidad. No hay diferencias notables entre las manchas obtenidas de soluciones puras y las de esos hidrolizados, aunque parece importante que el pH de la solución a valorar sea preferentemente ácido. En este sentido dado el medio regulador en que se efectúa la experiencia y la máxima cantidad de hidrolizado depositado, no parece necesaria su neutralización previa, lo que significa una pequeña ventaja sobre las técnicas cromatográficas en papel.

5.- Conclusiones

Método de determinación adoptado

De acuerdo a lo que antecede, podremos establecer las condiciones de una determinación de ácido - glutámico separado previamente por electroforesis en papel.

Las características de esa separación se dan en § 3,4; falta completar el aspecto cuantitativo - de la técnica.

Una hoja de papel de filtro Whatman nº 1 ó equivalente de 32 x 14 cm. se marca con lápiz así: en su línea media transversal, en 5 puntos distantes 2,3 cm.- entre sí y de los bordes del papel; también en líneas transversales ubicadas a 4 y 1 cm. de cada uno de los extremos; en uno de éstos, con un signo indicando la polaridad. La hoja se baña luego en solución reguladora y se seca parcialmente poniéndola entre dos hojas de papel de filtro grueso durante un momento. Después, sostenida únicamente por sus extremos, se depositan en ella: en los puntos 1 y 3: 3 microlitros de solución testigo de ácido glutámico (22,2 g/l) en los puntos 2 y 5: 3 microlitros de solución desconocida de concentración $12 \leq 16,6 \leq 19$ g/l y en el punto 4: 6 microlitros de esta misma solución. La hoja se ubica luego en el aparato y allí se la deja, tapada y con sus extremos sumergidos en el electrolito de los vasos, durante unos 15 minutos antes de hacer pasar la corriente. Pasado ese lapso se lleva a cabo la separación durante 180 minutos con una fuerza del campo de 15,3 v/cm., para un regulador de acotato de pH 4,5 y fuerza iónica 0,05.

Finalizada esa operación, el electrograma se seca a temperatura ambiente, acelerando el proceso con un ventilador. Una vez seco, se lo sumerge en una solución acetónica de ninhidrina de 0,1 g/100 ml. y se lo deja a temperatura ambiente y en la oscuridad durante unas 18 horas. Llegado ese momento, se coloca la hoja sobre un vidrio despulido iluminado intensamente por debajo y en cámara oscura y por transparencia, se delinea con un lápiz de punta fina el borde de la zona de más intenso color de cada mancha. El área así delimitada se estima mediante un planímetro dando varias vueltas al perímetro y promediando.

La concentración del desconocido se obtiene aplicando la fórmula:

$$C = \frac{P}{2A} \left(\frac{A_1}{U_1} + \frac{A_2}{U_2} \right), \text{ donde}$$

P es la cantidad de testigo sembrada (expresada en gamas); A, el área de la mancha testigo (en unidades arbitrarias); A₁, el área de la mancha menor del desconocido (unidades arbitrarias); A₂, el área de la mancha mayor del desconocido (unidades arbitrarias); U₁, el volumen de solución aplicado para obtener la mancha menor del desconocido (en microlitros); U₂, el volumen de solución aplicado para obtener la mancha mayor del desconocido (microlitros).

6.- Bibliografía.

- 1) Abramson H.A., "Electrokinetic Phenomena", Chemical Catalog N.York, 1934.
- 2) Abramson H.A., Moyer L.S. y Gorin M.H., "Electrophoresis - of Proteins", Reinhold, N. York, 1942,
 - 2a) Loc. cit., pág. 98;
 - 2b) Loc. cit., fig. 106, pág. 244 y fig. 108, pág. 250;
 - 2c) Loc. cit., pág. 165;
 - 2d) Loc. cit., pág. 20 y 55;
 - 2e) Loc. cit., pág. 137.
- 3) Adams H.W. y Stuart H.G., *Analyst*, 76, 553 (1951).
- 4) Albanese A.A., *J. Biol. Chem.*, 134, 467 (1940).
- 5) Albanese A.A. y Lein M., *Science*, 110, 163 (1949).
- 6) Alberty R.A., *J. Chem. Educ.*, 25, 426, 619 (1948).
- 7) Awapara, J., *J. Biol. Chem.*, 173, 113 (1949).
- 8) Bailey K., Chibnall A.C., Rees M.W. y Williams F.C. *Biochem. J.*, 37, 360 (1943).
- 9) Balston J.N., y Talbot B.E., "A guide to Filter Paper and Cellulose Powder Chromatography, ReeveAngel y Balston, London-Maidstone, 1952;
 - 9a) Loc. cit., pág. 19;
 - 9b) Loc. cit., pág. 112.
- 10) Beerstecher E., *Anal. Chem.*, 22, 1200 (1950).
- 11) Bergmann M. y Stein W.H., *J. Biol. Chem.*, 128, 217 (1939).
- 12) Berry H.K. y Cain L., *Arch. Biochem.*, 24, 179 (1949).
- 13) Biserte G., *Biochim. et Biophys. Acta*, 4, 416 (1950).
- 14) Blass J., Macheboeuf M. y Rebeyrotte P., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 35, 953 (1953).
- 15) Block R.J., *Science*, 103, 603 (1943).

- 16) Block R.J., *Anal. Chem.*, 22, 1327 (1950).
- 17) Block R.J., *Arch. Biochem. Biophys.*, 31, 266 (1951).
- 18) Block R.J. y Bolling D., "The Amino Acid Composition of Proteins and Foods", Thomas, 1a. ed., I 11.- 1947.
- 19) Block R.J., LeStrange R. y Zweig G., "Paper Chromatography", Academic Press, N. York, 1952.
- 19a) *Loc. cit.* pág. 31 y 55.
- 20) Brattsten I. y Nilsson A., *Arkiv. Kemi.*, 3, 337 (1951).
- 21) Briggs D.R., "Electrophoresis" en "Biophysical Research Methods", Uber, Interscience, N.York, 1950, pág. 271.
- 22) Brush H.K., Boutwell R.K., Barton A.D. y Heidelberger C., *Science*, 113, 4 (1951).
- 23) Bull H.B., Hahn J.W. y Baptist V.H., *J. Am. Chem. Soc.*, - 71, 550 (1949).
- 24) Burma D.P., *Anal. Chem.*, 25, 549 (1953).
- 25) Butler J.A.V. y Stephen J.M.L., *Nature*, 160, 469 (1947).
- 26) Cann J.R., Brown R.A. y Kirkwood J.G., *J. Am. Chem. Soc.*, 71, 1609 y 2687 (1949), y *J. Biol. Chem.*, 181, 161 (1949).
- 27) Cann J.R., Kirkwood J.G., Brown R.A. y Pleascia O.J., *J. Am. Chem. Soc.*, 71, 1603 (1949).
- 28) Cassidy H.G., "Adsorption and Chromatography", Interscience, N. York, 1951.
- 29) Cohen P.P., *Biochem. J.*, 33, 551 (1939).
- 30) Cohn E.J., y Edsall J.T., "Proteins, Amino Acids and Peptides", Reinhold, N. York, 1943, pág. 84.
- 30a) *Loc. cit.* pág. 199.
- 31) Consden R., Gordon A.H. y Martin A.J.P., *Biochem J.*, 33, 224 (1944).
- 32) Consden R., Gordon A.H. y Martin A.J.P., *Biochem J.*, 40,

- 33 (1946).
- 33) Consden, R., Gordon A.H. y Martin A.J.P., *Biochem J.*, 42, 443 (1948).
- 34) Consden R. y Stanier W.M., *Nature*, 169, 783 (1952).
- 35) Consden R. y Stanier W.M., *Nature*, 170, 1069 (1952).
- 36) Coolidge T.B., *J. Biol. Chem.*, 127, 551 (1939).
- 37) Cramer F., "Papierchromatographie", Verlag Chemie, Weinheim, 1953.
- 38) Cramer H.J. y Tiselius A., *Biochem. Z.*, 320, 273 (1950).
- 39) Chibnall A.C., Rees N.W., Williams E.F. y Boyland E., *Biochem. J.*, 34, 285 (1940).
- 40) Chibnall A.C., Rees M.W. y Williams E.E., *Biochem. J.*, 37, 372 (1943).
- 41) Davidson J.N. y Smellie R.M.S., *Biochem J.*, 49, XV (1951).
- 42) Davies O.L., "Statistical Methods in Research and Production", Oliver and Boyd, 2a. ed., London, 1949.
- 42a) *Loc. cit.* pág. VI.
- 43) Davis B.D. y Cohn E.J., *J. Am. Chem. Soc.*, 61, 2092 (1939).
- 44) Denffer D., Behrens M. y Fischer A., *Naturwissenschaften*, 39, 253 (1952); *C.A.*, 47, 6478 (1953).
- 45) Dent C.E. y Schilling J.A., *Biochem. J.*, 44, 318 (1949).
- 46) Doherty D.G., Stein W.H. y Bergmann M., *J. Biol. Chem.*, - 135, 487 (1940).
- 47) Durrum E.L., *J. Am. Chem. Soc.*, 72, 2943 (1950).
- 48) Durrum E.L., *J. Colloid Sci.*, 6, 274 (1951).
- 49) Durrum E.L., *Science*, 113, 66 (1951).
- 50) Durrum E.L. *J. Am. Chem. Soc.*, 73, 4875 (1951).
- 51) Evans E.E. y Wall K.N., *J. Bact.*, 63, 422 (1952); *C.A.*, - 46, 5117 (1952).
- 52) Fisher R.B., Parsons D.S. y Holmes R., *Nature*, 164, 183 -

- (1949).
- 53) Fisher R.B., Parsons D.S. y Morrison G.A., *id.*, 161, 764 (1948).
- 54) Flynn F.V. y Mayo P. de, *Lancet*, 261, 235 (1951).
- 55) Fosdick L.^o. y Blackwell R.Q., *Science*, 109, 314 (1949).
- 56) Fowden L., *Biochem. J.*, 48, 327 (1951).
- 57) Fowden L. y Penney J.R., *Nature*, 165, 846 (1950).
- 58) Fromageot C. y Colas R., *Biochim et Biophys. Acta*, 3, 417 (1949); *C.A.*, 44, 185 (1950).
- 59) Fromageot C. Jutisz y Tessier P., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 31, 689 (1949).
- 60) Fromageot C. y Privat de Garilhe M., *Biochim et Biophys. Acta*, 4, 509 (1950).
- 61) Ganzin M. y Macheboeuf M., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 34, 32 (1952).
- 62) Ganzin M. Macheboeuf M. y Rebeyrotte P., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 34, 26 (1952).
- 63) Glasstone S., "Textbook of Physical Chemistry", Van Nostrand, 2a. ed., N. York, 1947.
- 64) Glazko A.J., Dill W.A. y Rebstock M.C., *J. Biol. Chem.*, 183, 679 (1950).
- 65) Goa J., *J. Scand. Clin. and Lab. Invest.*, 3, 236 (1951).
- 66) Gordon A.H., Gross J., O'Connor D. y Rivers R.P., *Nature*, 169, 19 (1952).
- 67) Grassmann W. y Hannigk., *Naturwissenschaften*, 37, 496 (1950); *C.A.*, 45, 2363 (1951).
- 68) Grassmann W., Hannig K. y Knedel M., *Deut. med. Wochschr.*, 76, 333 (1951).
- (69) Gray R.A., *Arch. Biochem. Biophys.*, 33, 305 (1952).

- 70) Günther B., *Ciencia e Investigación*, I, 407 (1945).
- 71) Hagdahl L. y Tiselius A., *Nature*, 170, 799 (1952).
- 72) Hashimoto Y., Mori I. y Kimura M., *Nature*, 170, 975 (1952)
- 73) Haugaard G. y Kroner T.D., *J. Am. Chem. Soc.*, 70, 2135 - (1948).
- 74) Haugaard G. y Kroner T.D., U.S. Patent 2.555.487 (Jun. 5-1951).
- 75) Ing. H.R. y Bergmann M., *J. Biol. Chem.*, 129, 603 (1939).
- 76) Jones A.R., *Anál. Chem.*, 24, 1055 (1952).
- 77) Jones D.B. y Moeller O., *J. Biol. Chem.* 79, 432 (1928).
- 78) Jutisz M., *Bull. Soc. Chim. France*, 19, 821 (1952).
- 79) Kawerau E. y Wieland T., *Nature*, 168, 177 (1951).
- 80) Keston A.S., Udenfriend S. y Cannan R.K., *J. Am. Chem. Soc.* 68, 1390 (1946), y 71, 249 (1949).
- 81) Keston A.S., Udenfriend S. y Levy M., *J. Am. Chem. Soc.*, 69, 3151 (1947) y 72, 743 (1950).
- 82) Kirk P.L. y Duggan E.L., *Anal. Chem.*, 26, 163 (1954).
- 83) Klatzkin C., *Nature*, 169, 422 (1952).
- 84) Kōiw E., Wallenius G. y Grönwall A., *Bull. Soc. Chim. - Biol.*, 33, 1940 (1951).
- 85) Kolthoff I.M. y Rosenblum Ch., "Acid-Base Indicators", - Lancaster Press., Lancaster Pa., 1937.
- 86) Kraus K.A. y Smith G.W., *J. Am. Chem. Soc.*, 72, 4329 - (1950).
- 87) Krebs H.A., *Biochem. J.*, 31, 2095 (1937)
- 88) Kretorich V.L. y Bundel A.A.; C.A., 44, 10603 (1950).
- 89) Kunkel H.G. y Tiselius A., *J. Gen. Physiol.*, 35, 89 (1951)
- 90) Lafage R.M., "Microvaloración Colorimétrica de los ácidos Aspártico y Glutámico" Tesis. Escuela de Bioqu. y Farm. Bs.As.

1948.

- 91) Landua A.J. y Awapara J., *Science*, 109, 385 (1949).
- 92) Landucci J.M. y Pimont M., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 23, 1041 (1953).
- 93) Lederer E. y Lederer M., "Chromatography" Elsevier-Holand 1953.
- 93a) *Loc. cit.* pág. 90 y ss.
- 94) Lederer M., *Nature*, 167, 864 (1951).
- 95) Levin B. y Oberholzer V.G., *Nature*, 170, 123 (1952).
- 96) Lissitzky S. y Michel R., *Bull. Soc. Chim. France*, 19, 891 (1952).
- 97) Lyman C.M., Kuiken K.A., Norman N.H. y Hale F., *J. Biol. Chem.*, 161, 615 (1943).
- 98) Macheboeuf M. y Blass J., *Ann. Inst. Pasteur*, 73, 1053 - (1947).
- 99) Macheboeuf M., Dubert J.M. y Rebeyrotte P., *Bull. Soc. - Chim. Biol.*, 35, 346 (1953).
- 100) Macheboeuf M., Polonovski J. y Gay A., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 33, 1532 (1951).
- 101) Macheboeuf M. Rebeyrotte P. y Brunerie M., *Bull. Soc. - Chim. Biol.*, 33, 1543 (1951).
- 102) Macheboeuf M., Rebeyrotte P., Dubert J.M. y Brunerie M., *id.*, 35, 334 (1953).
- 103) Martin A.J.P. y Mittelmann R., *Biochem. J.*, 43, 353 (1948)
- 104) Mc Donald H.J., *J. Chem. Educ.*, 29, 428 (1952).
- 105) Mc Donald H.J., Marbach E.P., *J. Am. Chem. Soc.*, 74, 1619 (1952).
- 106) Mc Donald H.J., Urbin M.C. y Williamson M.D., *Science*, 112, 227 (1950).

- 107) Mc Donald H.J., Urbin M.C. y Williamson M.B., J. Colloid Sci., 6, 236 (1951).
- 108) Mc Donald H.J., Urbin M.C. y Williamson M.B., J. Am. Chem. Soc., 73, 1893 (1951).
- 109) Mc Farren E.F. y Mills J.A., Anal. Chem., 24, 650 (1952).
- 110) Micheel F. y Kamp F.P. van de, Angew. Chem., 64, 607 - (1952).
- 111) Mills G.T. y Smith E.E.B., Biochem. J., 49, VI (1951).
- 112) Mitchell H.H. y Hamilton T.S., "The Biochemistry of the Amino Acids, Chemical Catalog, N. York 1929, pág. 111.
- 113) Moore S. y Steins W.H., Ann. New York Acad. Sci., 49, - 265 (1948).
- 114) Moore S. y Stein W.H., J. Biol. Chem., 176, 367 (1948).
- 115) Moore S. y Stein W.H., J. Biol. Chem., 178, 53 (1949).
- 116) Moore S. y Stein W.H., J. Biol. Chem., 192, 663 (1951).
- 117) Morris C.J.O.R., citado por Balston y Talbot (19), pág. 112.
- 118) Moyer L.D., J. Biol. Chem., 133, 29 (1940).
- 119) Naftalin L., Nature, 161, 763 (1948).
- 120) Neumann W. y Habermann E., Naturwissenschaften, 39, 286, (1952); C.A., 47, 6459 (1953).
- 121) Nielsen E. y Kirkwood J.G., J. Am. Chem. Soc., 68, 181 - (1946).
- 122) Novellie L., Nature, 166, 1000 (1950).
- 123) Opsahl J.C. y Arnow L.E., J. Am. Chem. Soc., 64, 2035 - (1942).
- 124) Papastamatis S.C. y Kench J.E., Nature, 170, 33 (1952).
- 125) Patton A.R. y Chism. P., Anal. Chem., 23, 1683 (1951).
- 126) Paul M.H. y Durrum E.L., J. Am. Chem. Soc., 74, 4721 -

- (1952).
- 127) Peniston Q.P., Agar H.D. y Mc Carth y J.L., Anal. Chem., 23, 994 (1951).
- 128) Pereira A. y Serra J.^{A.}, Science, 113, 387 (1951).
- 129) Połonovski M., Penaranda F. y Robert L., Bull. Soc. Chim. Biol., 25, 801 (1953).
- 130) Polson A., Biochim et Biophys. Acta, 2, 575 (1948).
- 131) Polson A., Roo y P.J. van y Marais E.J., Onderstepoort J. Vet. Research, 25, 31 (1951); C.^{A.}, 46, 12218 (1952).
- 132) Pope G.G. y Stevens M.F., Biochem. J., 33, 1070 (1939).
- 133) Porath J. y Flodin P., Nature, 168, 202 (1951).
- 134) Prescott B.A. y Waelsch H., J. Biol., Chem., 164, 331)) (1946), y Advances Prot. Chem., VI, 304 (1951).
- 135) Pucher G.W. y Vickery H.B., Ind. Eng. Chem., Anal. Ed., 12, 27 (1940).
- 136) Redfield R.R. y Barron E.S.G., Arch. Biochem. Biophys., - 35, 443 (1952).
- 137) Rittenberg D. y Foster G.L., J. Biol. Chem., 133, 737 -- (1940).
- 138) Robert L. y Penaranda F.S., Bull. Soc. Chim. Biol., 35, 791 (1953).
- 139) Rockland L.B., Blatt J.L. y Dunn M.S., Anal. Chem., 23, 1142 (1951).
- 140) Rockland L.B., y Dunn M.S., J. Am. Chem. Soc., 71, 4121, (1949).
- 141) Rockland L.B., Liebermann J. y Dunn M.S., Anal. Chem., 24, 773 (1952).
- 142) Sato T.R., Danond H., Norris W.P. y Strain H.H., J. Am. Chem. Soc., 74, 6154 (1952).

- 143) Sato T.R., Kisieloski W.E., Norris W.P. y Strain H.H., Anal. Chem., 25, 438 (1953).
- 144) Sato T.R., Norris W.P. y Strain H.H., Anal. Chem., 24, 776 (1952).
- 145) Schild K.T. y Maurer W., Naturwissenschaften, 32, 303 (1951); C.A., 46, 3098 (1952).
- 146) Schmidt C.L.A., "The Chemistry of the Amino Acids and Proteins", Thomas, Springfield, Ill, 2a. ed., 1944;
- 146a) Loc. cit., pág. 138 y ss.
- 146b) Loc. cit., pág. 613.
- 146c) Loc. cit., pág. 652.
- 147) Schroeder W.A., Kay L.M. y Mills R.S., Anal. Chem., 22, 760 (1950).
- 148) Schwarz V., Nature, 167, 404 (1951).
- 149) Seidell A., "Solubilities of Organic Compounds", Vol. II, Van Nostrand, N. York, 1941.
- 150) Stein W.H. y Moore S., J. Biol. Chem., 176, 337 (1948).
- 151) Stein W.H., Moore S., Stamm G., Chou C. y Bergmann M., id. 134, 627 (1940).
- 152) Strange R.E. y Harkness N., Nature, 171, 77 (1953).
- 153) Strain H.H., J. Am. Chem. Soc., 61, 1292 (1939).
- 154) Strain H.H., Sato T.R. y Engelke J., Anal. Chem., 26, 90 (1954).
- 155) Strain H.H. y Sullivan J.C., Anal. Chem. 23, 816 (1951).
- 156) Svensson H. y Brattsten I., ArkivKemi, 1, 401 (1949); C.A.
- 157) Tiselius A., Discussions Faraday Soc., No 13, 29 (1953).
- 158) Toennies G. y Kolb J., Anal. Chem., 23, 823 (1951).
- 159) Turba F. y Enekel H.J., Naturwissenschaften, 37, 93 -- (1950).

- 160) Turba F. y Enenkel H.J., *Naturwissenschaften*, 38, 189 - (1951); *C.A.*, 46, 2116 (1952).
- 161) Urbach K.F., *Science*, 109, 259 (1949).
- 162) Ussing H.H., *Nature*, 144, 977 (1939).
- 163) Yelick S.F. y Udenfriend S., *J. Biol. Chem.*, 190, 721 - (1951).
- 164) Villar-Palasi V., "Cromatografía sobre papel", Monograf. *Ciencia Mod.* 3.- Inst. Español de Fisiol. y bioqu. 1952.
- 164a) Loc. cit. pág. 102.
- 165) Walpole G.S., *J. Chem. Soc.*, 105, 2501 (1914); citado por Kolthoff y Rosenblum (85).
- 166) Wallenfelsk y Pechmann E.v., *Angew. Chemie*, 63, 44 (1951).
- 167) Weber R., *Helv. Chim. Acta*, 34, 2031 (1951).
- 168) Weber R., *Helv. Chim. Acta*, 36, 424 (1953).
- 169) Wieland T., *Ber.*, 75B, 1001 (1942); *C.A.* 37, 4793 (1943).
- 170) Wieland T., *Z. physiol. Chem.*, 273, 24 (1942); *C.A.*, 37, 4364 (1943).
- 171) Wieland T., *Angew. Chemie*, 60, 313 (1948).
- 172) Wieland T. y Bauer L., *Angew. Chemie*, 63, 511 (1951).
- 173) Wieland T. y Feld U., *Angew. Chemie*, 63, 253 (1951).
- 174) Wieland T. y Fischer E., *Naturwissenschaften*, 35, 29 (1948)
- 175) Wieland T., Schmeiserk., Fischer E. y Maier-Leibnitz H., *Naturwissenschaften*, 36, 280 (1949); *C.A.* 44, 5948 (1950).
- 176) Wieland T. y Wirth L., *Angew. Chem.*, 62, 473 (1950).
- 177) Wieland T. y Wirth L., *Angew. Chem.*, 63, 171 (1951).
- 178) Wilson H. y Cannan R.K., *J. Biol. Chem.*, 119, 309 (1937).
- 179) Winslow E.H. y Liebhafsky H.A., *Anal. Chem.*, 21, 1333 -- (1949).
- 180) Winteringham F.P.W., Harrison A. y Bridges R.G., *Nature*,

166, 999 (1950).

181) Woisod A.J., Biochem. J., 45, 412 (1949).

182) Woodward G.E., Reinhart F.E. y Dohan J.S., J. Biol. Chem. 138, 677 (1941).

183) Yanovsky C., Wassermann E. y Bonner D.M., Science, 111, 61 (1951).

W. B. A.