

Contribución al estudio crítico de la electroforesis sobre papel como técnica de análisis y fraccionamiento bioquímicos

POR

D.^a MARIA DEL CARMEN BONMATÍ LIMORTE

INTRODUCCIÓN

Cuando se nos propuso como tema de trabajo la puesta a punto y crítica experimental de los métodos electroforéticos sobre papel, no teníamos una visión clara de sus amplias posibilidades. Conforme avanzamos en su conocimiento creció nuestra confianza en los mismos y aumentó nuestro interés por su estudio. Al encontrarnos ahora en la tesitura de redactar una Memoria que recoja nuestras actividades, hemos considerado que, dicha Memoria, quedaría más completa si a la vez consignáramos en ella algunos de los aspectos teóricos fundamentales que, ordinariamente, se tratan bastante a la ligera en algunas publicaciones sobre la materia, cuando no aparecen incluso con algún error.

Hemos pretendido hacer una exposición tan clara como nos ha sido posible para contribuir, aun cuando sólo sea modestamente, a la difusión de estos acontecimientos, que debían ser ya más generales de lo que lo son en la actualidad, puesto que el grado de desarrollo alcanzado por las técnicas electroforéticas es lo suficientemente alto para que sus aplicaciones, aun dentro de las pertinentes reservas, tuviesen un campo práctico de mayores dimensiones que el actual, todavía muy restringido.

En la primera época, las aplicaciones de la electroforesis quedaron sólo en la escala microanalítica o micropreparativa, lo que se debió, sobre todo, a que tales técnicas estuvieron principalmente en manos de bioquímicos, a los que sólo interesaba esta escala, pero a los que, por otra



parte, debe reconocerse casi todo el mérito de su desarrollo. En los últimos años, estas técnicas adquieren por momentos una importancia creciente, tanto en la Química Orgánica y sus ramas, entre las que queda incluida la Bioquímica, como en la Química Inorgánica, Química-física, Química Analítica, etc. y, muy especialmente, en el campo de los problemas clínico-químicos. Dada la diversidad de cuestiones que pueden abordarse mediante la electroforesis, en general, o, más concretamente, mediante la electroforesis soportada y dentro de ésta con la soportada sobre papel, se amplía igualmente la escala cuantitativa que cada caso exige, por lo que se necesita, en principio, el tránsito hasta la macroescala. Pero para este tránsito resulta de indudable valor el conocimiento de los diversos factores que pueden afectar a los procesos, ya que, de esta manera, por modificación de los mismos en el sentido favorable, podrán extremarse la calidad y cuantía de las separaciones a conseguir mediante estas técnicas, sin que, por el hecho de cambiar de orden de magnitud, los errores introducidos sean tales que inutilicen el procedimiento.

Con este fin y con el de mejorar los procedimientos actuales en la escala analítica, nos hemos dedicado sin interrupción, desde hace más de dos años, a este tema, el cual, en la Memoria que ahora presentamos, no se ofrece precisamente en el orden cronológico de realización, sino atendiendo más bien a un deseo de claridad de exposición.

Para lograr este deseo, hemos considerado asimismo más conveniente el prescindir de una separación taxativa entre parte teórica y experimental, en desacuerdo con lo que ya se ha hecho clásico en este tipo de Memorias. Para nuestro caso, resulta poco práctica dicha separación puesto que cada experimento requiere, realmente, la continua justificación del por qué se realizó, la interpretación del mismo, y lo que es más frecuente en nuestro trabajo, el entronque que unas consecuencias tienen con otras, que pueden haber precedido en la exposición o que han de aparecer después. En resumen, no existe una independencia absoluta y formal que nos habría permitido adoptar otra forma de exposición más fraccionada. Con todo, hemos procurado reunir, a manera de capítulos, aquellas cuestiones de mayor conexión; pero insistimos en decir que las mismas se tratan simultáneamente a los experimentos en que se basan o a los que se realizan en consecuencia.

En un primer capítulo, ofrecemos una breve visión histórica del desarrollo de las técnicas electroforéticas. A continuación realizamos un estudio de los procesos físico-químicos que intervienen en la electroforesis discontinua en papel, cuyo conocimiento e interpretación consideramos fundamental para lograr el dominio de la técnica, dedicando, al mismo, varios capítulos en los que hemos intentado reunir las cuestiones de ma-

yor coherencia. Sigue un estudio casi exhaustivo del proceso de electroforesis continua, introduciendo algunas modalidades que consideramos de real importancia, sobre todo, por la simplificación y ventajas que ello lleva consigo. En un capítulo posterior, se ofrece un adelanto sobre la marcha de nuestros experimentos de superposición de corriente alterna a la corriente continua base, en los procesos electroforéticos; con dichos experimentos confiamos haber abierto un nuevo campo de trabajo de amplias posibilidades, sobre el que no hemos encontrado, en la bibliografía, antecedente alguno. Un último capítulo, que hemos calificado de Apéndice Experimental, recoge aquellos detalles prácticos que complementan a los expuestos en el cuerpo de la Memoria y que pueden ser de interés para la reproductibilidad de experimentos.

Expuestos a grandes rasgos el objeto y contenido de esta Memoria, deseamos hacer expresión sincera de nuestra gratitud a todos los que de alguna manera nos han ayudado con su dirección y consejo o con su colaboración material, siéndonos imprescindible el nombrar al Prof. A. SOLER y al Dr. G. GUZMÁN, Catedrático de Química Orgánica y Colaborador Científico del C.S.I.C., respectivamente, codirectores de este trabajo, y a D. Arturo RODRÍGUEZ SUÁREZ, Profesor Encargado de la Cátedra de Óptica y Electricidad, quien continuamente nos ayudó en el diseño y montaje de circuitos y en la interpretación de muchos fenómenos eléctricos. Igualmente, debemos expresar nuestro agradecimiento a la Comisaría de Protección Escolar y Asistencia Social, por la pensión que nos concedió durante un trimestre y por la beca que recientemente ha vuelto a concedernos. También a la Facultad de Ciencias y al Instituto de Química del C.S.I.C., que nos permitieron trabajar en sus laboratorios de Química Orgánica de Murcia, a la vez que nos facilitaron ayuda económica.

I

ALGUNOS ANTECEDENTES HISTORICOS

Las partículas que, en disolución, poseen carga eléctrica presentan la propiedad de que, colocadas en estas condiciones bajo la acción de un campo eléctrico, se desplazan en el sentido del electrodo de signo opuesto a su carga. Cuando este fenómeno tiene lugar en disoluciones que contienen iones relativamente pequeños, el proceso se llama «ionoforesis». Su aplicación a las disoluciones, o mejor, a los sistemas coloidales, y, en general, a todo sistema macromolecular constituye la base de la «electroforesis» (1).

La electroforesis, o separación de sustancias distintas en solución, según su diferente velocidad de migración en un campo eléctrico (sentido más amplio de la misma), fué ya utilizada, en 1907, por FIELD y TEAGUE (2) para separar toxina y antitoxina diftérica en un gel de agar. Pero, en realidad, el estudio de la migración electroforética había sido iniciado ya, un siglo antes justamente (1807), por el físico ruso REUSS [citado por VIOLLIER (3)] cuyas observaciones acerca del comportamiento de las partículas de arcilla en suspensión acuosa, bajo la acción de un campo eléctrico, dieron comienzo al estudio de la migración producida por la acción del mismo, en diversos coloides minerales. Posteriormente, se continuó el estudio de la cuestión, en este sentido, por numerosos investigadores, llegándose a establecer el concepto de coloides catiónicos y de coloides aniónicos, de donde parten los primeros estudios teóricos de los factores que intervienen en el desplazamiento de partículas en un campo eléctrico.

(1) MARTÍN, A. J. P. y SYNGE, R. L. M., *Advances in Protein Chem.*, 2, 31 (1945).

(2) FIELD, G. y TEAGUE, S., *J. Exp. Med.*, 9, 222 (1907).

(3) VIOLLIER, G., *Mitt. Lebensm. Hyg.*, 38, 86 (1947).



Como antecedentes más próximos, aunque todavía lejanos, encontramos los trabajos de los físicos HITTORF (1853) y OLIVER LODGE (1886) [citados por WUNDERLY (4)], demostrativos de la migración de sustancias disueltas, por medio de la corriente eléctrica. En el mismo siglo (año 1899), W. HARDY (5) propuso el término «cataforesis» para la denominación del fenómeno de la migración eléctrica de micelas coloidales, término que en 1909 fué sustituido por el de «electroforesis», por L. MICHAELIS (6).

Más adelante, en 1926, KENDALL, JETTE y WEST (7) intentaron la separación de tierras raras en geles, por el mismo procedimiento utilizado ya antes por FIELD y TEAGUE en la separación de la toxina y antitoxina diftéricas.

Pero en realidad, la fecunda utilización de este procedimiento comenzó en 1937 con la técnica descrita por TISELIUS (8), que, aunque no sea concretamente objeto de este trabajo, dada su gran relación con el mismo, será descrita más adelante.

Las interesantes posibilidades de aplicación de la técnica de TISELIUS quedaron eclipsadas, momentáneamente, por la segunda guerra mundial, y no pasaron al terreno práctico, en Europa, hasta que fué empleada por LONGSWORTH y colaboradores (1939) (9) en problemas de la medicina interna, lo cual dió lugar a que se manifestase ya el método como un poderoso auxiliar de la medicina clínica.

A pesar de esto, el manejo del aparato ideado por TISELIUS era complicado y lento, lo que, unido al considerable coste del mismo, hizo que el uso de este método electroforético se reservara para clínicas centrales e institutos científicos exclusivamente.

No obstante, siendo conocido y estimado cada vez más el valor científico de la fórmula proteica y el servicio que a ella podían prestar los métodos electroforéticos, surgió una sana fiebre (valga el contrasentido) de encontrar técnicas electroforéticas más sencillas, que estuvieran al alcance, si no de la totalidad de los clínicos, al menos sí de la mayoría.

Esto se llevó a cabo, en un principio, en el sentido de simplificar el procedimiento de TISELIUS, lo que realizaron también después Mu-

(4) WUNDERLY, CH, *La Electroforesis en Papel* (Trad. J. GRAS), Ed. Científico-Médica, Barcelona, 1956, pág. 4.

(5) HARDY, W. B., *Colloidal Solution*, Londres, 1905.

(6) MICHAELIS, L., *Biochem. Z.*, **16**, 81 (1909).

(7) KENDALL, J., JETTE, E. y WEST, W., *J. Amer. Chem. Soc.*, **48**, 3114 (1926).

(8) TISELIUS, A., *Trans. Faraday Soc.*, **33**, 524 (1937). [*British C. A., A.*, **1**, 305 (1937)].

(9) LONGSWORTH, L. G., SHEDLOSKY, T. y MACINNES, D. A., *J. Exp. Med.*, **70**, 399 (1939).

LLER (10), MOORE y WHITE (11), ANTWEILER (12) y LABHART (13), los cuales consiguieron reducir la cantidad necesaria de sustancia a analizar, en el caso de determinaciones proteínicas, a aquella que contenía 10 mg de proteína, mientras que antes se precisaba contar con más de 100 mg. Por ello, a los métodos y aparatos utilizados por dichos autores se les ha llamado «microelectroforéticos». Un inconveniente permanecía aún, sin embargo, pues debido a utilizar dichos métodos el registro óptico, exigían, para la separación y determinación de las mezclas de proteínas, el empleo de soluciones homogéneas.

De aquí se pasó a buscar técnicas en las que se estabilizaran los electrolitos por medio de sustancias sólidas, como, por ejemplo, la seda, utilizada por GELDMACHER-MALLINCKRODE (14) para la separación del glucógeno y galactógeno y, mucho antes ya, por HARDY (5). Otras sustancias sólidas utilizadas, que aparecen en la bibliografía, son el algodón (15), la lana de vidrio finamente pulverizada (16), gel de sílice (17) (18) (19), polvo (20) y perlas de vidrio muy pequeñas (21), gasa de algodón (22), agar o gelatina (23) (24) (25) (26), resinas artificiales de intercambio catiónico (27), almidón (28), (29), fibras de amianto (23), etc. Cada una de estas sustancias, soportes sólidos, irán mejor o peor, para unos casos u otros, según las propiedades físicoquímicas de las sustancias a separar.

En este sentido, es el papel la sustancia que ha adquirido mayor importancia. El empleo del mismo en las técnicas electroforéticas, como so-

-
- (10) MÜLLER, R. H., *Anal. Chem.*, **22**, 70 (1950).
 (11) MOORE, D. H., y WHITE, J. U., *Rev. Sci. Instruments*, **19**, 700 (1948) [C. A. **43**, 448 c (1949)].
 (12) ANTWEILER, H. J., *Die quantitative Elektrophorese in der Medizin*, Ed. Springer-Verlag, Berlín, 1952.
 (13) LABHART, H., LOTMAR, W. y SCHMID, P., *Helv. Chim. Acta*, **34**, 2440 (1951).
 (14) GELDMACHER-MALLINCKRODT, M. y WEINLAD, H., *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, **292**, 65 (1953) [C. A., **47**, 9302 b (1953)].
 (15) STRAIN, H. H., *J. Amer. Chem. Soc.*, **61**, 1291 (1939).
 (16) COOLIDGE, T. B., *J. Biol. Chem.*, **127**, 551 (1939).
 (17) CONSDEN, R., GORDON, A. H. y MARTIN, A. J. P., *Biochem. J.*, **40**, 33 (1946).
 (18) GORDON, A., KEIL, B. y SEBESTA, K., *Nature*, **164**, 499 (1949).
 (19) CHOISY, A., DERRIEN, Y. y JAYLE, G., *Compt. rend.*, **234**, 1918 (1952).
 (20) HAGLUND, H. y TISELIUS, A., *Acta Chem. Scand.*, **4**, 957 (1950).
 (21) SVENSON, H. y BRATTSTEN, I., *Arkiv Kemi*, **1**, 401 (1949).
 (22) WELLER, G., *Chromatogr. Bull.*, **1**, 5 (1950).
 (23) DAVIS, W., PAREE, T. y GAMEWELL, B., *XII. Intern. Congr. Pure Appl. Chem.*, Nueva York, 1951.
 (24) GORDON, A. H. y REICHARD, P., *Biochem. J.*, **48**, 569 (1951).
 (25) GRABAR, P. y WILLIAMS, C. A., *Biochim. et Biophys. Acta*, **10**, 193 (1953) [C. A., **47**, 4408 h (1953)].
 (26) GRABAR, P., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **36**, 65 (1954).
 (27) SPIEGLER, K. S. y CORYELL, C. D., *Science*, **113**, 546 (1951) [C. A., **45**, 8321 f (1951).
 (28) KUNDEL, H. G. y SLATER, R. J., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **80**, 42 (1952) [C. A., **46** 8173 f (1952)].
 (29) KUNDEL, H. G., TAYLOR, S. P., Jr. y DU VIGNEAUD, V., *J. Biol. Chem.*, **200**, 559 (1953) [C. A., **47**, 8139 h (1953)].

porte del medio, aparece descrito, por vez primera, en las comunicaciones que KÖNIG (1937) (30) hizo en el III Congreso Suramericano de Química, pasando desapercibidas (quizás por haberlas hecho en portugués, como lamenta un autor anglosajón, y, con él, nosotros los españoles), hasta que se tomaron en cuenta, por el mundo científico, cuando, en 1939, el mismo KÖNIG utilizó, junto con VON KLOBUSITZKY (31) la electroforesis sobre tiras de papel, embebidas en una disolución electrolítica, con el fin de aislar los constituyentes proteicos del pigmento amarillo de un veneno de serpiente, así como para separar mezclas de diversas sustancias colorantes. Es decir, que la electroforesis en papel es anterior, en algunos años, a la forma actual de la cromatografía en papel, que parte de la publicación *Qualitative Analysis of Proteins: A Partition Chromatographic Method Using Paper* (1944) de CONSDEN, GORDON y MARTÍN (32). Es entonces, a partir de los trabajos de estos autores, cuando la cromatografía bidimensional en papel adquiere un espléndido desarrollo, sobre todo, en el estudio de los aminoácidos.

También en 1939, STRAIN (15) sugirió la combinación de la ionoforesis con la cromatografía de adsorción, y, en el mismo año, COOLIDGE (16) separó proteínas en una columna a la que aplicaba un potencial eléctrico.

En 1940, PHILPOT (33) diseña un fraccionador electroforético que se basa en la migración vertical de las proteínas, distribuidas en capas delgadas y mantenidas así por efecto de un gradiente de densidad producido, a su vez, con ayuda de agua, glicerina y alcohol. JANSSEN (1949) (34) aprovecha el mismo principio de las capas delgadas, pero la estabilización de la migración la logra ya con ayuda de un «paquete» de papel de filtro. TISELIUS propuso producir el gradiente de densidad por medio de otro gradiente de temperatura, y, posteriormente, BRAKKE (1953) (35) describió la separación en zonas por centrifugación, con lo que, en realidad, se producía también un gradiente de densidad.

En 1948, HAUGAARD y KRÖNER (36) trabajaron en la separación de una mezcla de diez aminoácidos combinando el efecto cromatográfico del fenol con el electroforético de una corriente eléctrica de 100 voltios durante 16-18 horas, titulando su trabajo *Partition Chromatography of Amino Acids with Applied Voltage*.

Es posible que esta nomenclatura inicial fuera puramente casual. Pero

(30) KÖNIG, P., *Actas e trabalhos do Terceiro Congresso Sud-Americano de Química*, Rio de Janeiro e São Paulo, 2, 334 (1937).

(31) VON KLOBUSITZKY, D. y KÖNIG, P., *Arch. exp. Path. Pharm.*, 192, 271 (1939).

(32) CONSDEN, R., GORDON, A. H. y MARTÍN, A. J. P., *Biochem. J.*, 38, 224 (1944).

(33) PHILPOT, J. St. L., *Trans. Faraday Soc.*, 36, 38 (1940).

(34) JANSSEN, L. W., comunicación personal a SVENSSON y otros, *Science Tools*, 2, 17 (1955).

(35) BRAKKE, M. K., *Arch. Biochem. Biophys.*, 45, 275 (1953) [*Science Tools*, 1, 14 (1954)].

(36) HAUGAARD, G. y KRÖNER, T. D., *J. Amer. Chem. Soc.*, 70, 2135 (1948).

resulta curioso que, a pesar de que, después, la teoría de la cromatografía de partición no ha sido aplicada a la electroforesis de zonas, en la que los disolventes polares utilizados, en el caso de utilizar más de uno, son completamente miscibles entre sí, existen trabajos más recientes, tales como los de DURRUM (37), en los que se trata de aditivos no polares, como la glicerina y el propilenglicol, y los de PAUL y DURRUM (38), en los que se manifiesta que las separaciones pueden ser efectuadas en sistemas completamente no acuosos (*); estos hechos nos hacen pensar que los fenómenos de la cromatografía de partición tendrán que asociarse a los típicamente electroforéticos, para la explicación de los fenómenos electrocinéticos en estos casos particulares de la electroforesis de zonas. Realmente, este criterio está aceptado ya implícitamente por algunos autores, como SMITH y DURRUM (39), los cuales, frente a STRAIN y SATO, sostienen, que el término «electrocromatografía», usado por estos últimos en sentido general, debe reservarse para algunos casos especiales de separación electroforética, en las cuales interviene una clara adsorción diferencial.

La misma tendencia a asociar las técnicas cromatográficas y electroforéticas encontramos en los trabajos de WIELAND (40), (41) y FISCHER (41), en el mismo año 1948, cuyos autores estudian el desplazamiento electroforético de aminoácidos, poniendo unas gotas de disolución de los mismos en tiras de papel de filtro, empapadas en una solución tampón, sometiendo el sistema, así constituido, a la acción de la corriente eléctrica.

En el año siguiente, 1949, WIELAND extiende el procedimiento a otras sustancias, y, en 1950, manifiesta la posibilidad, no sólo de separar, sino también de determinar cuantitativamente, los distintos componentes de una mezcla proteica. McDONALD (42), también en 1950, estudia la separación de distintos iones, por acción de la corriente eléctrica, en disoluciones que empapan un papel de filtro, denominando al procedimiento «ionografía».

En el año 1950 fué fecundo en adelantos y estudios electroforéticos. En él se publican varios trabajos en los que aparece resuelto claramente el problema de la separación de las proteínas del suero sanguíneo por me-

(37) DURRUM, E. L., *J. Amer. Chem. Soc.*, **73**, 4875 (1951).

(38) PAUL, M. H. y DURRUM, E. L., *J. Amer. Chem. Soc.*, **74**, 4721 (1952).

(*) Entre los sistemas no acuosos, utilizados por estos autores en la separación de distintos colorantes entre sí, se citan las mezclas de nitrometano y ácido acético glacial, de alcohol etílico absoluto y metanol, de piridina y acético glacial e incluso el «sistema» constituido por alcohol etílico simplemente.

(39) SMIT, E. R. B. y DURRUM, E. L., *Chem. Eng. News*, **32**, 2174 (1954).

(40) WIELAND, T., *Angew. Chem.*, **A60**, 313 (1948).

(41) WIELAND, T. y FISCHER, F., *Naturwissenschaften*, **35**, 29 (1948).

(42) McDONALD, H. J., URBIN, M. C. y WILLIAMSON, M. B., *Science*, **112**, 227 (1950) [C. A., **44**, 10463 i (1950)]; *J. Colloid Sci.*, **6**, 236 (1951); *J. Amer. Chem. Soc.*, **73**, 1893 (1951).

dio de métodos electroforéticos, en los cuales la disolución tamponada de suero no se encuentra libre, en el clásico tubo en U de TISELIUS, sino empapando un papel de filtro, que constituye su soporte sólido. Entre estos trabajos, que ponen de manifiesto la utilidad irremplazable de los métodos electroforéticos para separar componentes, en general macromoleculares, de una mezcla, destacan los de DURRUM (43), TURBA y ENENKEL (44), BISERTE (45), CREMER y TISELIUS (46), GRASSMANN y HANNIG (47) y KÖRVER (48), que, en su mayor parte, se refieren a la separación de seroproteínas.

Los procedimientos de electroforesis en papel, pese a que esta ingente floración inicial pareciera haber agotado todas las posibilidades de perfeccionamiento, no han permanecido tal como se iniciaron, sino que han sido susceptibles de numerosos refinamientos.

Un último período, que enlaza con el actual, se ha caracterizado por una tendencia progresiva hacia el perfeccionamiento de las técnicas. A título de ejemplo, podemos considerar las modificaciones de DURRUM (1951) (49), entre las que cabe destacar la forma de V invertida en que dispone la tira de papel, disposición que ha sido la adoptada también por FLYNN y DE MAYO (1951) (50), combinada con la de CREMER y TISELIUS, y por MACHEBOEUF y colaboradores (1953) (51) y otros. Asimismo hemos de citar la importante contribución de GRASSMANN y HANNAG (1952) (52), cuyos aparatos se caracterizan, entre otras cosas, por la disposición horizontal del papel en una cámara de gas húmedo. Otras modificaciones, de diversos autores, se refieren al empleo de líquidos apropiados para corregir o evitar interferencias de factores extraños a los propiamente electroforéticos, como ocurre, por ejemplo, en la disposición de CREMER y TISELIUS (1950) (53), en la de CONSDEN y STANIER (1952) (54) y en otras muchas, en las que, por ejemplo, la tira de papel, horizontal, se sumerge en un líquido no polar para eliminar el calor desarrollado. También pueden citarse las modificaciones de VALMET y SVENSSON (1954) (55), cuyas principales características (pequeño volumen de la cámara, posibilidad de de-

(43) DURRUM, E. L., *J. Amer. Chem. Soc.*, 72, 2943 (1950).

(44) TURBA, F. y ENENKEL, H. J., *Naturwissenschaften*, 37, 93 (1950).

(45) BISERTE, G., *Biochim. et Biophys. Acta*, 4, 416 (1950).

(46) CREMER, H. D. y TISELIUS, A., *Biochem. Z.*, 320, 273 (1950) [*C. A.*, 44, 7376 e (1950)].

(47) GRASSMANN, W. y HANNIG, K., *Naturwissenschaften*, 37, 397 (1950).

(48) KÖRVER, G., *Klin. Wochschr.*, 28, 693 (1950) [*C. A.* 45, 3448 g (1951)].

(49) DURRUM, E. L., *Science*, 113, 66 (1951).

(50) FLYNN, F. V. y DE MAYO, P., *Lancet*, 261, 235 (1951) [*C. A.*, 46, 5117 c (1952)].

(51) MACHEBOEUF, M., RUBRYROTTE, P., DUBERT, J. M. y BRUNERIE, M., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 35, 334 (1953).

(52) GRASSMANN, W. y HANNIG, K., *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, 290, 1 (1952).

(53) CREMER, H. y TISELIUS, A., *Biochem. Z.*, 320, 273 (1950) [*C. A.*, 44, 7376 e (1950)].

(54) CONSDEN, R. y STANIER, W. M., *Nature*, 170, 1069 (1952).

(55) VALMET, E. y SVENSSON, H., *Science Tools*, 1, 3 (1954).

positar la muestra después de saturada aquélla, etc.) son, fundamentalmente, las mismas descritas, ya antes, por DETTKER y ANDUREN (1953) (56) y por otros. McDONALD y col. (1955) (57) adoptan, más tarde, aparatos y técnica semejantes a los de GRASSMANN y HANNIG (1952) (52).

Así podríamos seguir enumerando autores cuyos trabajos, en este campo de la electroforesis analítica en papel, han permitido a ésta llegar al estado actual de desarrollo en que se encuentra. No obstante, consideramos que el grado de perfeccionamiento, con haber sido enorme, no ha alcanzado todavía las verdaderas dimensiones a que cabe aspirar. y estimamos que, en la mayoría de los casos, se ha procedido con excesiva rapidez a la comercialización de dispositivos, que aún no eran perfectos, quizás con el buen deseo de dotar a la ciencia y a la industria de instrumentos de trabajo. Por ello queda justificado el objeto de una gran parte de nuestro trabajo en la que, como podrá deducirse de esta Memoria, se ha pretendido revisar hasta qué punto influyen los diversos factores que controlan los procesos electroforéticos y a los que, en la bibliografía, se les atribuye unas veces excesiva importancia, mientras que, en otras ocasiones, se desprecian, no muy justificadamente.

También debe destacarse el creciente interés que ofrece, incluso desde un punto de vista técnico, la llamada «electroforesis continua». Pero nos llama la atención que el número de publicaciones sobre este punto y, más aún, el de investigadores dedicados al estudio de esta modalidad, es bastante escaso. Las escuelas de GRASSMANN y HANNIG y de DURRUM pueden citarse como las más representativas, sin que esto disminuya la importancia de los trabajos de otros autores, como STRAIN y SULLIVAN (1951) (58), SATO y NORRIS (1952) (59), DI CASTRO y SAN MARCO (60) y otros. Nosotros, modestamente, podemos considerarnos también como contribuidores al estudio de esta técnica que tantas posibilidades ofrece. Es probable que en la bibliografía se hayan ocultado adquisiciones logradas en su conocimiento, quizás pensando en su proyección industrial, ya que, a nuestro criterio, sus posibilidades de aplicación son evidentes, como tendremos ocasión de exponer en la parte final de este trabajo.

Hoy día, las técnicas electroforéticas en papel, tanto en escala analítica como en escala preparativa (lo que se puede hacer corresponder, en un sentido amplio, con las modalidades de electroforesis discontinua y con-

(56) DETTKER, A. y ANDUREN, H., *Scand. J. clin. Lab. Invest.*, 6, 74 (1953).

(57) McDONALD, H. J., LAPPE, R. J., MARDACH, E. P., SPITZER, R. H. y URBIN, M. C., *Ionography; Electrophoresis in Stabilized Media*, Year Book Publishers, Chicago, 1955 [*Ciba Symposium on Paper Electrophoresis*, J. and A. Churchill Ltd., London, 1956, pág. 95. En lo sucesivo, se usará la abreviatura «Ciba Sym. 1956», para referirnos a esta publicación].

(58) STRAIN, H. H. y SULLIVAN, J. G., *Anal. Chem.*, 23, 816 (1951).

(59) SATO, T. R., NORRIS, W. P. y STRAIN, H. H., *Anal. Chem.*, 24, 776 (1952)

(60) DI CASTRO, D. y SAN MARCO, M., *J. Chem. Soc.*, 4157 (1954).

tinua, respectivamente) han alcanzado una importancia tal, que han llegado a hacerse insustituíbles para una amplísima gama de cuestiones, desde las que tienen un interés puramente científico, hasta las de importancia eminentemente práctica ya sea desde un punto de vista clínico, ya por un fin técnico, como antes se ha apuntado, especialmente, en el fraccionamiento industrial de materiales biológicos. En principio, la importancia se manifiesta más claramente en el tratamiento de sustancias de carácter macromolecular, pero ello no excluye a las de pequeño tamaño, puesto que lo que ocurre realmente es que, para estas últimas, los métodos electroforéticos se presentan, más que como esenciales, como mejorantes de otras técnicas con las que quizás se logra ya el efecto deseado. Este es, por ejemplo, el caso de los aminoácidos; su tratamiento constituyó un problema difícil hasta el advenimiento de la cromatografía, pero, realmente, el uso combinado de aquélla con la electroforesis, o incluso una adecuada aplicación de esta última, suponen un ahorro de tiempo extraordinario para lograr los mismos efectos, cuando no una mejora de resultados. Este ejemplo que hemos referido para los aminoácidos podríamos extenderlo a otros muchos casos, algunos todavía muy poco conocidos, sin duda porque no se ha abundado en su estudio. Entre estos estudios, incompletos todavía, puede citarse, como uno de los que más relativa atención han merecido, el de la separación electroforética de mono-, oligo- y polisacáridos individuales que se encuentran en mezcla «homogénea», en cuanto a tamaño molecular se refiere. Otro tanto podría decirse de los lípidos. No obstante lo indicado, el conocimiento actual sobre éstos y otros principios inmediatos es suficiente para prever que la electroforesis encontrará su marco más natural de aplicación en el campo de la bioquímica y, en general, en el de la química de productos naturales.

No hay duda de que, para la marcha general de los trabajos del Departamento de Frutos y Conservas, al que pertenecemos, las técnicas electroforéticas constituyen un medio de trabajo de la máxima utilidad, lo que justifica, sobradamente, el interés con que se nos asignó y con que hemos realizado este trabajo, con el doble fin, científico y utilitario, que podrá apreciarse a lo largo de esta Memoria, en la que se recoge la labor realizada para la puesta a punto de la técnica, en unas condiciones mejoradas y adaptables a nuestros problemas, que, simultáneamente, nos han permitido esclarecer algunos de los procesos íntimos en que la técnica se basa, al haber controlado, sucesiva y alternativamente, los diversos factores que afectan la eficacia del procedimiento.

II

FUNDAMENTOS TEORICOS Y EXPERIMENTALES DE LA ELECTROFORESIS EN PAPEL: ALGUNAS DE SUS RELACIONES CON LA ELECTROFORESIS LIBRE

Como hemos dicho anteriormente, la electroforesis, en general, consiste en la separación de distintas sustancias disueltas, valiéndonos de sus distintas velocidades de migración en un campo eléctrico. El caso más clásico, de electroforesis propiamente dicha, es el de las micelas coloidales, que se trasladan, a través del medio en que se hallan dispersas, por efecto de la fuerza electromotriz de dicho campo.

En general, todas las partículas coloidales soportan una carga eléctrica que se demuestra, precisamente, por la electroforesis (llamada en un principio, «cataforesis»), es decir, por la migración de las partículas hacia un polo o hacia otro, de signo contrario a sus cargas respectivas, cuando pasa, a través del medio donde se encuentran, una corriente continua.

Algunos tipos de partículas coloidales, en presencia de electrolitos, presentan tendencia a adsorber exceso de iones positivos, mientras que otras adsorben con preferencia los negativos, quedando así cargadas con signo positivo o negativo, respectivamente. De ahí su comportamiento diferente en la electroforesis, que ha dado lugar a la clasificación de los coloides en los dos grupos de «catiónicos» y «aniónicos», según se desplacen hacia el polo negativo (cátodo) o hacia el positivo (ánodo), respectivamente.

Los factores que gobiernan la migración electroforética son múltiples, pero pueden quedar reunidos en tres grupos principales:

a) Factores inherentes a la partícula electroforética en sí: carga de la misma (signo y magnitud), tamaño, forma, tendencia a la disociación o asociación y posible anfoterismo.

b) Factores que dependen del medio en cuyo seno se mueve la partícula : concentración electrolítica, constante dieléctrica, fuerza iónica, pH y propiedades químicas en general, temperatura, viscosidad, posibilidad de formación de complejos de la partícula con el medio, etc., así como también aquellos que dependen del soporte en el cual tiene lugar el proceso electroforético.

c) Características del campo eléctrico aplicado: intensidad, ausencia de corrientes parásitas (pureza de corriente o ausencia de componentes de alterna) y distribución del campo a lo largo del camino de migración.

Como se comprenderá, ante la multiplicidad de factores que intervienen en el proceso electroforético, y sus numerosas interacciones, el fenómeno es muy complejo y su físicoquímica bastante complicada. Por esto, en el presente trabajo, sólo consideraremos detenidamente aquellos factores que, al menos en principio, pueden influir en los resultados de cualquiera de las aplicaciones prácticas de la electroforesis.

EXPRESIÓN MATEMÁTICA DE LA VELOCIDAD ELECTROFORÉTICA

LAMB, basándose en los trabajos de HELMHOLTZ, dedujo una ecuación que expresa la velocidad de desplazamiento (distancia recorrida por unidad de tiempo) de una partícula esférica, con carga, cuando actúa sobre ella un campo eléctrico; a esta partícula se la supone libre de interacciones eléctricas, al admitir que se encuentran formando parte de una disolución a dilución infinita en la que se admite ausencia de electrolitos. La ecuación de LAMB, algo modificada (61) (62), viene dada por la fórmula siguiente:

$$v = \frac{QH}{6 \pi r \eta}$$

en la que, Q = carga eléctrica de la partícula, la cual determina una diferencia de potencial entre la partícula y el líquido.

H = intensidad del campo eléctrico aplicado (diferencia de potencial entre los electrodos, dividido por la distancia que separa a ambos).

r = radio de la partícula, y

η = viscosidad del medio.

Esta expresión, naturalmente, es correcta cuando las magnitudes que en ella intervienen están dadas en unidades congruentes. En el caso, fre-

(61) DEBYE, P. y HÜCKEL, E., *Phys. Z.*, 25, 49 (1924).

(62) HÜCKEL, E., *Phys. Z.*, 25, 204 (1924).

cuenta, de expresar la velocidad en centímetros/segundos, Q en culombios (unidad práctica de carga), H en voltios/centímetro (unidad convencional de campo y r y η , respectivamente, en centímetros y poises (unidades cegesimales de longitud y viscosidad), existe una falta de congruencia entre los distintos términos de la fórmula de HELMHOLTZ, por lo que, para que v venga expresado en cm/seg será preciso introducir el factor de corrección 10^7 .

De esta fórmula se deduce que la velocidad de desplazamiento de una partícula, en estas condiciones, es directamente proporcional a su carga y a la intensidad de campo e inversamente proporcional a la viscosidad de la solución y al radio de la partícula.

Esta y otras fórmulas matemáticas elementales, que rigen los diversos fenómenos fundamentales del proceso electroforético, no han sido, la mayoría de las veces, tratadas con suficiente claridad. En otras ocasiones, con el fin de simplificar la exposición en los textos, aparecen, dichas fórmulas, como de presentación espontánea. Por ello, estimamos oportuno el exponer, con cierto detalle, una deducción razonada, aunque sencilla, de las mismas.

Partiendo de la idea, antes expuesta, de considerar unas condiciones ideales en las que no existe interacción de partículas, dada la dilución infinita de la disolución, la fuerza F ejercida por un campo eléctrico sobre una de tales partículas es igual al producto de la intensidad de campo, H , por la carga neta, Q , de la partícula:

$$F = H Q \quad (\text{II-1})$$

Una partícula cualquiera, bajo la acción de un campo de intensidad constante, debería adquirir, lógicamente, un movimiento uniformemente acelerado; sin embargo, su movimiento es uniforme y su velocidad constante, lo cual es debido a que a la fuerza de campo se opone otra fuerza creciente de viscosidad, F' , que es función lineal de la aceleración. Esta fuerza de viscosidad depende de la geometría de la partícula, y, para una esfera, viene dada por la ley de STOKES:

$$F' = 6 \pi r \eta v \quad (\text{II-2})$$

en donde, r es el radio de la partícula,
 η , la viscosidad del medio, y
 v , la velocidad electroforética de dicha partícula.

Cuando la partícula se encuentre en un estado estacionario se verifi-

cará que las fuerzas de campo eléctrico y las de viscosidad serán iguales ($F = F'$); por lo tanto, de (II-1) y (II-2), se deduce:

$$H Q = 6 \pi r \eta v$$

de donde,

$$v = \frac{HQ}{6\pi r \eta} \quad (\text{II-3})$$

que es la fórmula dada al principio de este capítulo.

EXPRESIÓN MATEMÁTICA DE LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA

Existe una magnitud, a la que se da el nombre de «movilidad electroforética», que es característica de cada partícula, y se define como el cociente entre la velocidad de desplazamiento de la misma y la intensidad de campo, H , ya definida. Según esto, la movilidad electroforética representará la velocidad de la partícula por unidad de campo.

En la electroforesis libre, dicha magnitud, u , vendrá dada por la ecuación:

$$u = \frac{d}{t} : H = \frac{d}{t} : \frac{V}{l} = \frac{d \cdot l}{t \cdot V} \quad (\text{II-4})$$

en donde, d es el desplazamiento de la partícula en el tiempo t , V la diferencia de potencial aplicada y l la longitud del tubo.

Si se tiene en cuenta la definición que acabamos de dar u ($u = \frac{v}{H}$) y la ecuación (II-3), esta magnitud podrá expresarse por la fórmula siguiente:

$$u = \frac{\frac{HQ}{6\pi r \eta}}{H} = \frac{Q}{6\pi r \eta} \quad (\text{II-5})$$

que vendrá también afectada por el factor 10^7 cuando Q se dé en culombios. r en centímetros y η en poises, viniendo dada, entonces, u en cm/seg. cm/vol.

La movilidad electroforética es característica de cada partícula a pH y fuerza iónica determinados; es decir, que, para un conjunto de condi-

ciones experimentales dado, la movilidad será el factor fundamental que caracterizará a cada partícula, o fracción homogénea de partículas, por la posición alcanzada por las mismas, es decir, en el caso concreto de la electroforesis en papel, por su situación en el espectro electroforético analítico.

Ahora bien, éste no es verdaderamente el caso práctico de la electroforesis en papel, sino solamente una situación ideal, puesto que las condiciones puestas al principio no se cumplen en la práctica, ni aún siquiera en la electroforesis libre, ya que siempre existen, en concentraciones apreciables, diversos electrolitos (tampones u otras disoluciones salinas), entre cuyos iones y las partículas electroforizables se producen lógicamente interacciones eléctricas, que no se dan a dilución infinita y que ocasionan modificaciones en la velocidad de desplazamiento de estas últimas.

Refiriéndonos ahora concretamente a la electroforesis en papel (en ella el campo eléctrico se crea sobre una tira de papel de filtro), debe advertirse en primer lugar, que, si bien el principio fundamental que gobierna la separación de los componentes de una mezcla es aquí el mismo que en el caso de la electroforesis, ya clásica, de TISELIUS, entran ahora en juego una nueva serie de factores (corrientes de difusión por evaporación, efectos de capilaridad, electroósmosis, etc.), motivados, sobre todo, por la presencia y características del soporte, mientras, en contraposición, dejan de tener importancia otros factores (convección, efecto de pared, etc.) que, en la libre, no pueden despreciarse. Además de esto, debemos llamar la atención sobre el subjetivismo con que se han considerado, en la bibliografía, los diferentes factores que influyen en la electroforesis soportada, pues, normalmente, cada autor destaca la importancia de aquel factor que ha sido objeto de su mayor atención, por la índole del instrumental utilizado o del problema concreto que le ocupa, menospreciando, prácticamente, los restantes. Nosotros, en la medida de nuestras posibilidades, hemos pretendido tratar el problema con toda objetividad y hacer una discusión, que, sin llegar a ser exhaustiva, abarcase a una gama amplia de circunstancias.

En general, nuestra labor experimental ha sido consecuencia de una consideración lógica, previa, de las condiciones de trabajo, y, por tanto, nuestros experimentos han tendido principalmente a confirmar nuestras deducciones teóricas, más que a servir de base a explicaciones a posteriori, aunque tampoco hemos prescindido de éstas en los casos aislados en que se hicieron necesarias por presentarse casualmente fenómenos diversos, cuya interpretación hemos intentado asimismo llevar a cabo.



III

INFLUENCIA DEL SOPORTE EN LA ELECTROFORESIS
SOBRE PAPEL

De acuerdo con el punto de vista expresado al final del capítulo anterior, cuando se utiliza el papel de filtro como soporte sólido del medio en que se produce la migración electroforética, y a la vista de su especial poder adsorbente, es de suponer que pueda ejercer acciones sobre las partículas móviles, secundarias con respecto al fin fundamental, y que producirán, en definitiva, un retardo en la electromigración. No hay duda de que este efecto es previsible; parte de nuestros experimentos han servido para confirmarlo plenamente.

Lo mismo podemos decir de otros factores, que, modificando, por ejemplo, ese poder de adsorción ineludible del soporte, afectan igualmente al proceso. Por ello, también han sido objeto de nuestra atención, con resultados que se expondrán más adelante.

A su vez, estos factores pueden ser de dos clases: a) de tipo puramente físico, como los que se refieren al grado de porosidad, activación termodinámica, etc., o b) eminentemente químicos, como aquellos que dependen del número y clase de grupos modificados de la celulosa (grupos metoxilos, urónicos, reductores, etc.) o incluso los que, si bien no son inherentes a la celulosa *per se*, en ocasiones pueden determinar el que ésta vaya acompañada de grupos de iones activos, extraños a la misma, que han sido retenidos, físicas o químicamente, durante el tratamiento seguido en su preparación.

Estos y otros factores han de tenerse en cuenta para el estudio teórico de la electromigración en la celulosa, considerada como sistema capilar



(electroforesis en papel o capilar), si bien es preciso despreciar aquellos otros que influyen en menor cuantía, al objeto de simplificar la discusión matemática.

CORRECCIÓN DE FÓRMULAS

KUNKEL y TISELIUS (63) (1951), a los que se debe la teoría de la electroforesis en papel, pusieron ya de manifiesto algunas diferencias entre ésta y la electroforesis libre. Así, demostraron, por primera vez, que las dos fórmulas típicas de la intensidad de campo en la segunda:

$$\frac{V}{l} \quad \frac{I}{S \cdot k}$$

cuya deducción veremos después, no se cumplen exactamente en la electroforesis soportada, ya sea sobre papel o ya sobre cualquier otro medio poroso. Tampoco serán aplicables aquí las fórmulas dadas anteriormente para la movilidad electroforética de las partículas.

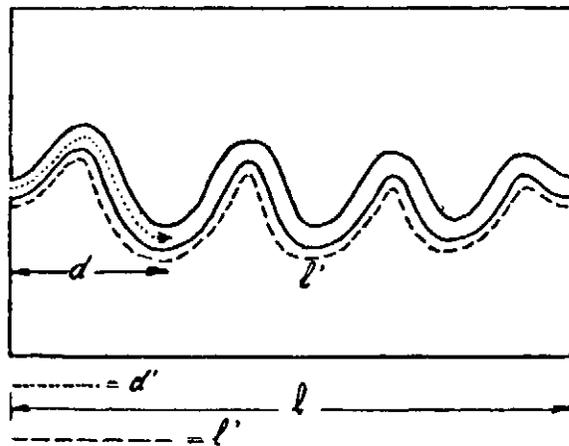


Fig. 1.—Camino teórico de la migración electroforética a través del papel de filtro

Ello es debido a que, en la electroforesis en papel, l no representa la distancia verdadera entre los puntos donde se aplica la diferencia de potencial, sino que, como puede observarse en el esquema de la fig. 1, correspondiente a la representación que KUNKEL y TISELIUS (63) hacen del

(63) KUNKEL, H. G. y TISELIUS, A., *J. Gen. Physiol.*, 35, 89 (1951).

papel, como sistema de canales serpenteantes, dicha distancia es mucho menor que la real, l . De esta manera, las partículas, en el papel, siguen una trayectoria tortuosa, entre los intersticios que dejan las fibras de celulosa inmóviles, y, en consecuencia, su recorrido real, d , será mayor que el aparente, d' (*).

Existiendo la misma relación entre las distancias electródicas, real y aparente, que entre los recorridos, real y aparente, también, de la partícula, podemos escribir la siguiente proporción:

$$\frac{d'}{d} = \frac{l'}{l}$$

de donde deducimos que

$$d' = d \frac{l'}{l} \quad (\text{III-1})$$

Si una partícula emigra en la electroforesis libre una distancia d , su movilidad electroforética vendrá dada por la ecuación (II-4), ya conocida:

$$u = \frac{d \cdot l}{t \cdot V} \quad (\text{II-4})$$

movilidad, que, en la electroforesis en papel, tendríamos que expresar en función de la distancia real, d' recorrida por la partícula, así como de la separación interelectródica verdadera, l' . Según esto, tendríamos:

$$u = \frac{d' \cdot l'}{t \cdot V} \quad (\text{III-2})$$

que también podría expresarse en función de la distancia aparente, d , sustituyendo d' por su valor dado en (III-1):

$$u = \frac{d \cdot \frac{l'}{l} \cdot l'}{t \cdot V} = \frac{d \cdot \frac{l'^2}{l}}{t \cdot V}$$

Dividiendo numerador y denominador por l , y efectuando operaciones, se llega a la expresión siguiente

$$u = \frac{d \cdot l}{t \cdot V} \left(\frac{l'}{l}\right)^2 \quad (\text{III-3})$$

que se diferencia de la (II-4) en el factor $\left(\frac{l'}{l}\right)^2$

(*) Por analogía con el concepto de camino óptico, de la Física, que entra en juego en el principio de FERMAT de la Óptica, proponemos, para las distancias d y d' , la denominación de «camino geométrico» y «camino electroforético», respectivamente.

Podría definirse, asimismo, para la electroforesis en papel, la «movilidad electroforética aparente», u_a , de una partícula que sería la obtenida según la ecuación (II-4), para los valores aparentes de d y l , en el papel. Su relación con la movilidad verdadera, según se deduce de la comparación de (III-3) y (II-4), viene dada por el factor $(l/l')^2$, de manera, que, considerando a la inversa dicha relación, podremos escribir:

$$u = \frac{u_a}{\left(\frac{l}{l'}\right)^2} \quad (\text{III-4})$$

relación de gran utilidad en el cálculo práctico de movilidad corregidas.

La expresión (II-4), para la electroforesis libre, puede transformarse, teniendo en cuenta la ley de OHM ($V=R.I$) y el valor de la resistencia R que en ella interviene, en función de las características del conductor, de esta otra manera:

$$u = \frac{d \cdot l}{t \cdot V} = \frac{d \cdot l}{t \cdot R \cdot I} = \frac{d \cdot l}{t \cdot \frac{l}{k} \cdot \frac{l}{s} \cdot I} = \frac{d \cdot k \cdot s}{t \cdot I} \quad (\text{III-5})$$

en donde, I es la intensidad de corriente, k la conductividad específica del tampón y s el área de la sección transversal del tubo.

En el caso de la electroforesis en papel, puede aplicarse igualmente esta última fórmula, sustituyendo d por d' y s por s' , con la cual tendremos:

$$u = \frac{d' \cdot k \cdot s'}{t \cdot I} \quad (\text{III-6})$$

siendo s' el área de la sección transversal (sección útil de tampón), distinta de la anterior, y cuyo valor puede determinarse pesando la cantidad de tampón que retiene el papel (diferencia entre el peso de la tira de papel, inmediatamente después de finalizar el experimento, y el de la misma tira seca, pesada previamente), dividiendo por el peso específico del tampón, para obtener su volumen, y, finalmente, dividiendo este volumen por la longitud de la tira de papel considerada.

Sustituyendo, en esta última ecuación, d por su valor, dado en (III-1), se obtiene:

$$u = \frac{d \cdot \frac{l'}{l} \cdot k \cdot s'}{t \cdot I}$$

o lo que es igual:

$$u = \frac{d \cdot k \cdot s'}{t \cdot I} \cdot \frac{l'}{l} \quad (\text{III-7})$$

expresión que, en su forma, difiere de la (III-5) en el factor (l'/l), a cuyo inverso (l/l') se le llama, propiamente, «factor de corrección» el cual depende principalmente del papel, siendo una constante característica de la clase del mismo, y, en menor grado, de la técnica utilizada.

T A B L A 1 (**)

CLASES DE PAPEL	$u_a \cdot 10^3$	l/l'	$u_c \cdot 10^3$
Munktell 20	$4,01 \pm 0,09$	$0,77 \pm 0,03$	6,78
Papel secante Ford	$3,21 \pm 0,12$	$0,70 \pm 0,04$	6,53
Schleicher y Schüll 413	$2,34 \pm 0,21$	$0,58 \pm 0,06$	6,85

Este factor ha sido determinado experimentalmente para diversos tipos de papeles, sobre la base de la movilidad aparente, u_a , de la albúmina del suero humano. A continuación recogemos una tabla (Tabla 1) que resulta ya familiar en los tratados de electroforesis (*) hasta el punto de que en todos ellos se prescinde de señalar su origen y, por toda indicación, se refiere que dichas determinaciones se han efectuado con tampón de veronal de pH 8,8 y fuerza iónica 0,1.

T A B L A 2 (**)

CLASES DE PAPEL	$u_a \cdot 10^3$	l/l'	$u_c \cdot 10^3$
Archés n.º 301	$5,16 \pm 0,13$	$0,92 \pm 0,02$	$6,17 \pm 0,10$
Whatman n.º 1	$4,24 \pm 0,02$	$0,83 \pm 0,03$	$6,16 \pm 0,45$
Electroforesis libre	—	—	6,43

Como quiera que en la bibliografía que nos ha sido posible consultar no hemos encontrado datos referentes a los papeles Archés n.º 301 y Whatman n.º 1, que son los que con más frecuencia hemos utilizado nosotros, siendo además los de uso más difundido, estimamos conveniente el determinar el factor l/l' para cada uno de ellos, por lo que nos permitimos ampliar la tabla anterior con una supletoria (Tabla 2) que reco-

(*) WUNDERLY, Cu., *La Electroforesis en Papel*, Ed. Científico-Médica, Barcelona, 1956, pág. 8. METAIS, P., *Biologie Médicale*, 14, 648 (1956). LEDERER, M., *Paper Electrophoresis*, Elsevier Publishing Company, Amsterdam-London-New York-Princeton, 1957, pág. 28.

(**) Las movilidades electroforéticas, en todos los casos, se expresan en $\text{cm}^2 \cdot \text{seg}^{-1} \cdot \text{vol}^{-1}$.

ge nuestros resultados, si bien los detalles de determinación se expondrán en el Apéndice Experimental que figura al final de esta Memoria. Estos datos corresponden a los valores medios de cuatro determinaciones efectuadas sobre electroforegramas obtenidos con tampón de veronal de pH 8,6.

Como puede observarse, con el uso del factor de corrección determinado, se obtienen valores de la movilidad corregida o real, u_c , bastante próximos a los medidos en la electroforesis libre.

Así resulta que, para la albúmina del suero, la movilidad corregida de acuerdo con la clase de papel, es siempre mayor que la movilidad aparente, debido a que el recorrido real de las partículas, en el papel de filtro, es también mayor que el aparente, puesto que parte del curso tortuoso que aquéllas siguen en él, no se pone de manifiesto; y, como quiera que el recorrido interviene en la fórmula de la movilidad, el valor de ésta resulta afectado.

Una prueba interesante del valor de estas correcciones la constituye el hecho, comprobado ya para la albúmina, de coincidir sensiblemente los valores medios de las movilidades en el papel, ya corregidas, con los obtenidos por diversos autores en la electroforesis libre para las mismas sustancias. Entre estos últimos valores, presentamos, en la Tabla 3, los resultados de DOLE, (64), para las distintas fracciones proteínicas del sue-

T A B L A 3

Electroforesis	t/t'	$u_{\text{corregida}} \cdot 10^5 \text{ (cm}^2 \cdot \text{seg}^{-1} \cdot \text{vol}^{-1}\text{)}$				
		Albúmina	Globulinas			
			α_1	α_2	β	γ
Sobre papel (Archés 301)	0,98	5,36±0,03	4,39±0,02	2,76±0,03	2,33±0,04	0,57±0,01
Libre (DOLE)	--	5,94	5,07	2,83	2,83	1,02

ro humano, como término de comparación de los obtenidos por nosotros en la electroforesis sobre papel. Nuestros resultados corresponden a los valores medios de tres determinaciones efectuadas sobre papel Archés 301. El valor del factor de corrección utilizado en este caso difiere del determinado anteriormente, para la misma clase de papel, debido a que la última determinación del mismo se ha efectuado utilizando el valor

(64) DOLE, V., *J. Clin. Invest.*, 23, 708 (1944).



5,94 para la movilidad real de la albúmina, mientras que antes se tomó, para la misma, el valor 6,43.

Según diversos autores, la corrección de la movilidad electroforética parece más necesaria en el caso de utilizar aparatos en los que las tiras de papel se disponen entre dos placas de vidrio, que cuando se utilizan aquéllos en los cuales las tiras quedan al aire. Nosotros, a la vista de los resultados obtenidos con ambas técnicas, estimamos conveniente el uso del factor de corrección, en cuanto a la obtención de valores absolutos de movilidades, aunque, desde luego, el error que se cometería, en el caso de no utilizarlo, sería menor para la técnica indicada. No obstante, podemos advertir que, a nuestro criterio, la corrección de movilidades resulta de poca utilidad en la práctica, dados los fines, usualmente comparativos, para los cuales estudiamos principalmente nosotros las técnicas electroforéticas sobre papel.

Trabajando con tampón de veronal/veronal sódico de pH 8,6, de ácido bórico/borato sódico de igual pH que el anterior y de ftalato ácido de potasio/hidróxido sódico, de pH 5,9, llegamos a la conclusión de que el factor de corrección l/l' es independiente del tampón empleado, ya que las pequeñas diferencias encontradas para dicho factor, según se haya obtenido a partir de experimentos realizados con unos u otros tampones, nos parecen perfectamente atribuibles a errores de medida.

COMPONENTES ESTÉRICOS DE LA SUSTANCIA

Otros factores, entre los que quedan por considerar, están ya relacionados más directamente con la sustancia problema. Por ejemplo, en el caso de las proteínas del suero, que, aunque con distinto peso molecular, poseen forma esférica casi igual (según se observa en las fotografías óptico-electrónicas), McDONALD y SPITZER (65) señalaron que un factor que tiene gran influencia, sobre la migración en el papel, es el volumen de las partículas, lo cual se hace ostensible, sobre todo, si se compara lo que ocurre con partículas coloidales, en general, con lo que sucede con iones inorgánicos, y en especial, con aminoácidos, cuya movilidad es la que menos se modifica por la clase de papel. Por esto, en aquel caso, además de la constante dependiente de la clase de papel utilizado, hay que tener en cuenta un componente estérico, que depende de la forma de la sustancia que emigra. Parecè ser, pues, que la marcha de las partículas sobre el papel es función, no sólo de la carga por unidad de masa, sino también del tamaño y forma de las mismas. De este modo, la asociación de mo-

(65) McDONALD, H. y SPITZER, R., *Circulation Research*, **1**, 396 (1953) [C. A., **47**, 11274 g (1953)].

léculas, que se supone tiene lugar en la desnaturalización de proteínas, puede ser considerada, en parte, como responsable del retardo que se produce sobre el papel en algunos casos; sin embargo, la movilidad en el líquido (electroforesis libre) apenas es afectada, pues en este caso sólo depende, prácticamente, de la carga por unidad de masa de las partículas. Si una sustancia determinada es homogénea en su carga, pero no lo es en su forma, la electroforesis en papel podrá revelar, y de hecho revela, heterogeneidades que no acusa la electroforesis libre.

Este hecho hemos podido comprobarlo con la albúmina del suero humano, que, aislada por nosotros por medio de electroforesis continua, aparece perfectamente homogénea en la electroforesis analítica, manifestándose como una mancha bien delimitada (véase banda superior de la figura 2) y en el lugar del espectro que le corresponde de acuerdo con su movilidad electroforética, determinada, a su vez, con bastante aproximación, en electroforesis analíticas de sueros integrales. Pero, si por medio de un calentamiento previo desnaturalizamos esta misma albúmina, y, en igualdad de condiciones que para el caso anterior, le hacemos ahora un nuevo análisis electroforético, entonces, en vez de una mancha única y bien definida, obtenemos un rastro continuo de la albúmina, cuyo desplazamiento máximo es menor (véase figura 2, banda inferior). Esto nos hace

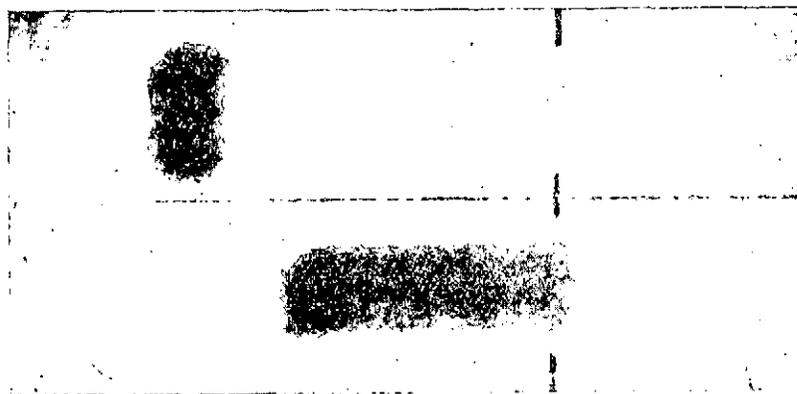


Fig. 2.—Pista superior: electroforegrama de seroalbúmina. Pista inferior: electroforegrama de la misma seroalbúmina desnaturalizada

suponer que el calentamiento de la albúmina ha originado agregados de moléculas (albúmina desnaturalizada) cuyas características estéricas son muy diferentes entre sí, por lo cual sus movilidades también lo serán, manifestándose este hecho por la aparición de un espectro electroforético continuo, en el que existirá una graduación, también continua, de movilidades, que se corresponden con los diferentes grados de asociación molecular.

Según MACHEBOEUF y REBEYROTTE (66), en un ensayo semejante con albúmina de caballo, aparecía ésta como perfectamente homogénea en la electroforesis libre, mientras que la electroforesis en papel ponía de relieve el fenómeno de la desnaturalización.

Prácticamente hablando, es imposible que, en la electroforesis en papel, dos sustancias de carga, peso molecular y forma diferentes, pero en condiciones experimentales idénticas, emigren con la misma velocidad o sean adsorbidas con igual intensidad. Esas dos sustancias aparecerán siempre, después de la electroforesis, ocupando posiciones distintas en el papel. En consecuencia, si dos sustancias se localizan en la misma posición, es decir, muestran la misma movilidad, debe admitirse, o bien que ambas sustancias son idénticas, o bien que entre ellas se da cualquier tipo de unión que determina la formación de una nueva especie química en las condiciones del experimento.

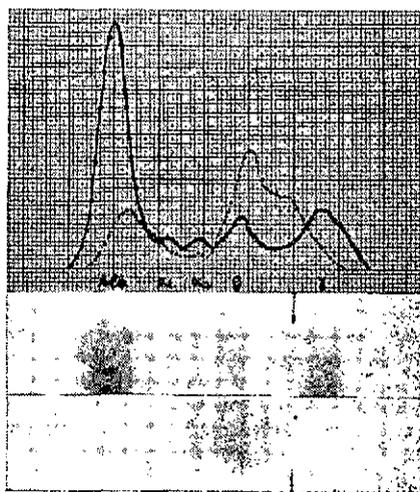


Fig. 3.—Comparación de proteiograma (línea continua) y lipoproteiograma (línea interrumpida) de un suero humano

Personalmente, encontramos una comprobación de esta sugerencia en la obtención del lipoproteiograma humano, en el que, como se sabe, y nosotros confirmamos experimentalmente, al teñir los lípidos aparecen éstos coloreados con mayor o menor intensidad, según los sueros, pero correspondiéndose exactamente con la posición que ocupan las globulinas α_1 , α_2 y β , pero principalmente las α_2 y β , en los casos estudiados por nosotros, uno de los cuales, correspondiente a un suero aproximadamente normal, reproducimos en la figura 3 con los respectivos diagramas de valoración superpuestos.

(66) MAC.EBORUF, M. y REBEYROTTE, P., *Revue d'Hématologie*, 7, 400 (1952).

Según se observa, los lípidos ocupan la misma posición, en el espectro electroforético del suero, que las globulinas α_2 y β , y, como se sabe estas dos fracciones proteínicas del suero son, precisamente, lipoproteínas (*).

La electroforesis en papel se considera como un método excelente para medir cuantitativamente las pequeñas modificaciones de la forma de las partículas, como éstas que resultan de la desnaturalización o pseudodesnaturalización de las proteínas (67).

ESTRUCTURA FÍSICA Y QUÍMICA DEL PAPEL SOPORTE

Volviendo al problema fundamental que nos ocupaba, sobre el estudio de los diversos factores que intervienen en la electroforesis en papel, se deduce, de todo lo discutido anteriormente, que la clase de papel soporte del medio, tendrá una gran importancia con vistas a conseguir una buena separación. Su influencia radica en su estructura misma, tanto física como química, y en las propiedades que de ella se derivan.

La estructura física del papel de filtro puede representarse como un entrecruzado tridimensional de fibras de celulosa que dejan, entre sí, espacios intersticiales (poros) de dimensiones ampliamente variables. De aquí que el papel de filtro sea un medio poroso, de acción capilar, e hidrofílico, por el carácter propio de las fibras de celulosa, pero insoluble en agua. Sus poros, como se deduce de las consideraciones hechas anteriormente sobre la migración de partículas en el papel, resultan bastante grandes, aun para las moléculas mayores. Entre las fibras existe una afinidad química que comunica al papel una fuerza considerable cuando seco, a pesar de que dichas fibras son sólo moderadamente largas.

Desde el punto de vista químico, el papel de filtro está constituido por celulosa bastante pura (en el caso ideal, por macromoléculas no degradadas de celulosa), a cuyos numerosos grupos oxhidrilos debe sus propiedades hidrofílicas y su mojabilidad por disolventes polares en general. No puede considerarse, sin embargo, el papel de filtro como una sustancia lipófoba, puesto que las cadenas de glucosa, constituyentes de la celu-

(*) El tipo de unión entre la proteína y el lípido no es bien conocido, pero según la opinión más general parece que no se trata de una proteína conjugada, en la cual el lípido constituiría el grupo prostético. Para que fuera así sería preciso admitir uniones electrovalentes o de coordinación y el compuesto habría de tener una composición química determinada y propiedades físicas constantes, presentar especificidad inmunológica o cualquier otra propiedad biológica característica del conjunto y no de uno solo de los componentes (MACFARLANE, H. S., *Discussions Faraday Soc.*, 6, 74 (1949). Nada de esto se ha podido comprobar, hasta ahora, en las lipoproteínas. Según MACFARLANE, (ob. cit.) puede pensarse que los lípidos se encuentran interpuestos entre subunidades laminares de globulina, o bien, recubiertas por una película del grosor de las cadenas laterales de los polipéptidos. Como quiera que sea, existe una unión más íntima que una simple yuxtaposición de coincidencia.

(67) BABBU, E. y JOLY, M., *Discussions Faraday Soc.*, N.º 13, 77 (1953).

losa, presentan también afinidad para otras cadenas y anillos carbonados, siendo, por lo tanto, mojable igualmente por disolventes no polares y por lípidos y lipoides.

Sin embargo, en la práctica, no es posible considerar a ningún papel de filtro como celulosa absolutamente pura. Hay que tener en cuenta que es frecuente encontrar, en el mismo, trazas de otras sustancias, como hemicelulosas y ligninas, que provienen del proceso de elaboración. Por esto, aunque la celulosa pura se considera como no ionizable, el papel de filtro puede poseer grupos iónicos en alguna proporción. Así, es corriente encontrar, sobre el mismo esqueleto de la celulosa, algunos grupos carboxilo.

En cuanto a los resultados prácticos obtenidos en la electroforesis con este soporte, se deduce de las consideraciones hechas por algunos autores (68) (69) sobre el papel cromatográfico que dichos resultados serán tanto mejores cuantas menos condiciones cumpla el papel de las requeridas para la cromatografía capilar (también llamada por adsorción o retención), aunque siempre es inevitable que se produzca una pequeña adsorción física de las macromoléculas. Suele darse como norma el utilizar aquellos tipos de papel de propiedades adsorbentes menores, es decir, los menos porosos.

T A B L A 4

Experimento	CLASE DE PAPEL	Dimensiones cm.	Diferencia potencial voltios	Tiempo minutos	Longitud espectro cm.
10	Whatman n.º 1	3 x 25	250	165	4,2
	Archés n.º 301	3 x 25	250	165	5,4
10	Whatman n.º 1	3 x 25	230	150	3,5
	Archés n.º 301	3 x 25	230	150	4,8
10	Whatman n.º 1	3 x 25	230	190	5,8
	Whatman n.º 4	3 x 25	230	190	6,2

Nosotros, sin embargo, trabajamos con tres tipos de papel: Whatman núms. 1 y 4 y Archés n.º 301, hemos podido comprobar, que, por el contrario, los resultados obtenidos con los más porosos, aunque no con gran diferencia, son más satisfactorios. Así, pues, en dos experimentos dobles, de comparación del Whatman n.º 1 con el Archés 301 (una tira de cada uno, en paralelo, al objeto de que trabajasen en igualdad de condiciones) se obtuvieron los valores de separación o longitud de espectro electroforético que recogemos en la Tabla 4 y que, como puede observar-

(68) SATO, T., DIAMOND, H., NORRIS, W. y STRAIN, H., *J. Amer. Chem. Soc.*, 74, 6154 (1952).(69) BURMA, D., *Anal. Chem.*, 25, 549 (1953).

se, son mayores para el papel Archés 301, aparte de que, aunque no con gran diferencia, la separación de las diversas fracciones de la mezcla es más definida en el mismo. También con Whatman núms. 1 y 4 los resultados, del mismo sentido, son favorables para esto último (véase Tabla 4). (Sustancia problema: seroproteínas. Tampón utilizado: veronal/veronal sódico, pH 8,6).

Lo mismo ocurre en una segunda serie de comprobación con tiras de estas clases de papel con las que se realizaron experimentos en igualdad de condiciones, pero por separado, y en los que, para que no interviniese factor ajeno a los inherentes a las cualidades del papel, en vez de humedecer previamente las tiras pasándolas por solución tampón, se dejaron humedecer por sí solas, de acuerdo con su porosidad, una vez colocadas en la cabina electroforética; de esta manera, el tampón ascendía por capilaridad desde los depósitos electródicos. El desplazamiento electroforético obtenido es mayor en el Whatman n.º 4, si bien parecen más definidas las bandas en el Whatman n.º 1. En la Tabla 5 recogemos, a título de ejemplo, los datos correspondientes a un experimento.

T A B L A 5

Experimento	CLASE DE PAPEL	Dimensiones cm.	Diferencia potencial voltios	Tiempo minutos	Longitud espectro cm.
10	Whatman n.º 1	6 x 25	300	180	4,2
	Whatman n.º 4	6 x 25	300	180	4,8

Por lo tanto, puesto que la idoneidad de los resultados, en este momento, la referimos no sólo a la separación de sustancias o longitud de espectro, sino también a la nitidez de las bandas correspondientes a las distintas sustancias separadas, aquella conclusión nos hace suponer que no siempre el recorrido de las partículas se verifica exactamente según aquel camino tortuoso en el interior del papel, que consideramos antes, sino que es posible que la migración tenga lugar, principalmente, en la superficie del papel mismo. Sin embargo, hemos podido comprobar también que existe un límite de porosidad, o mejor, un tamaño crítico de poro, por encima del cual, las distintas fracciones de sustancias separadas, sobre todo, si se trata de moléculas grandes (proteínas, por ejemplo), quedan mal definidas. Ello pensamos que podría ser debido a que, en un papel moderadamente poroso, los intersticios estarán ocupados por una película del líquido tampón que empapa el papel, la cual facilitará la migración de la partícula a través de ellos, más que si, en su lugar, se en-

contrasen otras fibras de celulosa, como ocurre en los papeles más compactos; no obstante, si el orificio es muy grande, la tensión superficial del líquido será insuficiente para mantener estable dicha película, que se romperá constantemente, con lo cual el traslado de las partículas emigrantes será menos uniforme, sufriendo retrasos y entorpecimientos que se acusan en el espectro revelado y que se deben, en resumen, a una adsorción física del papel.

Lo que ya tiene más inconvenientes, según la generalidad de los autores, son los efectos selectivos de la quimioadsorción, dependientes de las impurezas que acompañan a la celulosa y de su grado de alteración. Un papel de buena calidad para análisis electroforético debe estar constituido, como mínimo, por un 96 % de celulosa α (70) (*). Nosotros, después de nuestras experiencias personales (para las que utilizamos papel metilado y sin metilar), consideramos la quimioadsorción como una ventaja más que como un inconveniente para la separación analítica de algunas sustancias químicamente distintas, pero semejantes, en cierto modo, desde el punto de vista electroforético. Estos efectos se manifiestan menos, generalmente, cuanto más pura es la celulosa que constituye el papel, aunque hemos podido comprobar que, cuando se trata de impurezas orgánicas, su influencia, para la electroforesis, no tiene la importancia que hemos de atribuirle en cromatografía, puesto que, en la primera, no se suelen emplear disolventes orgánicos.

La adsorción química puede evitarse, o mejor, disminuirse, por distintos procedimientos. PORATH (71), por ejemplo, esterificó los grupos carboxilo del papel con diazometano, disminuyendo, de esta manera, aunque no suprimiendo, la adsorción de la salmina, proteína básica.

Nosotros hemos ensayado la reducción de la adsorción determinada por el papel mediante una metilación suave del mismo con sulfato de metilo, que verificamos según una modificación, en cierto modo personal, del procedimiento de HAWORTH, HIRST y otros (72) para metilar celulosa, adaptado a nuestro caso particular del papel. El efecto de este cambio del

(*) Se entiende por celulosa α , desde el punto de vista técnico, aquella que es insoluble en lejía de sosa concentrada (del 17,5 %); la porción soluble en lejía y precipitable por ácido acético, se denomina celulosa β , y la parte soluble en ambos medios se conoce como γ -celulosa. Sobre la naturaleza química de estos tres tipos de celulosa se realizan estudios en los laboratorios de Química Orgánica de esta Facultad, habiéndose llegado a claras discrepancias con el concepto clásico de dichas fracciones. Por ejemplo, la celulosa α , considerada con frecuencia como formada exclusivamente por unidades de glucosa, se manifiesta como constituida también por eslabones de pentosa e incluso con participación de ácidos urónicos (M. PARRA, comunicación personal).

(70) CASSIDY, H. G., *Anal. Chem.*, **24**, 1415 (1952).

(71) PORATH, J., Trabajo no publicado [TISELIUS, A. y FLODIN, P., *Advances in Protein Chem.*, **8**, 461 (1953)].

(72) HAWORTH, W. N., HIRST, E. L. y otros, *J. Chem. Soc.*, 1886 (1939); 1899 (1939).

papel (*), sobre la adsorción de proteínas, lo hemos comprobado por fotolorimetría con resultados que ponen de manifiesto que la influencia de la adsorción que hemos tratado de corregir es despreciable, pese a que, aparentemente, el proteinograma revelado en la tira de papel metilada parecía ser algo más definido para algunas fracciones proteínicas. Es decir, parece que se confirma lo que ya indican también algunos autores de que la adsorción química no supone un gran inconveniente cuando se trabaja, como nosotros lo hacemos normalmente en el caso de las seroproteínas, con soluciones tampón de un pH superior (concretamente 8,6 u 8,8, en nuestro caso) al correspondiente a los puntos isoeléctricos de las diferentes proteínas, con lo cual éstas quedan cargadas negativamente, siendo así adsorbidas por el papel con intensidad mucho menor que las cargadas positivamente (adsorción debida, en parte, a los grupos oxhidrilo, pero, sobre todo, a los carboxilo de los escasos ácidos urónicos de la celulosa, ya sean éstos naturales o resultado de una oxidación posterior de la misma, durante el proceso de su extracción o durante el de elaboración del papel). Por otro lado, si tuviese lugar una adsorción apreciable, de este tipo que estamos tratando, por parte del papel, automáticamente quedaría disminuída la electroósmosis, como se verá más adelante, al neutralizarse los grupos negativos de la celulosa. Sin embargo, en experimentos con glucosa y con otros indicadores electroosmóticos, no nos ha sido posible comprobar una tal disminución de aquel fenómeno.

Resumiendo, la adsorción, en general, tiende a reducir la movilidad de las partículas electroforizables, por uno u otro de los tres tipos que en ella podemos distinguir: 1.º, adsorción debida a la afinidad química entre la sustancia y las fibras de celulosa; 2.º, adsorción que pudiéramos llamar por cambio de ión, en la que sólo los grupos ionizados, y no el esqueleto de la celulosa como tal, son activos; 3.º, adsorción con partición, que sólo interviene cuando se utilicen como disolventes mezclas de líquidos, uno de los cuales sea más fuertemente retenido, por las fibras de la celulosa, que el otro. Esta tercera posibilidad nos relaciona la electroforesis en papel con la cromatografía también sobre papel.

Cabe hacer todavía una clasificación más amplia de la adsorción en *reversible e irreversible*. La primera, en cuanto a la influencia que pueda ejercer sobre la migración de partículas en superficies porosas, ha sido analizada matemáticamente por WEBER (73), demostrando que podría

(*) Índice de metoxilo determinado para el papel modificado: 0,316 %. Se utilizó el procedimiento de VIEBOCK (VIEBOCK, F. y SCHWAPPACH, A., *Ber.*, 63, 3207 (1930) [GATTERMANN, *Manual de Prácticas de Química Orgánica*. Ed. Marín, Barcelona, 1945, pág. 94] según la modificación de A. SOLER y A. CARRASCO (SOLER, A. y CARRASCO, A., *Anal. Real Soc. Esp. Fis. y Quím.*, 47, 235 (1951).

(73) WEBER, R., *Helv. Chim. Acta*, 36, 424 (1953).

esperarse, que, por efecto de ella, la migración tuviese lugar «en forma de cometa», como se ha observado con algunas sustancias. SOMMERFELT (74), sin embargo, atribuye a la adsorción irreversible el efecto de este mismo tipo, que tiene lugar para la albúmina del suero y que da origen a una tenue «cola» de esta proteína a lo largo de todo el camino recorrido, pudiendo, naturalmente, ser fuente de errores de valoración. Si la adsorción fuese reversible, el proceso podría ser llamado, propiamente, electrocromatografía, en vez de electroforesis (75).

El tratamiento matemático de WEBER (73) sobre la adsorción reversible recayó también sobre la electroforesis continua, demostrando teóricamente, que, en este caso, no afecta el resultado de la misma, lo cual se ha visto confirmado experimentalmente por DURRUM (76) y también por nosotros que hemos podido ratificarlo constantemente a lo largo de nuestro trabajo.

(74) SOMMERFELT, S. C., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **5**, 105 (1953) [*Ciba Symp.* 1956, pág. 94].

(75) WEBER, R., *Helv. Chim. Acta*, **34**, 2031 (1951).

(76) DURRUM, E. L., *Science*, **113**, 66 (1951) [*C. A.* **45**, 5003g (1951)].

IV

INFLUENCIA DE LAS INTENSIDADES DE CAMPO Y DE CORRIENTE, DE LA CONDUCTIVIDAD, TEMPERATURA Y TIEMPO, SOBRE LA MOVILIDAD ELECTROFORETICA

La velocidad de migración, de la cual hemos hablado ya en el capítulo anterior, sólo es constante, para cada componente de una mezcla a fraccionar, cuando permanecen también constantes la intensidad del campo eléctrico aplicado, la intensidad de la corriente y el pH. La separación que se obtiene sobre la tira de papel, entre las dos sustancias más distantes, y, en general, entre cualesquiera dos sustancias de las que constituyen la mezcla, a igualdad de todas estas condiciones, será la misma, siempre que la duración del proceso sea igual; para tiempos distintos, resultarán diferentes grados de separación, pero manteniéndose siempre constante la relación de las distancias entre los distintos componentes, toda vez que sus velocidades de migración permanecen también invariables

INTENSIDADES DE CAMPO Y DE CORRIENTE

La velocidad electroforética de una partícula, según vimos en otro lugar [fórmula (II-3)], es directamente proporcional a la intensidad de campo o lo que es igual a la fuerza eléctrica que actúa por unidad de carga (intensidad de campo, $H = \frac{F}{Q}$).

Esta intensidad de campo, H , como también vimos, viene dada por el potencial aplicado, V , dividido por la distancia entre los electrodos, l . Sin embargo, en la práctica, es frecuente que dicha sustancia no pueda medirse directamente por dificultades de tipo geométrico. Entonces, se

recurre a una simple transformación de la ley de OHM que, como vamos a ver, nos permitirá hallar el valor de la intensidad de campo en una sección transversal cualquiera del espacio interelectrónico. Dicha transformación puede realizarse según la marcha siguiente:

$$H = \frac{V}{l} \quad \cdot \quad V = H \cdot l$$

pero, según la ley de OHM:

$$V = I \cdot R$$

luego, igualando los segundo miembros de las dos últimas ecuaciones, tenemos:

$$H \cdot l = I \cdot R \quad (IV-1)$$

Por otro lado, sabemos que:

$$R = \frac{1}{k} \cdot \frac{l}{s}$$

expresión que sustituida en (IV-1) nos da:

$$H l = I \frac{l}{k s}$$

de donde:

$$H = \frac{I}{k s}$$

siendo, I = intensidad de corriente,

k = conductividad específica,

s = área de la sección transversal

magnitudes, que, viniendo medidas en amperios, ohmios recíprocos o mhos/cm y centímetros cuadrados, respectivamente, nos expresan directamente H en voltios/cm, unidades en que es costumbre expresar, en electroforesis, la intensidad de campo.

CONDUCTIVIDAD: SU RELACIÓN CON OTROS FACTORES

Respecto a la conductividad de la tira de papel, observamos que, al principio de toda electroforesis, tiene lugar un aumento gradual de la misma durante los primeros 60-90 minutos, a pesar de haberse manteni-

do constante la diferencia de potencial. La explicación que encontramos para este fenómeno es la siguiente: al iniciarse el paso de corriente el papel se calienta (efecto Joule), al actuar como una resistencia. Por efecto del calor desarrollado, que produce una evaporación de disolvente del tampón, o por efecto de hinchamiento de las fibras del papel, o por ambas cosas a la vez, se origina una corriente de líquido, que asciende, por capilaridad, desde los depósitos electródicos hasta el centro de la tira de papel; con esto disminuye la resistencia del mismo, y, según la ley de OHM , para una misma diferencia de potencial, debe aumentar la intensidad de la corriente. Es decir, que el aumento de intensidad, por aumento de la conductividad, es pararelo a la imbibición creciente del papel por el tampón, hasta que se llega a un equilibrio final de condiciones, que es cuando se estabiliza también la intensidad de corriente.

Sin embargo, aunque ésta nos pareció la causa más lógica, y, en lo fundamental, mantenemos la misma interpretación, tenemos que hacer constar que el mismo fenómeno, de crecimiento inicial de miliamperaje, fué observado en las electroforesis realizadas con nuestro dispositivo de cámara reducida y en las que, para inhibir con más seguridad la evaporación, adicionamos al líquido tampón un 15 %, aproximadamente, de glicerina; con esta disposición se consiguió en menos tiempo la estabilización del miliamperaje. Es decir, que, en este caso, no habrían intervenido corrientes de evaporación, pero sí que habría tenido lugar un aumento de imbibición inicial, simplemente por capilaridad. Para comprobarlo, realizamos unos experimentos en los que el paso de la corriente no se inició hasta transcurrido el tiempo que habíamos observado se requería para la estabilización del miliamperaje, en el cual, por lo tanto, se habría alcanzado la uniformidad de imbibición. En estas condiciones, el miliamperaje permanece prácticamente constante desde el principio de la operación, como puede observarse en la Tabla 6.

En el caso en que la evaporación no está totalmente inhibida, con la consiguiente mayor variabilidad de las condiciones de trabajo podría pensarse en evitar las anomalías de este período inicial, depositando la muestra a electroforizar después de haberse alcanzado aquel equilibrio de condiciones, conseguido pasando la corriente durante el tiempo que para ello sea preciso. Esto tiene el inconveniente de que sería fácil originar disturbios al poner la muestra sobre el papel, y de que aumentaríamos el tiempo del experimento; por otro lado, consideramos que, para evitar errores comparativos, basta tener, como referencia, datos de experimentos efectuados en las mismas condiciones y con papeles de la misma clase y dimensiones.

T A B L A 6

Experi- mento	CLASE DE PAPEL	Dimensiones cm.	Diferencia potencial voltios	Tiempo A minutos	Tiempo B minutos	Tiempo total minutos	Intensidad corriente mA
30	Archés 301	3 x 25	250	60	—	180	5,2—6,0
32	id.	3 x 25	250	—	60	225	5,8—6,0
35	Archés 301	3 x 25	300	100	—	180	7,4—10,8
37	id.	3 x 25	300	—	100	180	10,75—10,75
42	Whatman 1	3 x 25	250	75	—	180	5,2—5,7
44	id.	3 x 25	250	—	75	180	5,7—5,7
46	Whatman 1	3 x 25	300	80	—	210	6,4—9,0
48	id.	3 x 25	300	—	80	210	8,9—9,1

Por todo lo expresado anteriormente, en los datos de cada determinación daremos el valor inicial y el final del paso de corriente, sobreentendiéndose, en el caso de dar uno solo, que se trata del final, el cual consideramos más importante por corresponder a una etapa del proceso en la que se encuentran más estabilizados los distintos factores que en él intervienen.

GRASSMANN y HANNIG (77), por medidas efectuadas en una electroforesis en papel de 12 horas, comprobaron que, en la primera media hora, tenía lugar un aumento de la conductibilidad del papel, permaneciendo prácticamente constante en el tiempo posterior, lo que se observaba tanto a 10° C como a 25° C.

DESARROLLO Y EFECTOS DEL TIEMPO

La temperatura ejerce también una influencia considerable en la movilidad y velocidad de migración, habiendo comprobado GRASSMANN y HANNIG (77), en algunas electroforesis, que al llegar a 25° C la migración a las doce horas es despreciable; este efecto, en el caso más estudiado por nosotros de las proteínas, es debido, en parte, al proceso de desnaturalización de las mismas por el calor, pero sobre todo, y esto sería una

Nota: El tiempo A se refiere al tiempo durante el cual se observa el aumento de miliamperaje. El B indica el tiempo durante el que se ha mantenido la tira de papel dispuesta para comenzar el proceso, pero sin conectar a la corriente.

Sistema tampón: veronal/veronal sódico, pH 8,6. (Con tampón de italato, pH 5,9, los resultados fueron proporcionalmente idénticos).

(77) GRASSMANN, W. y HANNIG, K., *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, 290, 1 (1952).

causa general para el fenómeno observado con cualquier tipo de problema, a la evaporación del disolvente del tampón, cuyas consecuencias estudiaremos detenidamente en otro capítulo. En ambos casos, la causa común es el aumento de temperatura en la tira de papel, que se produce por el calor desarrollado en la misma en virtud del efecto Joule, el cual viene regido, cuali y cuantitativamente, por la conocida ecuación:

$$C = \frac{I^2 R t}{J} = \frac{V I t}{J}$$

siendo, I = intensidad de la corriente

R = resistencia de la tira de papel

V = diferencia de potencial

J = equivalente mecánico del calor (4,18 julios/caloría)

o lo que es igual:

$$C = 0,24 I^2 R t \text{ calorías} = 0,24 I V t \text{ calorías}$$

es decir, que, como vemos, depende de la diferencia de potencial, de la intensidad de la corriente eléctrica utilizada y del tiempo.

El tiempo de duración del proceso y la diferencia de potencial, o también la intensidad de campo (diferencia de potencial por unidad de longitud), son factores que, en cuanto al proceso electroforético, se encuentran entre sí en relación inversa. Por esto, es posible disminuir el tiempo del experimento, a base de aumentar los otros factores que determinan una migración electroforética más rápida. Pero, en este caso, se deduce, de las consideraciones y fórmula dadas anteriormente sobre el efecto Joule, que el calor desarrollado en la tira de papel, por dicho efecto, será mayor y llegará un momento en el que, como indicamos, podrá originar la desnaturalización de las proteínas, si se trata de experimentos con ellas, o, en otros casos, dar lugar a distintos fenómenos que alterarían los resultados, como sería, por ejemplo, el de una evaporación excesiva, que deformaría las imágenes de las bandas correspondientes a las distintas sustancias. Por esto, si el problema del tiempo no apremia, es preferible en general, aunque no siempre, trabajar a potenciales algo menos elevados que darían intensidades menores con lo que, teóricamente, deben obtenerse ventajas en cuanto al menor desarrollo de calor, pues, según la ecuación anterior ($C = 0,24 I^2 R t$), el calor aumenta con el cuadrado de la intensidad, mientras que para el tiempo el exponente es la unidad.

En la electroforesis «libre», en los casos en que se utilizan corrientes elevadas, y a pesar de que la convección térmica pueda ser evitada por al-

gún medio anticonvección, la movilidad de los iones será mayor en el centro de la columna que en la periferia, ya que, dichas movilidades, crecen con las temperaturas, que allí son mayores, puesto que en las zonas periféricas es más fácil la disipación de calor; en consecuencia se obtiene un frente de migración en forma parabólica.

En el caso de la electroforesis sobre papel, la distribución del electrolito en una sección transversal, delgada, tiene una marcada ventaja, favoreciendo la eliminación del calor de una manera análoga a como sucede en una célula electroforética de TISELIUS, delgada y plana. Como quiera que la difusión libre también se incrementa con la temperatura, se deduce que, aun usando medios anticonvección, debe procurarse trabajar a temperaturas bajas y con intensidades de campo pequeñas, en la generalidad de los casos.

Para resolver en la práctica el problema que este desarrollo de calor implica, se han propuesto dos caminos principales: uno que consiste en evitar los efectos de evaporación (destilación de disolvente hacia las partes más frías del recinto), provocadas por el mismo, y otro que tiende a evitar, o al menos a disminuir, el desarrollo del propio calor. Para llevar a la práctica la primera solución se suele recomendar el uso, en la cabina electroforética, de una atmósfera de helio (*) (78) cuando la potencia eléctrica consumida por cm^2 de superficie de papel, es superior a 0,005 vatios (a 25°C). Para la segunda, el procedimiento más sencillo consistiría, según se deduce de la ecuación del efecto Joule, en disminuir la diferencia de potencial, como hemos indicado antes; sin embargo, de esta manera se aumenta considerablemente el tiempo del experimento. Por esto, nosotros hemos efectuado un estudio a fondo de todas y cada una de las variables que intervienen en el proceso y de sus relaciones, habiendo conseguido unas condiciones sencillas y ventajosas (a las que ya se hace alusión en la bibliografía, pero de pasada) que nos permiten trabajar hasta unos 400 voltios, lo que nos da una intensidad de campo de unos 16 volt./cm (intensidad considerada ya excesiva en la mayoría de las técnicas descritas) con la consiguiente ventaja de tiempo, sin necesidad de hacer uso de atmósferas extrañas para disipar el calor, ni de sumergir la tira en baños refrigerantes (nosotros hemos ensayado el de clo-

(*) La conductividad calorífica del He, es bastante más elevada que la de los demás gases usuales. Concretamente es unas seis veces superior a la del aire, a 0°C ; de los restantes gases sólo el hidrógeno muestra una conductividad muy próxima al helio, aunque por su inflamabilidad no es utilizable para este fin. A continuación damos las conductividades de los gases más corrientes (HODGMAN, C., D., *Handbook of Chemistry and Physics*. Publicado por Chemical Rubber Publishing Co., Cleveland, 1945, pág. 1820): Aire, 0° : 0,0000569; Argon, 0° : 0,0000389; Dióxido de carbono, 0° : 0,0000307; Helio, 0° : 0,000339. Hidrógeno, 0° : 0,000327; Hidrógeno, 100° : 0,000369; Nitrógeno, $7^\circ-8^\circ$: 0,0000524.

(78) McDONALD, H., LAPPE, R., MAREBACH, E., SPITZER, R. y URBIN, M., *Clin. Chemist*, 5, 35 (1953).

robenceno, sin observar realmente ninguna ventaja práctica), ni acudir a otras modificaciones que complicarían la técnica. Para ello hemos ido reduciendo las dimensiones de la cámara hasta las mínimas necesarias para contener la tira de papel, logrando así una rápida saturación de la misma, que impide nueva evaporación (*). La cámara permanece, por lo mismo, herméticamente cerrada durante el experimento.

De todas formas, las precauciones respecto a la temperatura no son, en general, tan importantes en la electroforesis sobre papel como en la clásica de TISELIUS para la que es necesario mantener el tubo en U en termostato a 4° C. En la de papel, las condiciones tienen cierto margen de variabilidad sin que se perturbe la correcta separación de las fracciones proteínicas, o de otras sustancias en general. No obstante, GRASSMANN y HANNIC (77) han observado que, si la temperatura se mantiene a 10° C la velocidad de migración de la albúmina es constante, mientras que si se eleva a unos 25° C esta velocidad disminuye hasta llegar casi a anularse al final de experimentos de larga duración. Pero, realmente, estas variaciones no alteran en absoluto los resultados prácticos, según se ha observado, y se comprende su pequeño o nulo interés para nuestro caso concreto.

El desarrollo de calor puede dar lugar a gradientes de temperatura en la tira de papel (79), ya sea en el sentido longitudinal, por variación de la humedad en ella antes de alcanzarse el equilibrio de evaporación, según veremos después, o también en el sentido transversal. Además de estos gradientes de temperatura sobre la misma tira de papel, hemos de contar, lógicamente, con el que existe entre ella, parte más caliente de la cámara, y las paredes de la misma, siendo conducido el calor hacia éstas en todas direcciones. Por lo tanto, si las paredes de superficie más amplia fuesen paralelas al papel, la mayor parte de esta conducción tendría lugar en la dirección perpendicular al plano del mismo y sólo una pequeña parte paralelamente, es decir, desde las orillas. Respecto a este fenómeno veremos más adelante sus relaciones con los efectos de evaporación.

RELACIÓN ENTRE LOS PRINCIPALES FACTORES CONSIDERADOS

Resumiendo y unificando criterios, a la vista de nuestros resultados experimentales, diremos que todas las recomendaciones que en la biblio-

(*) Ahora bien, hemos podido comprobar que, en algunos casos en que se trabaja a potenciales muy elevados, puede no ser conveniente impedir por completo la evaporación, sino sólo encauzarla adecuadamente, pues de lo contrario, el calentamiento del papel sería excesivo, ya que el suministro de nuevas cantidades de tampón que enfriaran la superficie del papel sería prácticamente nulo. Este sería el caso en que se requeriría un sistema de refrigeración, del tipo de los indicados, o de los que luego describiremos.

(79) VALMET, E. y SVENSSON, H., *Science Tools*, 1, 4 (1954).

grafía se suelen dar, respecto a las condiciones óptimas de experimentación (diferencia de potencial, paso de corriente, etc.) son, a nuestro modo de ver, de poca utilidad, toda vez que las unas van condicionadas por las otras y no siempre es posible fijarlas a voluntad. Así, la intensidad de corriente que atraviesa el papel (miliamperaje) es natural que dependa de la diferencia de potencial, de la clase de papel y de la anchura del mismo.

Además, hemos podido observar, a través de la bibliografía, que la mayoría de los autores establecen, y dan como normas generales, aquellas condiciones de voltaje e intensidad de corriente que consideran mejores, sin tener en cuenta, al parecer, que esto depende de otros muchos factores los cuales pueden variar para las distintas técnicas utilizadas. Así, en nuestras diferentes determinaciones, trabajando al mismo potencial, con papel de la misma clase y de iguales dimensiones, el paso de corriente fué prácticamente el mismo siempre. A veces se observaron pequeñísimas diferencias que pensamos podían ser debidas a las diferencias de conductividad, producidas, a su vez, por el distinto grado de humedad de las tiras de papel de cada experimento; esto lo comprobamos trabajando con tiras de papel bastante secas (en lo que cabe) y con otras, por el contrario, completamente húmedas, sometidas a la electroforesis recién mojadas en el tampón; se observa, en efecto, un mayor paso de corriente en estas últimas (ejemplo, Tabla 7).

T A B L A 7

Experimento	CLASE DE PAPEL	Dimensiones cm.	Diferencia potencial voltios	Tiempo minutos	Intensidad de corriente mA
51	Whatman n.º 1	3 x 28	300	200	5,1—6,2
51a	Whatman n.º 1	3 x 28	300	200	5,6—6,7

Nota: Puede observarse, como indicamos anteriormente, que el miliamperaje leído al final de la prueba es más alto que al iniciarse ésta; los dos valores que damos corresponden a estos dos momentos, inicial y final. Aunque en la Tabla se han recogido sólo dos ejemplos, podemos indicar que estos mismos resultados se han reproducido fielmente en los demás experimentos realizados con este fin.

Un hecho curioso es la observación de que, a igualdad de las restantes condiciones, el paso de corriente es mayor en días de temperatura ambiente marcadamente alta, en los que, naturalmente, la diferencia de temperaturas entre el interior de la cabina electroforética y la atmósfera exterior es más pequeña; ello podría explicarse porque al estar más igualadas dichas temperaturas la condensación del vapor disolvente en las paredes y en el techo de la cabina electroforética será menor, con lo

cual la atmósfera interior se irá saturando, disminuirá con ello, progresivamente, la evaporación de tampón, y, en consecuencia, la tira de papel se mantendrá con mayor grado de humedad.

Si trabajamos a una tensión alta se puede en parte contrarrestar su excesiva intensidad, como luego veremos, disminuyendo la intensidad iónica de la disolución tampón.

A continuación tomamos de WUNDERLY (80) la Tabla 8, en la que se resumen las separaciones obtenidas para las seroproteínas en distintas condiciones. Las condiciones óptimas para dichas separaciones, en el papel, son distintas a las propias de la electroforesis libre, siendo favorable, en la que nos ocupa, una pequeña concentración proteínica, pero con intensidad iónica del tampón relativamente grande.

T A B L A 8

A U T O R	CLASES DE PAPEL	Dimensiones cm	Dif de pot. voltios	Intens. corr. mA	Durac. horas	Long. trecho mayor cm.
DURRUM (1951)	Whatman 2	1 x 32	200-230	0,5	3	3,5
MACHEBOEUF y col. (1951)	id. 1 y 2	6 x 32	320-340	3	6	16-18
FLYNN y DE MAYO (1951)	id. 1 y 3 MM	6 x 36	120	1,5	20	16-18
GRASSMANN y HANNIG (1952)	id. 1	4 x 40	110	4	14	9-10
SONNET y RODHAIN (1952)	id. 1	4 x 36	120	0,8-0,9	15-17	6-8
WUNDERLY (1954)	id. 1	7 x 30	165	6-7	8	8-9

Por lo que se refiere a los resultados personales, ya vimos que el papel Whatman n.º 1 opone más resistencia al paso de la corriente que el Whatman n.º 4, y éste más que el Archés 301, resultando un mayor paso de corriente (miliamperaje) en orden inverso, es decir, del Archés 301 al Whatman 4 y al 1. También la movilidad o desplazamiento es mayor en el Whatman n.º 4, y más aún en el Archés; pero esto no quiere decir que se deba al miliamperaje (que, en todo caso, de no estar corregido el efecto de temperatura, actuaría disminuyendo la velocidad), puesto que, en

(80) WUNDERLY, CH., *La electroforesis en papel*. Ed. Científico-Médica, Barcelona, 1956, pág. 11

varias pruebas realizadas con este fin, hemos podido observar que no existe correlación fija entre ambos factores. Así, en los experimentos correspondientes a los electroforegramas 55 y 55a, realizados con tiras de papel de la misma clase y de iguales dimensiones, se consiguió mayor longitud de electroforegrama, o sea, mayor movilidad aparente de las partículas (seroproteínas), en aquel caso en que había tenido lugar un paso de corriente menor. En la Tabla 9 se resumen las condiciones de la prueba y los resultados.

T A B L A 9

Experim.	CLASE DE PAPEL	Dimensiones	Difer. poten. voltios	Tiempo horas	Intensidad de corriente mA.	Long. esp. cm.	
55	Whatman n.º 1	6 x 25	300	3	6,1—8,6	5,2	
55a	id	1	6 x 25	250	3	6,8—10	3,6

Aunque en las tablas que hemos dado anteriormente no figure así, el potencial se da, por regla general, en función de la longitud de la tira de papel (voltios/cm de longitud), o lo que es igual, como intensidad o fuerza de campo, y el paso de corriente en función de la anchura de la misma tira (mA/cm de anchura), habiendo comprobado personalmente la influencia que ejercen estos dos factores, longitud y anchura de la tira de papel, en el paso de corriente, mediante determinaciones en las que las restantes condiciones se mantuvieron constantes.

ANCHURA DE LA TIRA DE PAPEL E INTENSIDAD DE CORRIENTE

Respecto a la anchura del papel, ésta es favorable al paso de corriente, encontrándose ambos factores en proporción directa; además, el efecto es el mismo para una anchura determinada, ya corresponda ésta a una tira de papel única, o ya a varias que trabajen a la vez y cuyas anchuras sumen lo mismo que aquélla. De los experimentos que nos sirvieron para comprobar esto, que, por otra parte, es bien elemental, mostramos, en la Tabla 10, los resultados de los electroforegramas 55, 58, 58a y 58b, correspondientes, estos tres últimos, a tres tiras de papel que trabajaron juntas y cuyas anchuras sumaban lo mismo que valía la de la tira correspondiente al 55, habiendo trabajado en condiciones idénticas para ambos experimentos.

T A B L A 10

Experim.	CLASE DE PAPEL	Dimensiones	Difer. poten. voltios	Tiempo horas	Intensidad de corriente mA	Long espect. cm.
55	Whatman n.º 1	6 x 25	300	3	6,1-8,6 (0,9 mA/cm)	5,2
58	id	3 x 25	300	3	6,1-8,7 (0,916 id.)	{ 5,3 4,8 4,8
58a	id.	2 x 25				
58b	id.	1 x 25				

Nota: Los valores del paso de corriente en mA/cm los obtenemos restando, al miliampe-
raje leído en el miliamperímetro al final del experimento, el valor 3,2 correspondiente al con-
sumo propio del aparato, a 300 voltios, cuando todavía la corriente no atraviesa la tira de pa-
pel. El mismo sistema se sigue para hallar los valores correspondientes a otras diferencias de
potencial.

Los anteriores resultados justifican la norma, dada más arriba, de ex-
presar el paso e intensidad de corriente en miliamperios por centímetro
de anchura de la tira de papel, pues siendo diferentes las anchuras, el
paso total de corriente sería también distinto; pero podría ocurrir que el
paso por centímetro fuese el mismo, si bien es verdad que no nos ha sido
posible probar una correspondencia o relación, constante y determinada,
entre las diferencias de la anchura del papel y las del paso de corriente.

A la vista de los resultados de esta tabla podría suponerse lo contrario
de lo que anteriormente hemos afirmado, puesto que en las tiras de 2 y
1 cm. de anchura observamos una longitud de espectro inferior a la de
3 cm.; sin embargo, ello no hay que interpretarlo como consecuencia del
menor paso absoluto de corriente, ya que, en realidad, lo que influye es
la intensidad por unidad de anchura y ésta, en principio, es la misma
para las tres tiras, aun cuando en las estrechas, probablemente por un
efecto exaltado de imbibición capilar en el tampón, la intensidad de co-
rriente debe ser en realidad mayor que en las más anchas, por lo que la
disminución en la longitud de espectro sigue confirmando la deducción
anterior de que la intensidad de corriente más bien entorpece la migra-
ción electroforética.

Para confirmarnos más en estas deducciones se llevaron a cabo nue-
vas determinaciones, observándose, en todas ellas, que, al igual que en los
casos anteriores, aumenta el paso de corriente con la anchura. Como
ejemplo, podemos comparar, entre otros, los electroforegramas que apa-
recen en la Tabla 11.

Podemos volver a observar, en este caso, que, existiendo una diferen-
cia apreciable en el paso de corriente, tanto en el total como por centíme-

T A B L A 11

Experi- mento	CLASE DE PAPEL	Dimensiones	Dif. pot. vol.	Tiempo minutos	Intensidad de corriente mA	Long. espect. cm.
55	Whatman n.º 1	6 x 25	300	180	6,1—8,6 (0,9 mA/cm)	5,2
56	Whatman n.º 1	3 x 25	300	180	4,9—6,3 (1,03mA/cm)	5,1
59	Whatman n.º 1	6 x 25	300	184	5,2—6,8 (0,6 mA/cm)	4,5
60	Whatman n.º 1	6 x 25	300	184	6,8—10 (1,13mA/cm)	4,2

tro la longitud de espectro (función de la velocidad de migración de las partículas) es aproximadamente igual en unos casos (55 y 56), y en otros (59 y 60) es incluso mayor en aquellos experimentos en que el paso de corriente fué menor.

Hacemos hincapié en este hecho, que hemos observado constantemente a lo largo de nuestro trabajo, porque, en la bibliografía, hemos encontrado autores que, pensando favorecer la separación de las diferentes sustancias, dan mayor importancia al miliamperaje que al potencial. La realidad es, por una parte, que aquél viene en general, y como es lógico, condicionado por éste, de manera que los dos aumentan correlativamente y, en principio, no podría saberse a cuál de los dos se debe la mayor separación obtenida en algunos casos; por otra parte, nosotros hemos logrado incrementar el miliamperaje de tal modo que los factores de que nos hemos valido no influyen en sentido opuesto en la velocidad de desplazamiento, esto es, aumentando, por ejemplo, el grado de imbibición en tampón, factor que, en todo caso, favorecería dicha velocidad; el resultado ha sido el mismo que cuando el paso de corriente era inferior, a igualdad de potencial y restantes condiciones.

INTENSIDAD DE CAMPO

Por el contrario, sí que podemos afirmar, después de nuestras experiencias, que, en principio, es el voltaje o diferencia de potencial el factor que rige el fenómeno de la mayor o menor separación de las sustancias, variando ésta en el mismo sentido que aquél. Además, creemos haber aclarado una cuestión que suele aparecer algo confusamente tratada en la bibliografía, y es que, el factor que realmente rige la separación o migra-

ción de sustancias en el papel es el potencial por centímetro, esto es, la intensidad de campo, de manera que, para un potencial dado y siempre que no interfieran otros factores, se conseguirán mejores separaciones aproximando entre sí los electrodos.

Esto último lo hemos comprobado con cuatro series de experimentos, en los cuales los resultados fueron prácticamente los mismos. A continuación (Tabla 12) transcribimos los de una de estas series, en las que las me-

T A B L A 1 2 *

Experimento	Puntos de medida	Diferencia de potencial voltios	Intensidad campo volt./cm.
1)	Tampón-Tampón	165,0	17,0
	0-0	145,0	20,7
	1-1	90,0	18,0
	2-2	45,0	15,0
	3-3	15,0	15,0
2)	Tampón-Tampón	165,0	10,3
	1-1	135,0	10,3
	2-2	105,0	9,5
	3-3	75,0	8,3
	4-4	57,5	8,2
	5-5	40,0	8,0
	6-6	25,0	8,3
7-7	10,0	10,0	
3)	Tampón-Tampón	276,6	17,0
	1-1	260,0	20,0
	2-2	220,0	20,0
	3-3	175,0	19,4
	4-4	120,0	17,1
	5-5	95,0	19,0
	6-6	55,0	18,3
7-7	10,0	10,0	

(*) Papel Whatman n.º 1. Sistema con evaporación parcialmente inhibida y disposición horizontal del papel. Longitud de la tira de papel 1): 9,6 cm. Longitud de las tiras 2) y 3): 16,1 cm.

didas de potenciales se han efectuado entre puntos simétricos respecto al eje transversal medio de la tira de papel, y desde los extremos hacia el centro, según el orden en que los damos.

Como vemos, algunos valores muestran pequeñas fluctuaciones, debidas probablemente a incorrecciones experimentales inevitables; no obs-

tante lo cual, el estudio del fenómeno que tratamos de comprobar puede hacerse perfectamente sin que aquello signifique dificultad formal alguna.

La separación que resulta en el primer caso es la mayor obtenida, a pesar de que la intensidad de corriente medida aquí es también mayor y podría perjudicar la migración por efecto del calor desarrollado. En los otros dos casos, es prácticamente igual, correspondiéndose este hecho con la igualdad de potencial por centímetro en la zona donde se depositó la muestra.

T A B L A 13

CLASE DE PAPEL	Dimensiones	Dif. potenc.	Tiempo	Intensidad de corriente	long. espect.
	cm.	voltios	minutos	mA	cm.
{ Archés n.º 301	3 x 25	230	180	5,2-5,7	{ 4,8
{ Whatman n.º 1	»	»	180		{ 3,5
{ Archés n.º 301	»	250	180	5,2-5,7	{ 5,4
{ Whatman n.º 1	»	»	180		{ 4,2
Archés n.º 301	6 x 25	»	240	—	5,6
»	3 x 25	»	190	5,2-6,0 (1,13 mA/cm)	5,25
»	6 x 25	300	120	? -7,4 (0,7 mA/cm)	4,3
»	»	»	180	7,4-10,8 (1,26 mA/cm)	6,5
»	3 x 25	»	210	—	8,6
»	»	»	240	6,8 (1,2 mA/cm)	11,5
»	»	350	150	6,9-8,0 (1,43 mA/cm)	8,6
Whatman n.º 1	»	300	180	4,9-6,3 (1,03 mA/cm)	5,1
»	5 x 25	»	180	? -7,6 (0,88 mA/cm)	5,2
»	6 x 25	»	180	6,1-8,6 (0,9 mA/cm)	4,3
»	»	»	185	5,2-6,8 (0,6 mA/cm)	4,4
»	»	»	184	6,8-10,0 (1,13 mA/cm)	4,3
{	»	3 x 25	190	6,4-9,0	{ 5,8
{	» n.º 4	»	190		{ 6,2
»	»	2 x 25	184	4,9-6,2 (1,5 mA/cm)	3,4
»	»	4 x 25	185	? -6,1 (1,55 mA/cm)	3,4

Nota: Los valores que aparecen unidos por una llave corresponden a experimentos que se efectuaron juntos. En tales casos, el valor de los mA/cm se ha obtenido dividiendo la lectura de mA, no por los centímetros indicados en la tabla, correspondientes a cada tira, sino por el total de centímetros de anchura de las tiras de papel que trabajaron juntas. El consumo del aparato, en mA, para los potenciales en voltios, que figuran en la tabla, son los siguientes:

Volt.:	230	250	300	350
mA:	2,4	2,6	3,2	3,7

En la Tabla 13 presentamos reunidos, a efectos comparativos, las distintas condiciones experimentales y los resultados de algunos de los ensayos llevados a cabo sobre las proteínas de sueros sanguíneos, que es con lo que se han efectuado estas pruebas últimamente citadas.

Todos estos experimentos los hemos repetido, cuando menos, tres veces, obteniendo prácticamente los mismos resultados, por lo que no estimamos necesario hacerles constar aquí. Entre las diferentes condiciones referidas, podemos centrar nuestra atención en la diferencia de potencial y en el tiempo, que son los que prácticamente gobiernan el proceso, pudiéndolos variar a voluntad; entre ellas, escogemos, en principio, para nuestras futuras determinaciones proteínicas, las de 300 voltios y 3 horas, que son con las que mejores resultados prácticos hemos obtenido, en los estudios realizados con fines analíticos comparativos.

LONGITUD DE LA TIRA DE PAPEL. SUMINISTRO DE TAMPÓN

Es previsible la influencia de la longitud libre de la tira de papel sobre la migración electroforética de las partículas, ya que a igualdad de voltaje la intensidad de campo depende de dicha magnitud, que equivale a la distancia interelectrónica. Los resultados de varios experimentos comprueban dicha influencia. Las variaciones de longitud libre del papel las conseguimos, en nuestro dispositivo de electrodos fijos, bajando el nivel de tampón en las cubetas electrónicas, o, más frecuentemente, colocando un suplemento superior en el caballete donde se apoyan las tiras de papel. En la Tabla 14 recogemos dos de los experimentos citados, en los que puede apreciarse el sentido de la influencia del factor que estudiamos.

TABLA 14

exp.	Clase de papel	Bimensiones cm	Long. sumer. por extre. cm.	Long libre cm	Tiempo min.	Potencial vol.	Intensidad campo vol/cm	Intensidad corriente mA/cm	Long. espect. cm
77	what.1	3 x 28	1	26	184	300	11'5	0,95	4'5
77a	what.1	3 x 28	1	22	184	300	13'6	0,85	5'2

Por otro lado, quisimos comprobar también la influencia de la longitud absoluta del papel a igualdad de longitud libre. En este caso, las posibles diferencias surgirán como consecuencia del mayor o menor suministro de tampón que tendría lugar al variar la porción de papel sumergida en el mismo. De acuerdo con lo previsto, se aprecian variaciones en la longitud del espectro, en forma tal, que éste disminuye al crecer la porción de papel sumergida. Ello se debe, en nuestro criterio, a las corrientes ascendentes de líquido tampón, que se oponen, en cierto modo, a la electromigración, en forma de acción preponderante sobre la de sen-

tido favorable que supondría el mayor grado de imbibición, en tanto no se ha alcanzado el valor límite. Estas corrientes son, naturalmente, muy ostensibles en los sistemas de evaporación no inhibida, entre los cuales puede incluirse el utilizado por nosotros en estos experimentos. En la Tabla 15 se resumen unos experimentos que ponen de manifiesto estas conclusiones, en dos clases distintas de papel.

T A B L A 1 5

Experi- mento	CLASE DE PAPEL	Dimensiones cm.	Long. sumg. por extremo cm.	Long. libre cm.	Tiempo min.	Potenc. volt.	Intensidad campo vol/cm	Intensidad corr/cm mA/cm	long espect. cm
75	What. 1	3 x 32	5	22	184	300	13,6	1,03	4,5
77a	»	3 x 24	1	22	184	300	13,6	0,85	5,2
83	»	3 x 36	5	26	184	300	11,5	1,04	4,35
83a	»	3 x 28	1	26	186	300	11,5	1,01	4,9
87	What. 4	3 x 32	4,5	23	180	300	13,04	1,23	4,9
87a	»	3 x 25	1	23	180	300	13,04	1,26	5,5

Para mayor abundancia de estos hechos realizamos unos experimentos en los que se combinaron simultáneamente ambos efectos (suministro de tampón e intensidad de campo dependiente de la longitud del papel). A título de ejemplo, se recogen en la Tabla 16 dos de ellos.

T A B L A 1 6

Experi- mento	Clase de papel	Dimen- siones cm	Long. sumerg. por ext. cm	Long. libre cm	Tiempo minutos	Difer. potenc.	Intens. campo vol/cm	Intens. corr/cm mA/cm	Long. espectro cms
102	what. 1	3 x 25	1,0	23	180	300	13,04	0,9	5,3
102	what. 1	3 x 27	3,5	20	180	300	15,00	0,9	5,85

Obsérvese cómo es mayor la influencia del factor suministro, pues con un suministro más del triple en un caso (Exp. 106) que en el otro (Exp. 102), no puede contrarrestarse el alargamiento del espectro provocado por un campo superior en algo menos de dos unidades.

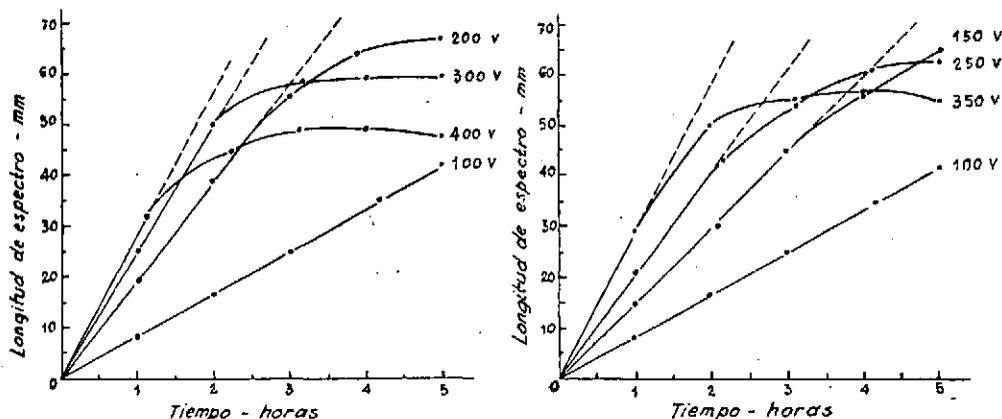
POTENCIAL Y TIEMPO COMO FACTORES PREPONDERANTES. TEMPERATURA

Considerados todos estos factores, vamos a estudiar algo más detenidamente aquellos variables a voluntad, que gobiernan propiamente el proceso electroforético, los cuales, según los estudios experimentales realizados previamente, quedan reducidos, en principio, a los dos siguientes ya citados: tiempo y diferencial de potencial, que, como es sabido, se encuentran entre sí en relación inversa. La intensidad de corriente, como hemos visto, depende lógicamente y principalmente de la diferencia de potencial a que se trabaja, pero es posible modificarla, independientemente del potencial, puesto que responde a variaciones de la fuerza iónica del tampón; de esta manera, nos ha sido posible reducir la intensidad de corriente, disminuyendo la fuerza iónica del tampón utilizado por dilución del mismo. Esto nos permite, por lo tanto, trabajar a potenciales altos, sin los efectos de elevación de temperatura que llevaría consigo una elevada intensidad de corriente. No obstante, al ir diluyendo progresivamente el tampón, se llega a un valor límite, distinto según el dispositivo que se utilice, y a partir del cual las bandas del espectro electroforético obtenido, aparecen con irregularidades no admisibles, sobre todo, con vistas a la valoración cuantitativa y obtención de resultados.

En resumen, los dos factores con los que realmente vamos a jugar, en la práctica, son diferencia de potencial y tiempo, y el que nos va a servir de punto de comparación o de referencia, la separación entre las distintas fracciones seroprotéicas, o lo que le equivale, la longitud de espectro electroforético, que, lógicamente, es una medida, «grosso modo», de la movilidad.

Para estudiar los resultados obtenidos con nuestra técnica usual, que luego describiremos, hemos construido una serie de diagramas longitud de espectro-tiempo a distintos potenciales, que variábamos de 50 en 50 voltios, desde 100 a 450, y longitud de espectro-potencial, a tiempos diferentes, de 1 a 5 horas. En todos los casos, y para las dos series de curvas construidas, es decir, tanto para la de los diagramas en que mantenemos constante la diferencia de potencial (figuras 4 y 5), como para la de aquellos en los que la magnitud constante es el tiempo (figuras 6 y 7), la longitud de espectro varía en el mismo sentido que el tiempo para el primer caso, y que la diferencia de potencial, para el segundo; pero la relación que liga cualquiera de las parejas de factores en juego no es exactamente lineal. En el primer caso (figs. 4 y 5), para un potencial dado, la pendiente de las curvas longitud de espectro-tiempo disminuye al aumentar este último; asimismo, por comparación de los distintos diagramas, se

observa que, al ir aumentando la diferencia de potencial, la relación entre los factores longitud de espectro-tiempo va desviándose, cada vez antes y cada vez más, de la linealidad. Solamente a un potencial, 100 voltios, se mantiene exactamente constante la pendiente. Los datos que han servido de base para la construcción de estos diagramas y de los que siguen en este capítulo, se han reunido en uno de los apartados del Apéndice Experimental.

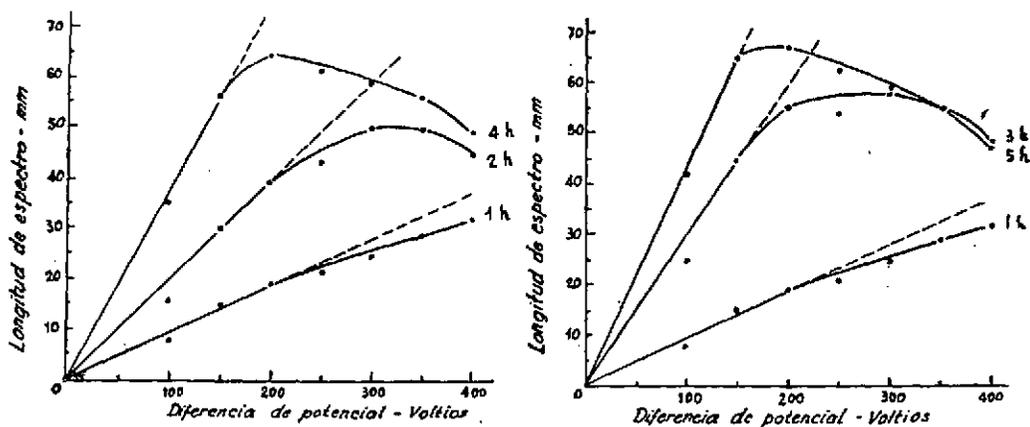


Figs. 4 y 5.—Diagramas longitud de espectros-tiempo. Obsérvese en los diagramas correspondientes a diferencias de potencial superiores a los 100 voltios, la disminución de la pendiente de la curva, con el tiempo, para cada potencial dado y a partir de un tiempo fijo y distinto para cada caso, pero menor para los potenciales mayores.

Del estudio de los diagramas longitud de espectro-diferencia de potencial (figs. 6 y 7), se deduce, que, para un tiempo determinado la longitud de espectro está también, en principio, en razón directa con la diferencia de potencial; pero tampoco aquí es exactamente lineal la relación que liga ambos factores, sino que varía en el mismo sentido que la anterior; es decir, que, para un tiempo determinado, la longitud de espectro aumenta con el potencial, pero a potenciales elevados el aumento es cada vez menor y la relación longitud de espectro-potencial se desvía cada vez más de la función lineal, desviación que, como vimos en los diagramas anteriores, se intensifica con el tiempo para un potencial dado y, según estos diagramas, también con el potencial, para un tiempo dado.

Según la marcha que se observa desde los primeros momentos en el estudio de estas dos familias de curvas, puede suponerse que la pendiente de las mismas llegará a tomar signo negativo para valores más altos de diferencias de potencial y de tiempos. En efecto, podemos comprobar, para el primer caso (figs. 4 y 5), que las separaciones o longitudes de espectro obtenidas ya a 400 voltios, y que a partir de 2 horas son menores

que las que resultan a potenciales más bajos para el mismo tiempo, e incluso para tiempos menores, toman, al cabo de 4 y 5 horas de electroforesis, valores inferiores al que corresponde a las 3 horas, para el mismo potencial. Lo mismo, pero más manifiestamente todavía, se observa en los diagramas longitud de espectro-potencial, a partir del correspondiente a 2 horas (fig. 6), al ir aumentando el potencial.



Figs. 6 y 7.—Diagramas longitud de espectro-potencial. De manera análoga a lo que ocurría en los diagramas de las dos figuras precedentes, se observa aquí que la pendiente de las curvas disminuye con el potencial a partir de un valor determinado del mismo, distinto para cada curva particular y más bajo para tiempos mayores.

La explicación que creemos corresponde a estos hechos es bien sencilla, constituyendo una nueva confirmación del efecto que origina el aumento de temperatura por el calor desarrollado a partir de determinados potenciales y de determinado tiempo, distintos según los detalles experimentales de la técnica seguida. No creemos, desde luego, como opinan algunos autores (81) que observaron fenómenos semejantes, que estas anomalías puedan explicarse correctamente por efectos gravitatorios, debidos a la elevación del centro de la tira de papel; esto llevaría consigo naturalmente la pérdida de toda relación lineal en cualesquiera de las condiciones.

También hemos comprobado directamente el efecto de la temperatura del experimento sobre la longitud del espectro obtenido, para tiempos distintos (fig. 8), encontrando que la movilidad, para un mismo potencial, es mayor a temperaturas más elevadas, pero, al aumentar ésta, se pierde ante la aproximada relación lineal longitud de espectro-tiempo.

El estudio de todas estas variables nos ha permitido escoger las con-

(81) McDONALD, H. J., *J. Chem. Educ.*, 29, 428 (1952).

diciones óptimas de trabajo. Si consideramos los diagramas longitud de espectro-tiempo (a potencial constante), elegiremos aquellas condiciones para las cuales la pendiente de cada curva sea mayor, a no ser que existan otras razones que aconsejen elección distinta.

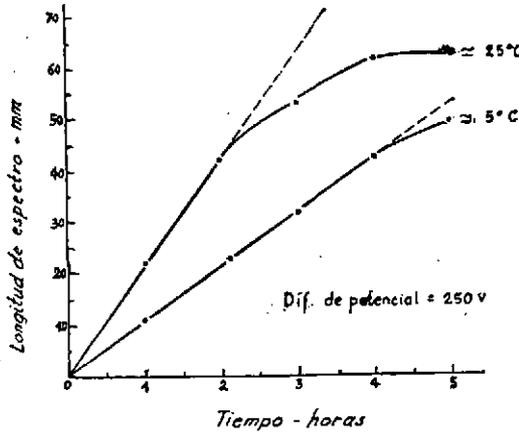


Fig 8.—Efecto de la temperatura sobre el desplazamiento electroforético de las seroproteínas humanas. Puede observarse su efecto favorable para tiempos pequeños.

Para tiempos pequeños, observamos que dicha pendiente aumenta con la diferencia de potencial. Para tiempos altos, por el contrario, disminuye la pendiente (es decir, el incremento de longitud de espectro) al aumentar la diferencia de potencial y el tiempo.

El diagrama longitud de espectro-tiempo obtenido a 150 voltios es, en principio (prescindiendo del de 100 v) en el que se mantiene mejor la constancia de pendiente, aun a las cuatro horas de electroforesis, siendo, al mismo tiempo, en el que se observan los mayores valores de la misma, o lo que es equivalente, de longitud de espectro, para tiempos altos; dentro de éste, a las cuatro horas, se obtiene una separación de las fracciones bastante satisfactoria, muy adecuada tanto para la lectura densitométrica directa, como para la fotocolorimétrica previa elución de colorante. También a 300 voltios y 3 horas, los resultados prácticos son buenos, pero ya se observa un cierto retraso de las fracciones, aunque no el suficiente para despreciar la ventaja de tiempo que suponen estas últimas condiciones respecto a las anteriores, además de que la resolución de fracciones, aun siendo algo menor para este tiempo, es casi más definida.

V

TAMPON Y SUSTANCIA PROBLEMA EN RELACION CON LA
MOVILIDAD ELECTROFORETICA

En el capítulo anterior hemos estudiado la movilidad de una partícula desde un punto de vista preferentemente práctico, aun cuando, para su tratamiento matemático, hemos supuesto, en general, unas condiciones ideales. Por otra parte, aquel estudio se ha realizado teniendo en cuenta, principalmente, algunos factores externos o extrínsecos, que influyen en el proceso. En el presente capítulo vamos a ocuparnos, con preferencia, de otros factores relacionados más directamente con la naturaleza íntima de los sistemas químicos en juego.

TAMAÑO Y FORMA DE LA PARTÍCULA EMIGRANTE

La movilidad de una partícula, considerada con independencia de otros factores ya citados, que se relacionan inmediatamente con la naturaleza del soporte poroso, puede expresarse por la fórmula siguiente:

$$u = \frac{Q \delta}{4\pi r^2 \eta} \quad (V-1)$$

en donde, Q = carga eléctrica de la partícula.

δ = espesor de la doble capa eléctrica de dicha partícula.

r = radio de la misma.

η = viscosidad de la solución.

De acuerdo con esta fórmula la movilidad, u , disminuye notablemente al aumentar el tamaño de las partículas, ya que es inversamente pro-

porcional al cuadrado del radio de las mismas. Si además existe anisotropía de forma, resulta un aumento simultáneo de la viscosidad, η , con la consiguiente disminución de u . Por esto, el fibrinógeno del plasma sanguíneo, cuyas partículas tienen un peso molecular medio de 300.000 a 400.000, posee una movilidad tan pequeña en el papel, que suele permanecer en el lugar de origen. Además, se observa que las partículas proteínicas mayores, en tamaño y peso molecular, es decir, las de migración más lenta, como es la macroglobulina ($P_m=16^6$), presentan, en la electroforesis en papel, límites muy precisos; las de peso molecular menor, como la albúmina ($P_m=96.000$), muestran un límite posterior frecuentemente borroso o difuso, en tanto que el anterior, o frente de avance, queda bien definido.

pH Y PUNTO ISOELÉCTRICO

En el caso de los aminoácidos, de los péptidos y de las proteínas, en general, de los anfólitos, ejercerá gran influencia sobre su movilidad el pH del sistema tampón. Así, veremos que el pH del medio modifica tanto el sentido de la carga de la partícula proteínica, como su valor numérico, Q , por lo que, según la fórmula (V-1), se modificará también la movilidad de dichas partículas, o lo que es equivalente, su velocidad de desplazamiento en el campo eléctrico.

Según sea el pH a que trabajemos y el punto isoeléctrico de cada uno de los anfólitos de una mezcla, sus partículas se desplazarán, unas hacia cátodo y otras hacia el ánodo. En el caso concreto de las proteínas del suero, que es el que más detenidamente hemos estudiado, junto con el de los aminoácidos, llegamos a obtener una óptima separación de las mismas, trabajando con tampones cuyos pH se encontraban en la zona alcalina de los puntos isoeléctricos de las distintas proteínas, con lo cual éstas quedan cargadas negativamente. Según TISELIUS (82) las proteínas cargadas negativamente son, en general menos fuertemente adsorbidas por el papel de filtro, que las cargadas positivamente. Más adelante estudiaremos detenidamente esta cuestión.

De aquí podemos deducir el objeto y la importancia de utilizar, como sistema conductor, una solución tampón, ya que así se consigue, como dijimos, mantener constante el pH, que, de otra manera, se modificaría, pudiendo alcanzar el valor de los puntos isoeléctricos de los aminoácidos o proteínas por ejemplo, en cuyo caso ni unos ni otros se desplazarían, por encontrarse entonces como partículas neutras. según se deduce del con-

(82) TISELIUS, A. y FLODIN, P., *Advances in Protein Chem.*, 8, 461 (1953).



cepto del punto isoelectrico. Aun en el caso en que tuviese lugar algún desplazamiento, mediante factores no eléctricos, éste sería variable de unas partículas respecto a otras.

ALGUNAS CONSIDERACIONES SOBRE LA TEORÍA DEL PUNTO ISOELÉCTRICO

Dada la importancia que, en la interpretación de muchos fenómenos observados en nuestros experimentos, hemos tenido que atribuir a la influencia del punto isoelectrico de los anfólitos, sustancias de considerable interés en los sistemas biológicos, consideramos oportuno, para la mayor claridad de estas cuestiones, exponer, aunque brevemente, los conceptos fundamentales relacionados con dicho efecto.

Es sabido que los anfólitos son sustancias que, debido a su constitución química, manifiestan un carácter anfótero en su comportamiento. En su molécula existen, simultáneamente, grupos ácidos y básicos, y, por lo tanto, pueden actuar como ácidos y como bases débiles. Tanto su función ácida, como la básica, poseen sus propias constantes de disociación cuyos logaritmos negativos son los respectivos pK , ácidos y básicos.

Pertenecen a esta clase de compuestos todos los prótidos en general, incluyendo, tanto el grupo de las proteínas típicas como el de las conjugadas. Como quiera que el comportamiento anfótero se debe, en definitiva, a los aminoácidos constituyentes, sobre todo, a los que se encuentran como eslabones finales, resulta natural que también se manifiesten como anfólitos, incluso con carácter más acentuado, los polipéptidos y, por descontado, los propios aminoácidos libres.

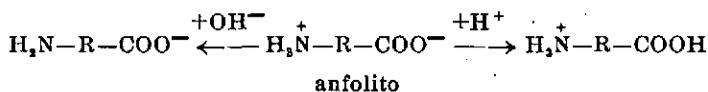
Si añadimos un ácido a la disolución de un anfólito disminuirá, en este último, su tendencia a separar protones, llegando a actuar como una base para formar una sal con el ácido adicionado. Si lo que se añade es una base, el anfólito se desdoblará y, actuando como ácido, formará con el álcali la sal correspondiente.

En disolución fuertemente ácida, todos los aminoácidos, proteínas y péptidos están cargados positivamente, emigrando como cationes en un campo eléctrico; en solución fuertemente alcalina todos se cargan negativamente y emigran como aniones. Pero, para cada una de estas sustancias, existe un valor intermedio de pH , en el cual la carga neta de las moléculas del anfólito es cero y no tiene lugar desplazamiento alguno. Este valor de pH es precisamente el «punto isoelectrico» (representado por pI) de la sustancia, el cual desempeña un papel importantísimo en las propiedades de los anfólitos, que poseen, en él, su solubilidad mínima, siendo, por lo tanto, óptimo para la precipitación, coagulación y cristalización de estas sustancias; la capacidad para hincharse y gelatinizarse es también



mínima, y, en general, los anfólitos poseen, en su punto isoeléctrico, su menor reactividad.

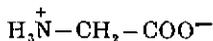
El efecto que ejercen los ácidos y las bases, sobre un anfólitico, podemos representarlo gráficamente según el siguiente esquema:



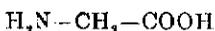
La fórmula central corresponde al anfólitico en su punto isoeléctrico, es decir, sin carga eléctrica neta frente al medio, condición en la que no puede tener lugar desplazamiento propiamente electroforético. Cuando el pH del medio, o sea, del tampón en nuestro caso, es más ácido que el correspondiente al punto isoeléctrico, el aminoácido queda con una carga positiva ($\text{H}_3\text{N}^+-\text{R}-\text{COOH}$, ión amonio, en general, o ión proteinio, en el caso de las proteínas) y emigra hacia el cátodo; por el contrario, si el pH del tampón es más básico que el del punto isoeléctrico, el aminoácido queda negativamente cargado ($\text{H}_2\text{N}-\text{R}-\text{COO}^-$) y emigra hacia el ánodo (formación de un proteinato en el caso de las proteínas).

El interés que tienen estos fenómenos, desde el punto de vista electroforético, estriba en que, al quedar la molécula del anfólitico bajo la forma de anión o de catión, emigrará hacia el ánodo o hacia el cátodo, respectivamente. He aquí, pues, como es sabido, la explicación primera del sentido de desplazamiento de los anfóliticos, en general, y, en particular, de las seroproteínas, material de ensayo preferentemente utilizado en nuestro trabajo, y cuyos puntos isoeléctricos corresponden a pH más ácidos que los de los tampones corrientemente utilizados, quedando, de esta manera, cargadas negativamente como aniones.

El anfólitico neutro, en su punto isoeléctrico, se ha representado como doble ión o ión bipolar, estructura que se admite como más probable desde que, en 1916, observó ADAMS (83) la existencia de la glicocola bajo la forma de dipolo:



con gran predominio frente a la forma típica no ionizada:



conteniendo, probablemente, menos de una parte por millón de esta última. De aquí pasó a señalar que todos los anfóliticos debían encontrarse bajo esta forma especial, y, cinco años más tarde, BJERRUM (84) confirmó

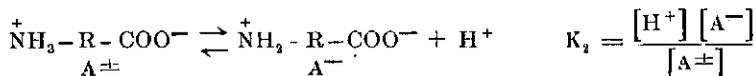
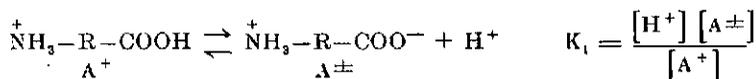
(83) ADAMS, E., *J. Amer. Chem. Soc.*, **38**, 1503 (1916).

(84) BJERRUM, N., *Z. Physik. Chem.*, **104**, 147 (1923).

y amplió esta teoría, admitiendo que todos los aminoácidos se encuentran realmente como iones bipolares, debiendo considerarse, por lo tanto, como sales internas de amonio; o también, como iones hermafroditas (forma «zwitterion» de los alemanes) (*).

Según esto, podríamos definir el pI de un anfólito como el valor de pH en el cual se comporta en grado máximo como doble ión, existiendo un mínimo de grupos ácidos y básicos potencialmente no disociados, y en el que sus cargas positivas se equilibran exactamente con las negativas.

El pI de la disolución de un anfólito puede relacionarse, por una fórmula matemática, con los pK, ácido y básico, de dicho anfólito. Para llegar a esta fórmula consideraremos, en primer lugar, sus disociaciones ácida y básica y las expresiones de sus constantes respectivas:



Multiplicando entre sí estas dos expresiones de K_1 y K_2 , resulta:

$$K_1 K_2 = [\text{H}^+]^2 \frac{[\text{A}^-]}{[\text{A}^+]}$$

Como en el punto isoelectrico ha de ocurrir que $[\text{A}^-] = [\text{A}^+]$ podemos escribir:

$$K_1 K_2 = [\text{H}^+]^2; \quad [\text{H}^+] = \sqrt{K_1 K_2}$$

luego esta concentración de H^+ será la existente en dicho punto isoelectrico, es decir, que por definición será:

$$\text{pI} = -\log [\text{H}^+] = -\log \sqrt{K_1 K_2} = -\frac{\log K_1 + \log K_2}{2}$$

y asimismo, por definición de pK:

$$\text{pI} = -\frac{\text{pK}_1 + \text{pK}_2}{2}$$

En las gráficas que copiamos a continuación puede observarse la rela-

(*) Recuérdese, a este respecto, los hechos que fundamentan la teoría de la estructura salina de los aminoácidos, como son las medidas de momentos dipolares y constantes dieléctricas, temperaturas de fusión elevadas y alto grado de solubilidad en disolventes inorgánicos, curvas de valoración, espectros Raman, etc.

ción entre el pH de la solución tampón y la movilidad de la partícula, en los casos del ácido glutámico (85) (fig. 9) y de la caseína (81) (fig. 10). En la primera el punto isoeléctrico corresponde al pH 3,1, y en la segunda al pH 4,7.

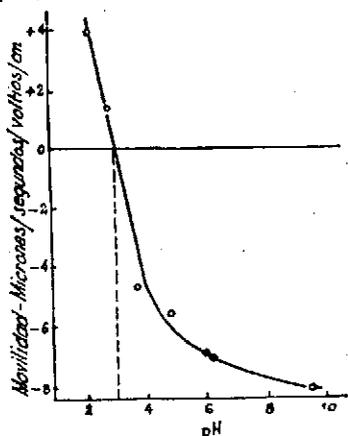


Fig. 9.—Movilidad del ácido glutámico frente al pH tampón

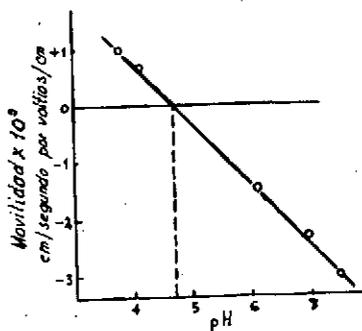


Fig. 10.—Movilidad de la caseína frente al pH tampón

MOVILIDAD Y GRADO DE DISOCIACIÓN

A mayor diferencia de movilidad de dos iones, A y B, la separación entre ellos será más fácil y rápida. Si u_A y u_B son las movilidades de los iones, o en general, de las partículas cargadas A y B, y d_A y d_B son las respectivas distancias recorridas en un campo eléctrico de intensidad H , durante el tiempo t , podemos escribir, para la separación resultante entre las dos partículas, la siguiente expresión deducida de la propia definición de movilidad:

$$d_A - d_B = (u_A - u_B) H t \quad (V-2)$$

Para electrolitos débiles y sustancias anfóteras, el grado de separación depende del grado de disociación. CONSDEN, GORDON y MARTIN (86) desarrollan un tratamiento matemático, que, aunque lo aplican al caso de la ionoforesis de aminoácidos en columnas de gel de sílice, puede servirnos de modelo para otros casos en los que se trate de seleccionar cuál sea el mejor sistema electroforético aplicable a una separación problema.

(85) McDONALD, H. J., URBIN, M. C. y WILLIAMSON, M. B., *J. Colloid Sci.*, 6, 236 (1951).

(86) CONSDEN, R., GORDON, A. H. y MARTIN, A. J. P., *Biochem. J.*, 40, 33 (1946).

Los citados autores consideran dos ácidos, HA y HB, con constantes de disociación K_a y K_b y movilidades iónicas u_a y u_b . La movilidad neta, U_a o U_b , de cualquiera de ellos, puede calcularse a partir de la movilidad experimental correspondiente, u_a o u_b . En el caso del HA, por ejemplo, la movilidad neta vendría dada por la ecuación:

$$U_a = \frac{u_a [A^-]}{[HA] + [A^-]} \quad (V-3)$$

expresión en la que se tiene en cuenta la proporción de los iones considerados, frente al total de partículas portadoras del mismo agrupamiento estructural, ya sean iones o ya moléculas sin disociar.

Esta expresión puede darse también en función de la constante de disociación del compuesto HA considerado. En efecto, si se multiplica numerador y denominador por $\frac{[H^+]}{[HA]}$ se tiene:

$$U_a = \frac{u_a [A^-] \frac{[H^+]}{[HA]}}{\frac{[HA][H^+]}{[HA]} + \frac{[A^-][H^+]}{[HA]}} = \frac{u_a K_a}{[H^+] + K_a}$$

Expresión análoga obtendríamos para U_b , y la diferencia entre estas dos movilidades netas, U_a y U_b , sería una expresión de la separabilidad de las dos sustancias:

$$U_a - U_b = \frac{u_a K_a}{[H^+] + K_a} - \frac{u_b K_b}{[H^+] + K_b}$$

Dicha separabilidad será máxima cuando esta expresión lo sea; por tanto, veamos cuál será el valor de $[H^+]$ que le hace cumplir esta condición.

Derivando respecto a $[H^+]$, e igualando a cero esta primera derivada, tendremos:

$$(U_a - U_b)' = -\frac{u_a K_a}{([H^+] + K_a)^2} + \frac{u_b K_b}{([H^+] + K_b)^2} = 0$$

Desarrollando los cuadros y efectuando operaciones, en la forma que se indica, se tiene:

$$\begin{aligned} \frac{-u_a K_a}{[H^+]^2 + K_a^2 + 2K_a [H^+]} + \frac{u_b K_b}{[H^+]^2 + K_b^2 + 2K_b [H^+]} &= 0 \\ -u_a K_a [H^+]^2 - u_a K_a K_a^2 - 2u_a K_a K_b [H^+] + u_b K_b [H^+]^2 + & \\ + u_b K_b K_b^2 + 2u_b K_a K_b [H^+] &= 0 \end{aligned}$$

Reduciendo términos semejantes y ordenando según las potencias decrecientes de $[H^+]$, se llega a la ecuación de segundo grado siguiente:

$$(u_b K_b - u_a K_a) [H^+]^2 + (2 u_b K_a K_b - 2 u_a K_a K_b) [H^+] + (u_b K_b K_a^2 - u_a K_a K_b^2) = 0$$

cuyas soluciones serán:

$$[H^+] = \frac{2 u_b K_b K_a - 2 u_b K_a K_b \pm}{2 (u_b K_b - u_a K_a)}$$

$$\pm \sqrt{\frac{(2 u_b K_a K_b - 2 u_a K_a K_b)^2 - 4 (u_b K_b - u_a K_a) (u_b K_a^2 K_b - u_a K_a K_b^2)}{2 (u_b K_b - u_a K_a)}}$$

Efectuando las operaciones indicadas en la expresión subradical, y simplificando, queda:

$$[H^+] = \frac{2 u_a K_a K_b - 2 u_b K_a K_b \pm}{2 (u_b K_b - u_a K_a)}$$

$$\pm \sqrt{\frac{4 u_a u_b K_a K_b^3 + 4 u_a u_b K_a^3 K_b - 8 u_a u_b K_a^2 K_b^2}{2 (u_b K_b - u_a K_a)}}$$

Sacando $\sqrt{K_a K_b}$ factor común en el numerador total, y $u_a u_b$ en la suma algebraica subradical del mismo, se tiene:

$$[H^+] = \frac{\sqrt{K_a K_b} [(2 u_a - 2 u_b) \sqrt{K_a K_b} \pm \sqrt{u_a u_b (2 K_a - 2 K_b)^2}]}{2 (u_b K_b - u_a K_a)}$$

expresión que simplificada se transforma en:

$$[H^+] = \frac{\sqrt{K_a K_b} [(2 u_a - 2 u_b) \sqrt{K_a K_b} \pm \sqrt{u_a u_b} (2 K_a - 2 K_b)]}{2 (u_b K_b - u_a K_a)}$$

Dividiendo numerador y denominador por $2 u_b K_b$, se tiene:

$$[H^+] = \frac{\sqrt{K_a K_b} \left[\left(\frac{u_a}{u_b} - 1 \right) \sqrt{\frac{K_a}{K_b}} \pm \sqrt{\frac{u_a}{u_b}} \left(\frac{K_a}{K_b} - 1 \right) \right]}{1 - \frac{u_a K_a}{u_b K_b}}$$

Escribiendo en el numerador $\frac{u_a}{u_b}$ y $\frac{K_a}{K_b}$ como producto de dos radicales cuadráticos, reagrupando términos, y considerando el denominador como una diferencia de cuadrados, resulta:



$$[H^+] = \frac{\sqrt{K_a K_b} \left[\sqrt{\frac{u_a}{u_b}} \sqrt{\frac{u_a K_a}{u_b K_b}} - \sqrt{\frac{K_a}{K_b}} \pm \left(\sqrt{\frac{K_a}{K_b}} \sqrt{\frac{u_a K_a}{u_b K_b}} - \sqrt{\frac{u_a}{u_b}} \right) \right]}{\left(1 + \sqrt{\frac{u_a K_a}{u_b K_b}} \right) \left(1 - \sqrt{\frac{u_a K_a}{u_b K_b}} \right)}$$

que puede desdoblarse en las dos raíces siguientes:

$$\frac{\sqrt{K_a K_b} \left(\sqrt{\frac{u_a}{u_b}} \sqrt{\frac{u_a K_a}{u_b K_b}} - \sqrt{\frac{K_a}{K_b}} + \sqrt{\frac{K_a}{K_b}} \sqrt{\frac{u_a K_a}{u_b K_b}} - \sqrt{\frac{u_a}{u_b}} \right)}{D} \quad (A)$$

$$[H^+] \rightarrow \frac{\sqrt{K_a K_b} \left(\sqrt{\frac{u_a}{u_b}} \sqrt{\frac{u_a K_a}{u_b K_b}} - \sqrt{\frac{K_a}{K_b}} - \sqrt{\frac{K_a}{K_b}} \sqrt{\frac{u_a K_a}{u_b K_b}} + \sqrt{\frac{u_a}{u_b}} \right)}{D} \quad (B)$$

A su vez, estas raíces pueden simplificarse en la forma siguiente:

$$(A) = \frac{\sqrt{K_a K_b} \left[\sqrt{\frac{u_a}{u_b}} \left(\sqrt{\frac{u_a K_a}{u_b K_b}} - 1 \right) + \sqrt{\frac{K_a}{K_b}} \left(\sqrt{\frac{u_a K_a}{u_b K_b}} - 1 \right) \right]}{D} =$$

$$= \frac{\sqrt{K_a K_b} \left[\left(\sqrt{\frac{u_a K_a}{u_b K_b}} - 1 \right) \left(\sqrt{\frac{u_a}{u_b}} + \sqrt{\frac{K_a}{K_b}} \right) \right]}{\left(1 + \sqrt{\frac{u_a K_a}{u_b K_b}} \right) \left(1 - \sqrt{\frac{u_a K_a}{u_b K_b}} \right)} =$$

$$= - \frac{\sqrt{K_a K_b} \left(\sqrt{\frac{u_a}{u_b}} + \sqrt{\frac{K_a}{K_b}} \right)}{1 + \sqrt{\frac{u_a K_a}{u_b K_b}}}$$

$$(B) = \frac{\sqrt{K_a K_b} \left[\sqrt{\frac{u_a}{u_b}} \left(\sqrt{\frac{u_a K_a}{u_b K_b}} + 1 \right) - \sqrt{\frac{K_a}{K_b}} \left(\sqrt{\frac{u_a K_a}{u_b K_b}} + 1 \right) \right]}{D} =$$

$$= \frac{\sqrt{K_a K_b} \left[\left(\sqrt{\frac{u_a K_a}{u_b K_b}} + 1 \right) \left(\sqrt{\frac{u_a}{u_b}} - \sqrt{\frac{K_a}{K_b}} \right) \right]}{\left(1 + \sqrt{\frac{u_a K_a}{u_b K_b}} \right) \left(1 - \sqrt{\frac{u_a K_a}{u_b K_b}} \right)} =$$

$$= - \frac{\sqrt{K_a K_b} \left(\sqrt{\frac{u_a}{u_b}} - \sqrt{\frac{K_a}{K_b}} \right)}{1 - \sqrt{\frac{u_a K_a}{u_b K_b}}}$$

La expresión a que hemos llegado para la raíz (A) carece de sentido real, puesto que no es admisible una concentración negativa de iones hidrógeno.

La expresión última de la raíz (B) sólo tendrá sentido físico, para $K_a > K_b$ cuando no se cumplan los siguientes pares de condiciones:

$$\left. \begin{aligned} \sqrt{\frac{K_a}{K_b}} < \sqrt{\frac{u_a}{u_b}} \\ 1 < \sqrt{\frac{u_a K_a}{u_b K_b}} \end{aligned} \right\} [1] \quad \text{o bien} \quad \left. \begin{aligned} \sqrt{\frac{K_a}{K_b}} > \sqrt{\frac{u_a}{u_b}} \\ 1 > \sqrt{\frac{u_a K_a}{u_b K_b}} \end{aligned} \right\} [2]$$

que darían un valor negativo de $[H^+]$.

De [1] se deduce:

$$\frac{K_a}{K_b} < \frac{u_a}{u_b} \quad (V-4) \text{ y}$$

$$1 < \frac{u_a K_a}{u_b K_b}; \frac{K_b}{K_a} < \frac{u_a}{u_b}; \text{ e invirtiendo, resulta: } \frac{K_a}{K_b} > \frac{u_b}{u_a}$$

por lo que, teniendo en cuenta (V-4), podemos escribir:

$$\frac{u_b}{u_a} < \frac{K_a}{K_b} < \frac{u_a}{u_b}$$

lo que nos dice que, para que la expresión (B) de $[H^+]$ tenga sentido, siendo $K_a > K_b$, el valor K_a/K_b debe quedar fuera del intervalo $u_a/u_b - u_b/u_a$, conclusión a la que se llega, por el mismo camino, a partir de las condiciones [2].

El valor de $[H^+]$, dado por esta expresión y tenidas en cuenta las limitaciones antedichas, sustituido en la segunda derivada de la expresión general, la hace negativa, o lo que es lo mismo, representa un máximo de la función primitiva, la cual, como se recordará, es la expresión analítica de la diferencia de movilidades netas que, según se deduce de (V-2), marca, en definitiva, la separación electroforética de la pareja de sustancias en consideración.

COMPOSICIÓN Y FUERZA IÓNICA DEL TAMPÓN

También juega un papel importante en la electroforesis en papel, así como en la libre, la composición química del tampón utilizado, puesto que los iones del mismo, al ser adsorbidos por las partículas emigrantes,



contribuyen a su carga eléctrica, la cual, según hemos visto, es uno de los factores fundamentales que determinan la movilidad de dichas partículas. Se deduce, lógicamente, que no se trata sólo de una influencia de tipo cuantitativo, sino que, además, influye la clase y la valencia de los iones. Esto queda de manifiesto considerando los diferentes valores de proteínas plasmáticas obtenidos por ROPES y otros (87) en la electroforesis libre, utilizando distintos tampones. Algunos de tales resultados se resumen en la Tabla 17.

T A B L A 17

Sistema tampón	pH	Porcentajes relativos					
		Albúmina	Globulinas				
			α_1	α_2	β	φ	γ
Veronal sódico 0,1 N/veronal 0,2 N	8,6	56,5	4,9	8,3	13,7	5,2	11,4
$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, 0,064 M/ $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, 0,08 M	7,7	61,4	—	6,4	15,0	5,3	11,9

Según muchos autores (88) (89), son preferibles los sistemas tampón con iones monovalentes.

Por otro lado, dijimos ya que, cuando en el medio existen sales, la velocidad de desplazamiento de las partículas y, en consecuencia, su movilidad, resulta alterada por fenómenos de tipo eléctrico debidos a las interacciones que se producen entre iones y partículas. Por esto, es de gran importancia el mantener una fuerza iónica óptima (*), lo cual se logra con una disolución tampón adecuada, manteniéndose de esta manera constante, también, el pH. Tales consideraciones son de alto interés para el caso de la electroforesis de proteínas, y, en general, de los anfólitos, cuya carga, como hemos visto, varía con el pH de la solución.

Las fuerzas eléctricas que se ejercen entre iones, en solución acuosa, son del mismo tipo que las fuerzas térmicas, y en ellas influye, de manera apreciable, la distribución de los demás iones que haya presentes. El resultado de esto es un cambio en la fuerza neta, debida propiamente al campo eléctrico. Ello se considera como la causa principal del decrecimiento de movilidad, al aumentar la fuerza iónica.

(*) La fuerza o intensidad iónica es una medida de la intensidad del campo eléctrico debido a los iones que existen en la disolución.

(87) ROPES, M. W., PERLMANN, G. E., KAUFMAN, D. y BAUER, W., *J. Clin. Invest.* 33, 311 (1954).

(88) SMITH, R. y BRIGGS, D., *J. Phys. Colloid Chem.*, 54, 33 (1950).

(89) ALBERTY, R. A. y MARVIN, H. H., *J. Phys. Colloid Chem.*, 54, 48 (1950).

Después de lo indicado cabe pensar que, aun cuando la fuerza aplicada, HQ , permanezca constante, entrará en juego un nuevo efecto retardante debido a la «atmósfera iónica» (90) que rodea las partículas y que está formada por iones de carga opuesta a los que emigran, los cuales se agrupan alrededor de éstos, haciendo que el conjunto quede sometido a una fuerza de sentido opuesto que disminuye la movilidad de la partícula.

La efectividad de este efecto retardante depende de la concentración de los iones y de su carga; no influye para nada la naturaleza específica del ión, sino su valencia. LEWIS (91), basándose en observaciones anteriores de MELLAMBY, denominó a la causa de estos efectos «fuerza iónica», hallando, para la misma, la siguiente expresión matemática cuantitativa, en función de la concentración y de la valencia:

$$\text{Fuerza iónica} = \mu = 1/2 \sum_1^n c_i Z_i^2 \quad (\text{V-5})$$

en donde, ϵ representa el número de clases de iones del electrolito, c_i , las concentraciones de cada uno, en iones-gramo por litro, y Z_i , sus valencias respectivas.

La importancia del valor de la fuerza iónica del tampón se debe, en una gran parte, a que su variación de lugar a un distinto espesor, δ , de la capa iónica, de modo que, al aumentar la fuerza iónica, disminuye δ con lo que, de acuerdo con la fórmula (V-1) dada al principio de este capítulo, se hace menor la movilidad electroforética de las partículas.

El hecho continuamente observado de una mayor intensidad de corriente en los experimentos últimos de cada serie, a igualdad de las restantes condiciones, tiene ahora una clara justificación, puesto que, al haber tenido lugar una cierta evaporación del disolvente del tampón, en los ensayos precedentes, ha aumentado la concentración del mismo, con lo cual aumenta también su intensidad iónica, según se deduce de la fórmula (V-5).

TAMPONES BARBITÚRICOS

Procurando las condiciones óptimas, tanto de pH como de fuerza iónica, los tampones que más hemos utilizado para la separación de proteínas han sido los de dietil barbiturato sódico o veronal sódico (veronal

(90) DRYBR, P. y HÜCKEL, F., *Physik. Z.*, **24**, 185 (1923).

(91) LEWIS, G. N. y RANDALL, M., *J. Amer. Chem. Soc.*, **43**, 1112 (1921).

sódico 0,05 M / veronal 0,01 M) de pH 8,6 (para el que hemos calculado una fuerza iónica $\mu = 0,06$) y el de veronal sódico 0,075 M / veronal 0,015 M, de pH 8,6 y $\mu = 0,075$. La elección entre estos dos tampones, que sólo difieren en su fuerza iónica, debe hacerse teniendo en cuenta la duración del experimento. Para aquellos de duración más bien corta (4 ó 5 horas, a lo más) y con corrientes moderadas, pero no bajas, parece ser que va bastante mejor el de fuerza iónica más baja o sea, en este caso, el primero. En la electroforesis libre, por el contrario, el comúnmente utilizado es el de fuerza iónica 0,1. Estas conclusiones vienen confirmadas por varios autores, entre ellos FLYNN y DE MAYO (92), WILLIAMS (93) y RUNDLES, que, según refieren, obtienen resultados inmejorables utilizando el de fuerza iónica 0,075 en electroforesis de 16 horas. Naturalmente, esto debe ser así, ya que en los procesos cortos trabajamos a potenciales mayores, con lo cual se incrementa la evaporación y, con ella, la fuerza iónica al concentrarse el tampón.

TAMPONES DE BORATO

Los tampones de borato son defendidos por muchos autores, como CONSDEN y STANIER (94) y FOSTER (95). Las ventajas de este tampón radican en la capacidad del boro para formar complejos cargados que permiten la separación electroforética de moléculas, que, en sí, no son iónicas. Es conocida la tendencia del boro a la tetracoordinación y cómo está facilitada la satisfacción de esta tendencia en los compuestos con dos o más oxígenos contiguos, ya pertenezcan éstos a grupos alcohólicos o carboxílicos. Es muy típico el uso de tampones bóricos en la electroforesis de azúcares; puede admitirse que el átomo de boro se une, en principio, a dos oxígenos contiguos de los grupos oxhidrilo del azúcar, independientemente de que se trate de un azúcar neutro o ácido; en este último caso, surge la duda de si el puente se establece a semejanza de lo que ocurre en los complejos salicil-bóricos (96), interviniendo el OH del carboxilo, o si, por el contrario, es del tipo de los complejos pirocatequín-bóricos (97). En una segunda etapa, las otras dos valencias coordinativas del B pueden formar un segundo quelato con otra pareja de oxhidrilos de una nueva molécula, en cuyo caso, los planos de los anillos determinados en la doble

(92) FLYNN, F. V. y DE MAYO, P., *Lancet*, 261, 235 (1951).

(93) WILLIAMS, F. G., JR., PICKELS, E. G. y DURRUM, E. L., *Science*, 121, 829 (1955).

(94) CONSDEN, R. y STANIER, W. M., *Nature*, 170, 1069 (1952).

(95) FOSTER, A. B., *Chemistry & Industry*, 828 (1952); *J. Chem. Soc.*, 982 (1953).

(96) SCHAFER, H., *Z. anorg. allgem. Chem.*, 250, 82 (1942). [*C. A.* 37, 56712 (1943)].

(97) SCHAFER, H., *Z. anorg. allgem. Chem.*, 259, 86 (1949). [*C. A.*, 44, 3827 f (1950)].



quelatación serán entre sí perpendiculares, constituyendo un ejemplo de estereoisomería espiránica. No obstante, según trabajos de GONZÁLEZ CARRERÓ (98), a juzgar por la exaltación del carácter ácido del bórico, que sucede tanto en la formación de complejos con azúcares neutros como con azúcares ácidos, así como por otras consideraciones, debe admitirse que la formación de complejos queda detenida en la primera etapa. En el caso de azúcares ácidos, si la quelatación llegase a la segunda etapa, y si se supusiera el caso antes descartado de que el quelato se formara interviniendo los OH de los carboxilos de dos moléculas de ácido, el medio podría tender a adquirir reacción alcalina.

Naturalmente, en el caso que a nosotros nos interesa de la electroforesis, no tienen importancia, como tales, estas exaltaciones o regresiones del pH del medio, puesto que la preparación de material complejable, frente a la enorme masa de tampón, es siempre despreciable. Ahora bien, el conocimiento de la verdadera naturaleza de estos complejos sí que puede ser de interés para predecir el comportamiento frente a los diversos tampones bóricos, aun en el caso en que se suponga la formación de un complejo único.

La cuestión, en sí, presenta sus dificultades, puesto que a la inestabilidad propia de estas combinaciones, cabe agregar las posibilidades de escisión en el proceso electroforético, que provocarían un desplazamiento elongado del conjunto complejo bórico + azúcares de escisión del mismo arrastrados junto al complejo residual. Esto lo apuntamos, simplemente, como una sugerencia que requeriría una revisión experimental.

También llamamos la atención sobre el hecho señalado por TSUZUKI (99), de que los distintos agrupamientos bóricos: BO_3 , B_3O_3 y BO_2^- , tienen distinta capacidad formadora de complejos de este tipo. Efectivamente, en el uso de tampones bóricos, no se tiene mucho en cuenta este hecho, lo que podría determinar; o explicar, comportamientos anómalos de azúcares en la electroforesis de los mismos (nos referimos al caso de los azúcares por ser el más típico y por haber ocupado parte de nuestra atención).

EFFECTO DE ESTOS TAMPONES SOBRE LOS DIAGRAMAS ELECTROFORÉTICOS

Habiendo ensayado también la separación de seroproteínas con tampón de borato de pH 8,6 (8,8 g de borato sódico + 4,65 g de ácido bórico, para 1 litro) se han obtenido resultados satisfactorios en cuanto a la sepa-

(98) GONZÁLEZ CARRERÓ, J., *Combinaciones del ácido bórico con los dioles y alcohol-ácidos*, *Anales Univ. Murcia*, 14, C-46 (1955-1956).

(99) TSUZUKI, Y., *Chem. Ztbl.*, 3198 (1941).

ración aparente de las distintas fracciones. No obstante, comparando los electroforegramas correspondientes con los obtenidos con tampón de veronal del mismo pH y de la misma conductividad y $\mu = 0,066$ se observa que existen ciertas anomalías, que se repiten en varios experimentos con el mismo y con distintos sueros, lo que queda más claramente manifiesto en el trazado de los diagramas correspondientes a las respectivas lecturas densitométricas directas. De esta manera, observamos que es general el hecho de que la subfracción globulínica α_1 no se manifieste con el tampón de borato, mientras que aparecen claramente desdobladas con el mismo, las β_1 y β_2 -globulinas, lo que no siempre se consigue con el tampón de veronal. He aquí, como decíamos en otro lugar, la importancia que tiene incluso la composición química del tampón utilizado.

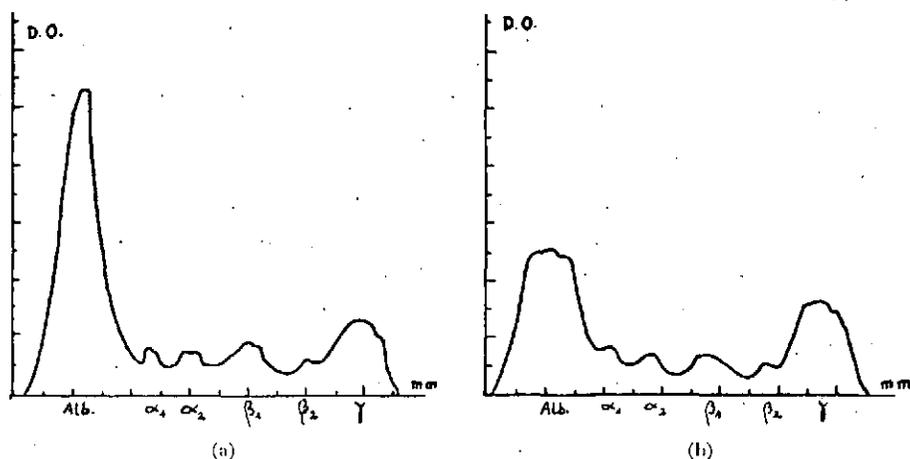


Fig. 11.—Diagramas de seroproteínas obtenidos con tampón de veronal (a) y de borato (b), ambos de pH 8,6

En los diagramas de la figura 11, correspondiente a las proteínas de un mismo suero, y en la Tabla 18, en la que se recogen los valores por-

T A B L A 1 8

Sistema tampón	pH	Valores porcentuales				
		Albúmina	Globulinas			
			α_1	α_2	β_1	β_2
De veronal	8,6	51,16	4,99	14,10	11,52	18,23
De borato	8,6	52,56	15,70	7,58	9,52	14,64

centuales deducidos de estos diagramas, se aprecian claramente las diferencias a que hemos hecho alusión; los electroforegramas correspondien-

tes a uno y otro diagrama se han obtenido utilizando tampón de veronal (a), en un caso, y de borato (b), en otro, ambos del mismo pH 8,6.

La elección del tampón, en cada caso, depende principalmente de la sustancia problema; pero, en general, siempre que las demás circunstancias lo permitan, deben utilizarse tampones de fuerza iónica lo más baja posible (compatible con el mantenimiento de pH, estabilidad y solubilidad), pues, de esta manera, podremos trabajar con intensidades de campo mayores, con la consiguiente ventaja en cuanto a tiempo del experimento y separación de las sustancias.

TAMPONES DE FOSFATO

Otros tampones bastante usados en la separación electroforética de proteínas son los de fosfato, entre ellos el de fosfato ácido de potasio de pH 7,7 (PO_4HK_2 0,064 M/ $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 0,08 M) y el de fosfato ácido de sodio de pH 7,4 ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$. H_2O 0,004 M/ PO_4HNa_2 0,015 M). Personalmente no nos mostramos muy partidarios de estos tampones, en cuanto a la obtención de proteinogramas, ya que los espectros electroforéticos

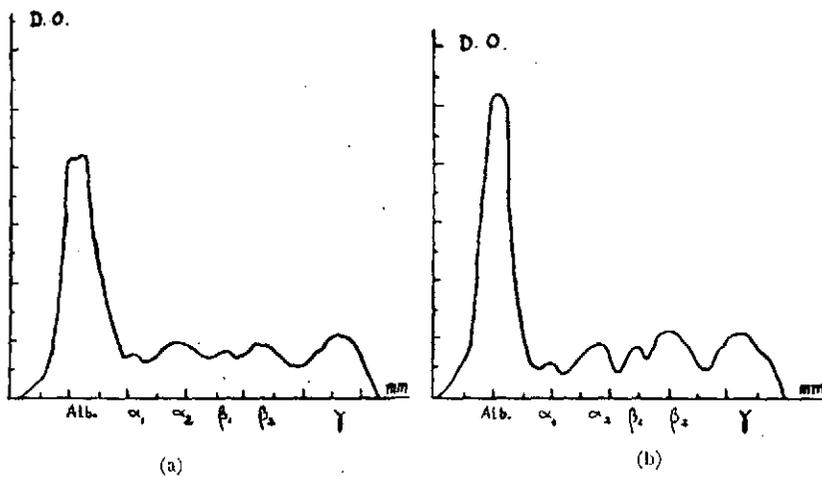


Fig. 12.—Proteinogramas correspondientes a un mismo suero, desarrollados con tampón de fosfato de pH 7,7 (a) y con tampón de veronal de pH 8,6 (b)

obtenidos con ellos aparecen manifiestamente emborronados, por la cola que las distintas fracciones dejan tras de sí, lo cual, naturalmente, lleva consigo un grave error para la obtención de resultados. Esto puede ser debido, al menos en parte, a una adsorción sobre el papel, de las proteínas, menos negativamente cargadas a este pH que a otros más altos. Por otro lado, con el de pH 7,7 (más utilizado por nosotros), la aparición de

la fracción globulínica α_1 es muy dudosa en nuestros experimentos. Estas diferencias quedan bien manifiestas al comparar el proteinograma (a) de la figura 12, obtenido con tampón de fosfato de pH 7,7 para un suero aproximadamente normal (tanto desde el punto de vista clínico como electroforético), con el proteinograma (b), correspondiente al mismo suero, pero obtenido con tampón de veronal de pH 8,6. En la Tabla 19 aparecen los resultados de la valoración densitométrica de ambos diagramas.

T A B L A 19

Tampón	pH	Valores porcentuales					
		Albúmina	Globulinas				
			α_1	α_2	β_1	β_2	γ
De fosfato	7,7	47,02	4,43	13,28	5,96	12,69	16,61
De veronal	8,6	56,41	3,76	10,60	4,96	6,50	17,77

Adviértase, en el primer caso, el aumento de las fracciones más lentas y la disminución de las más rápidas, respecto al segundo, así como la mayor uniformidad de distribución en la zona intermedia de aquel electroforegrama, zona que se corresponde con aquella del espectro en la que se manifiesta el emborronamiento o «rastro» proteínico.

Algo parecido observó LONGSWORTH (100) en la electroforesis libre, en la que, trabajando con tampón de fosfatos de pH 7,7, era desconocida la subfracción globulínica α_1 que se manifestó al emplear tampón de veronal de pH 8,6.

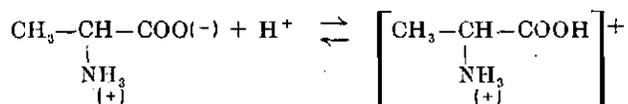
TAMPONES DE FTALATO

Para la separación de aminoácidos, el tampón que hemos utilizado preferentemente ha sido el de ftalato ácido de potasio de pH 5,9 (ftalato ácido de potasio 0,025 M/hidróxido sódico 0,0215 M) que, como hemos comprobado, permite la separación, por un lado, de los ácidos aspártico y glutámico (ambos hacia el ánodo), y por otro, de las tres bases exónicas (histidina, arginina y lisina) entre sí, en la zona catódica; los monoamino monocarboxílicos se separan, en general, como un grupo único, prácticamente no desviado, en la parte central, sobre todo en la electroforesis continua.

En la electroforesis analítica son de interés las primeras observaciones efectuadas sobre la influencia de la electroósmosis en la separación de

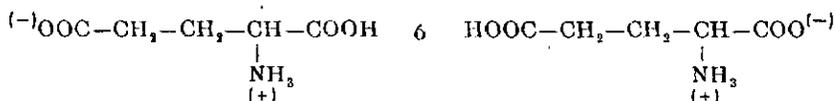
(100) LONGSWORTH, L. G., *Chem. Rev.*, 30, 323 (1942).

aminoácidos, considerada especialmente bajo el punto de vista de la relación pH del medio/pI de la sustancia emigrante. Entre los fenómenos observados, vamos a fijar en principio la atención en tres de ellos, correspondientes al comportamiento de los aminoácidos neutros, ácidos y básicos. Así, es lógico esperar que la alanina, aminoácido de carácter neutro (pI = 6), se desplace, en un medio ácido, hacia el cátodo, por quedar cargado positivamente:



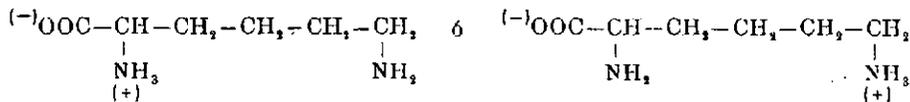
Pero, por tratarse, en este caso, de un medio ácido tan extremadamente débil (pH = 5,9) sobre todo frente al pI de la alanina (prácticamente, el mismo valor) la tensión electropositiva será enormemente pequeña; de acuerdo con esto, en la electroforesis continua hemos encontrado que los aminoácidos neutros siguen un curso, prácticamente no desviado hacia ningún polo. Sin embargo, el desplazamiento observado aquí, en el sentido del cátodo, es apreciable.

El ácido glutámico, en la electroforesis analítica, aparece muy desplazado hacia el ánodo, lo que nos indica, teniendo en cuenta su estructura:



que el pH correspondiente a su punto isoelectrónico (3,22) es más ácido que el del tampón utilizado, por lo cual actúa cediendo protones y quedando su molécula con una carga negativa.

Por la misma razón, aunque en sentido inverso, la lisina, aminoácido de carácter básico,



aparece desplazado hacia el cátodo, puesto que en medio ácido aceptará protones y quedará cargado positivamente.

Utilizando tampón de veronal de pH 8,6, la arginina, cuyo pI es 10,76 (*), se desplaza hacia el cátodo, igual que con el tampón de ftalato; la histidina (pI = 7,59), en el mismo tiempo que la anterior (30 minutos) no sufre desplazamiento alguno, a pesar de que por ser el pH del me-

(*) Los pI de los diferentes aminoácidos han sido tomados de la monografía de COHN y EDSALL, *Protein, amino acids and peptides*, Reinhold Publishing Corp., New York, 1943, pág. 84.

dio, 8,6, más alcalino que su pI, aquélla quedará cargada negativamente, siendo de esperar que su migración se verifique hacia el ánodo; sin embargo, permanece inmóvil. Esto se explica fácilmente considerando que, debido a la relativa proximidad de su pI al pH del medio en que se encuentra, su tensión electronegativa es enormemente pequeña, siendo fácilmente contrarrestada por la fuerza electroosmótica que actúa en sentido contrario, es decir, hacia el cátodo. Igual ocurre con la prolina, de menor peso molecular que la histidina, la cual debiéndose desplazar en principio hacia el ánodo, por ser su pI (6,3) inferior al pH utilizado, aparece, al cabo de 1^h 7^m, algo desplazada hacia el cátodo por efecto de la fuerza electroosmótica. Repitiendo los ensayos de la histidina con el mismo tampón, pero a potencial más alto (350 voltios) y con más tiempo (1 hora), el pequeño desplazamiento que se observa es en el sentido del cátodo, por la misma razón que la aducida anteriormente para la prolina; en este caso de la histidina, el desplazamiento es casi imperceptible, aunque comprobado, pero, desde luego, menor que en el caso de la prolina, porque, aunque la tensión electronegativa de la histidina, debido a la mayor proximidad de su pI al pH del medio, sea menor que la de la prolina, el peso molecular de aquélla es mayor y esto hace que la velocidad electroforética, absolutamente considerada, sea mayor para la prolina.

La lisina, de pI = 9,74, en el tampón de veronal de pH 8,6, se desplaza normalmente hacia el cátodo.

La fenil alanina (pI = 5,48), en igualdad de condiciones, permanece en el lugar de origen, lo que quiere decir que su velocidad electroforética, función del pH, pI, etc., se compensa exactamente, en estas condiciones, con la fuerza electroosmótica.

De todo lo anterior podemos concluir, que, para lograr buenas separaciones, es interesante utilizar sistemas tampón cuyos pH queden en zonas lo más distanciadas posible de los pI que corresponden a los distintos componentes de la mezcla a fraccionar, es decir, en la zona francamente alcalina de uno de ellos y en la igualmente ácida del otro. En cuanto a la separación entre sí de las sustancias que queden comprendidas dentro de un mismo grupo de éstos, intervienen factores específicos de cada una de ellas, que afectan, no al sentido del desplazamiento, sino más bien a la cuantía del mismo.

En la parte que dedicamos al estudio de la electroforesis continua sobre papel nos encontraremos con nuevos fenómenos, muy interesantes, para cuya interpretación hemos tenido que hacer uso nuevamente, en lo fundamental, de las relaciones pI/pH, además de considerar otros factores de posible o clara influencia.

OTROS TAMPONES

Es muy interesante el tampón de MICHAELIS (101) cuya solución madre de acetato sódico y veronal permite, con la adición de cantidades distintas de soluciones de ClNa y ClH , obtener distintos pH, desde 2,6 hasta 9,2, aproximadamente.

El tampón alcalino de glicocola, de pH 8,8 y $\mu = 0,07$ (102) se ha utilizado en los casos en que se ha de determinar la absorción en el ultravioleta de las fracciones proteínicas eluidas, ya que la glicocola no presenta absorción propia en la zona ultravioleta del espectro en la que, en cambio, sí la muestran las proteínas; de esta manera, es posible valorar aquellas directamente, inmodificadas, en vez de los productos de tinción de las mismas, desnaturalizadas por el calor.

Muy interesante es el sistema tampón constituido por trishidroximetilaminometano o TRIS [60,5 g/l (0,5)], ácido etilendiaminotetraacético o EDTA [6,0 g/l (0,021 M)] y ácido bórico [4,6 g/l (0,075 M)] (103), con el que se pueden distinguir, en el suero normal, hasta nueve fracciones proteínicas: prealbúmina, albúmina, tres componentes alfa, tres beta y la globulina gamma.

En otros casos, en que se trata de sustancias distintas, son más convenientes otros tampones. Así, por ejemplo, para el caso de los azúcares y sus derivados, se suele emplear con ventaja, por las razones que ya indicamos al hablar de los tampones de borato, el tampón bórico (104) de pH 9,2 (ácido bórico 0,2 M + hidróxido potásico 0,2 M, a partes iguales).

MODIFICACIONES SECUNDARIAS EN LOS SISTEMAS TAMPÓN

Las modificaciones secundarias que pueden introducirse en los sistemas tampón consisten principalmente en la adición, por un lado, de sustancias inertes, que no alteran ni su pH ni su fuerza iónica (caso de los aditivos inhibidores de evaporación) y, por otro, en la de sustancias formadoras de complejos, que, sin alterar tampoco aquellas condiciones, originan un cambio de signo en la carga de algunas partículas, con lo que cambia el sentido de migración de las mismas (105). Naturalmente, esto constituiría una manera de aumentar la selectividad de electromigración,

(101) MICHAELIS, L., *J. Biol. Chem.*, 87, 33 (1930).

(102) WUNDERLY, CH., *Plasma*, 2, 143 (1954) [*C. A.*, 49, 14868 b (1955)].

(103) ARONSSON, T. Y GRÖNWALL, A., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 9, 338 (1957) [*Science Tools*, 5, 21 (1958)].

(104) JEANICKE, L. Y VOLLBRECHTSHAUSEN, J., *Naturwissenschaften*, 39, 86 (1952).

(105) STRAIN, H. H. Y MURPHY, G. W., *Anal. Chem.*, 24, 50 (1952).

con el consiguiente interés analítico. El procedimiento puede utilizarse para obtener separaciones absolutas de iones semejantes, tales como los de cobre y níquel (106). Es curiosa también, a este respecto, la comunicación de LAURELL (107) quien refiere la prevención de precipitación de las γ -globulina, en tampones de fuerza iónica bajo, por adición, a los mismos, de sacarosa en concentración suficiente, lo que es especialmente útil en la electroforesis de zonas preparativa. Asimismo, refieren LAURELL y LAURELL (108) que la adición de iones calcio (1,25 milimoles/litro, en forma de lactato cálcico generalmente) a tampones de veronal de fuerza iónica comprendida entre 0,1 y 0,05 facilita notablemente la resolución de la globulina β (sobre todo, de sueros recientemente extraídos), en las dos subfracciones β_1 y β_2 .

-
- (106) STRAIN, H. H. Y SULLIVAN, J. C., *Anal. Chem.*, 23, 816 (1951).
(107) LAURELL, H., *Ciba Symp.* 1956, pág. 123.
(108) LAURELL, C. B. Y LAURELL, S., *Lancet*, 269, 4 (1955).



VI

FACTORES DETERMINANTES DE CORRIENTES LIQUIDAS:
ELECTROOSMOSIS, EVAPORACION Y CAPILARIDAD

Lo ideal en el proceso electroforético, en lo que al factor flujo líquido se refiere, es, indudablemente, que éste sea igual a cero en cualquier parte del papel y en todo momento, cosa difícil de conseguir, debido en primer lugar, al fenómeno de electroósmosis. Pero, ya que en condiciones normales hay que admitir como inevitable la existencia de corrientes líquidas, ha de tenerse en cuenta que aquéllas deberán ser constantes en dirección y magnitud, debiendo impedirse, a toda costa, la aparición de cualquier flujo transversal (109).

ELECTROÓSMOSIS

Consideremos en primer lugar la electroósmosis, fenómeno dirigido por la llamada «fuerza electroosmótica», que actúa, junto con la fuerza electroforética, sobre las partículas emigrantes. Se denomina electroósmosis, en general, al desplazamiento de un líquido, respecto a la superficie de un sólido, por efecto de una fuerza electromotriz aplicada.

Puesto que en nuestro trabajo precedió la observación experimental al estudio teórico de este fenómeno, creemos más lógico exponer, como una cuestión única, ambas cosas, comenzando por la observación de resultados, anómalos al parecer, que, en la búsqueda de una explicación adecuada, nos condujeron al conocimiento de la influencia de la electroós-

(109) VALMET, E. Y SVENSSON, H., *Science Tools*, 1, 3 (1954).

mosis en el proceso electroforético y a la revisión bibliográfica de esta influencia.

Desde la observación de los electroforegramas resultantes de los primeros experimentos, nos llamó la atención el hecho de que la banda correspondiente a la γ -globulina (recuérdese que estos experimentos se han llevado a cabo, principalmente, con seroproteínas; más adelante aclararemos estas cuestiones) aparecía siempre desplazada hacia el cátodo, no obstante ser su carga eléctrica negativa, como la de las restantes fracciones proteínicas, las que, de acuerdo con su carga, aparecen desplazadas hacia el ánodo. (Como se recordará, del capítulo anterior, la carga negativa de estas proteínas es consecuencia del valor de sus correspondientes pI, frente al pH del medio utilizado). Fué de notar también que la magnitud del desplazamiento de la γ -globulina, hacia el cátodo, no siempre era igual, para iguales condiciones de diferencia de potencial y tiempo, e incluso, en algunos casos, llegó a pasar la línea central de partida, también en el sentido del cátodo, la fracción globulínica siguiente, que, como veremos, corresponde a la β -globulina.

Repitiendo experimentos y controlando cuidadosamente sus condiciones, llegamos a la conclusión de que la única anomalía experimental, de técnica, observada, era la existencia de un pequeño desnivel entre las dos cubetas electródicas donde se introducen los extremos del papel en el tampón; esto se nos presentaba, pues, como causa única, aparente, de aquel desplazamiento, lo que comprobamos en experimentos sucesivos, en los que se observa una correspondencia entre la longitud de desplazamiento anormal y el grado de desnivel de la solución tampón. Como ejemplo, damos los resultados de dos electroforesis realizadas con dos tiras de papel Whatman n.º 1, ambos de iguales dimensiones y trabajando

TABLA 20

Experi- mento	CLASE DE PAPEL	Dimensiones cm	Desnivel anódico cm	Difer. poten. voltios	Tiempo minutos	Intensidad corr/cm mA/cm	Desplazam. catódico (*) cm.
108	Whatman n.º 1	3 x 25	+ 1,9	300	180	1,16	1,9
111	» » 1	3 x 25	- 1,7	300	180	1,13	0,6

(*) El desplazamiento catódico se mide a partir de la línea central del papel o línea de partida.

en condiciones idénticas, pero con desniveles en sentido contrario, o sea, con nivel más alto en el departamento anódico, en un caso, y en el catódico, en el otro, quedando sumergida, en el tampón, la misma longitud de papel (Tabla 20).

En el electroforegrama correspondiente al experimento 111 se observa que la banda correspondiente a la globulina γ permanece, prácticamente, en la línea de partida, donde se puso la muestra de suero. En el otro caso, por el contrario, está desplazado hacia el cátodo todo el electroforegrama, quedando comprendidos, entre la línea de partida y el cátodo, 1,9 centímetros de espectro.

La fuerza electroosmótica, que, en su relación con otros factores, consideramos, en parte al menos, como responsable del primer fenómeno, se debe a que el papel de filtro, típico sistema capilar, adquiere carga negativa frente a la solución tampón, o lo que es igual, la solución tampón carga positiva frente al papel de filtro, por lo que se produce, sobre la tira de papel, una corriente en sentido del cátodo, que es la llamada «corriente electroosmótica», la cual arrastrará a la globulina γ , predominantemente, hacia el cátodo, hasta que es detenida en el punto donde se compensa dicha fuerza electroosmótica con la corriente de evaporación en esta parte de la tira de papel. Esta última corriente es producida por el líquido tampón que, en virtud de la capilaridad del papel de filtro, asciende desde los depósitos electródicos, con el fin de restablecer el equilibrio «hídrico» cuando éste se ha perdido por evaporación del tampón en la tira de papel.

ALGUNAS CONSIDERACIONES ELECTROQUÍMICAS SOBRE EL FENÓMENO DE LA ELECTROÓSMOSIS EN EL PAPEL

La interpretación que puede darse al fenómeno de la electroósmosis en el papel es, en principio, idéntica a la que da la Electroquímica clásica para la electroósmosis, considerada como fenómeno electrocinético, en general. Este fenómeno fué descubierto por REUSS, en 1808, siendo uno de los fenómenos electroquímicos primeramente conocidos. Posteriormente se hicieron estudios experimentales sobre la electroósmosis por WIEDEMAN y QUINCKE, e igualmente fué objeto de investigaciones teóricas, por parte de HELMHOLTZ, LAMB, VON SMOLUCHOWSKI, PERRIN y otros. De MAC INNES (110) recogemos esta nota histórica, así como las bases del tratamiento teórico de la electroósmosis. BLOCK, DURRUM y ZWEIG (111) aplican igualmente este mismo tratamiento al caso del papel.

Las propiedades electrocinéticas de la interfase sólido-líquido son de

(110) MAC INNES, D. A., *The principles of Electrochemistry*, Reinhold Publishing Corp., New York., 1939, pág. 424.

(111) BLOCK, R. J., DURRUM, E. I. y ZWEIG, G., *Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*, Academic Press Inc., Publishers, New York, 1955, pág. 343.

gran importancia, tanto para el estudio de la electroósmosis, como para el de otros fenómenos, que afectan sobre todo a la migración de partículas de gran tamaño (caso de las soluciones coloidales de proteínas, por ejemplo). Aunque la presencia de estas interfases se da incluso en la llamada electroforesis libre, ya que nunca se puede prescindir, como mínimo, del tubo o célula en que se realiza el proceso, la extensión de la interfase crece enormemente, e igualmente crecen sus efectos, en todos los casos de electroforesis soportada (electroforesis sobre papel de filtro, sílice kieselgur, etc.).

Si suponemos el paso forzado de un electrolito a través de un material poroso o más exactamente, multicapilar, por este mismo hecho, se está provocando una diferencia de potencial entre ambas caras de dicho material y en el propio sentido de la corriente de líquido: es lo que podríamos llamar un *potencial de flujo*. A la inversa, si se aplica una diferencia de potencial a ambos lados de una masa porosa, se establece una corriente de electrolito a su través, que constituye, propiamente, la corriente de electroósmosis.

Para explicar el fenómeno anterior puede aplicarse, a la interfase sólido-líquido, el concepto de la doble capa, desarrollado por HELMHOLTZ (112) en 1879. Según PERRIN (113) la superficie de un capilar puede considerarse ser asiento de una doble capa de HELMHOLTZ (fig. 13); la pared

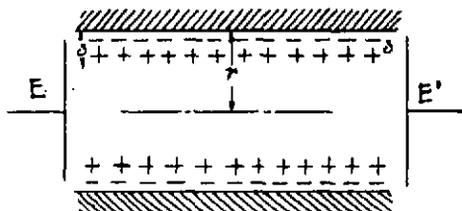


Fig. 13.—Esquema mostrando la disposición de la doble capa de HELMHOLTZ sobre la superficie de un capilar cilíndrico de radio r , situado entre los electrodos EE'

sólida del capilar soporta una carga determinada, en tanto que el líquido, en él contenido, muestra carga opuesta. Mientras la carga de la pared se puede considerar como estacionaria, la otra se moverá al hacerlo el propio fluido con quien va íntimamente ligada. Si se aplica una diferencia de potencial eléctrico entre los extremos del capilar, se producirá una migración de las cargas móviles y, en consecuencia, del líquido portador de las mismas. A este movimiento se opondrán las fuerzas de fricción exis-

(112) HELMHOLTZ, H., *Wied. Ann.*, 7, 337 (1879).

(113) PERRIN, J., *J. Chem. Phys.*, 2, 601 (1904).

tentes en el interior del líquido, que son proporcionales a la viscosidad, η , del líquido, a la superficie de contacto con el capilar y a los gradientes transversales de velocidad que se establecen entre las distintas partículas del fluido en movimiento.

Si consideramos una velocidad media de flujo, U , el volumen de líquido, V , que fluye por segundo del capilar de radio interior r , será

$$V = \pi r^2 U \quad (\text{VI-1})$$

La velocidad U puede suponerse constante en todo el líquido del capilar, salvo en las zonas de grosor δ de la superficie, asiento de la doble capa, en las cuales la velocidad, en una primera aproximación, varía linealmente en la dirección z , perpendicular a las paredes del capilar. Según esto, el gradiente de velocidad dU/dz puede sustituirse insensiblemente por el cociente U/δ . Si consideramos que el capilar de radio r tiene una superficie unidad, la fuerza de fricción vendrá dada por la expresión $U\eta/\delta$ y, teniendo en cuenta (VI-1), podrá escribirse:

$$\frac{U\eta}{\delta} = \frac{V\eta}{\pi r^2 \delta} \quad (\text{VI-2})$$

A su vez, la fuerza eléctrica que actúa sobre la superficie móvil de la doble capa será, para una superficie unidad, igual al gradiente de potencial aplicado, considerado longitudinalmente, dE/dx , y multiplicado por la densidad de carga, σ ; es decir, que en un estado estacionario será:

$$\sigma \frac{dE}{dx} = \frac{V\eta}{\pi r^2 \delta} \quad (\text{VI-3})$$

Ahora bien, la doble capa eléctrica de HELMHOLTZ, establecida entre el sólido y el líquido, puede equipararse a un condensador de láminas paralelas, en el que éstas estuviesen separadas por δ centímetros y en el que cada una de las láminas (superficies de la doble capa) soportara una carga σ por cm^2 . Según esto, y de acuerdo con la teoría electrostática, el potencial electrocinético o «potencial zeta», en un medio de constante dieléctrica, D , vendría dado por la fórmula:

$$\text{Potencial zeta} = Z = \frac{4\pi\sigma\delta}{D} \quad (\text{VI-4})$$

Pues bien, si en la expresión:

$$V = \sigma \frac{\pi r^2 \delta}{\eta} \frac{dE}{dx} \quad (\text{VI-5})$$

que resulta al despejar V en (VI-3), se sustituye σ por su valor deducido de la ecuación (VI-4), se tiene:

$$v = \frac{Z r^2 D}{4 \eta} \frac{dE}{dx} \quad (\text{VI-6})$$

Considerando que el capilar es uniforme y de longitud l , el gradiente dE/dx puede sustituirse por la relación E/l (siendo E el potencial aplicado), con lo cual la expresión (VI-6) se convierte en

$$v = \frac{Z r^2 E D}{4 \eta l} \quad (\text{VI-7})$$

en la que se relacionan el flujo de líquido por segundo, en el capilar, y el «potencial zeta», por una serie de magnitudes determinables experimentalmente.

De igual manera, si despejamos U en la ecuación (VI-1) y sustituimos en ella el valor de V dado por la ecuación (VI-6), obtenemos la correspondiente expresión para la velocidad electroosmótica:

$$U = \frac{Z D}{4 \pi \eta} \frac{dE}{dx} \quad (\text{VI-8})$$

y si el gradiente de potencial dE/dx es un voltio por centímetro, podemos escribir:

$$U = U_0 = \frac{Z D}{4 \pi \eta} \quad (\text{VI-9})$$

ecuación que relaciona la movilidad electroosmótica, U_0 , con el «potencial Z » y con la constante dieléctrica, y que es idéntica a la clásica ecuación de HELMHOLTZ para la movilidad electroforética de partículas coloidales.

Un concepto más moderno de la doble capa, propuesto por Gouy (114), considera que aquella es difusa, sin límites bien definidos, especialmente por la zona líquida, hasta el punto de que, en ella, la interfase tiene un mayor grosor, adentrándose, en proporción discreta, en el interior de la fase líquida. En esta zona, al igual que en el resto, las fuerzas térmicas causan también movimiento de los iones presentes, pero la distribución de los mismos, positivos y negativos, no se hace por igual, sino que son atraídos preferentemente los de uno u otro signo en dependencia con las causas manifestadas por la pared sólida, de manera que tiende a establecerse una doble capa, ya sea estática o semidinámica. La capa difusa de

(114) Gouy, A., *J. phys. radium*, 4, 9, 457 (1910).



GOUY es lo mismo, en principio, que la atmósfera iónica de DEBYE y HÜCKEL (115); realmente, estos últimos autores aplican la teoría de GOUY, de las superficies estáticas en contacto con líquidos, al caso de las disoluciones de electrolitos.

En la electroforesis libre, el área de las paredes de la célula electrofórica es tan pequeña, en comparación con el volumen de la columna de fluido, que, prácticamente, hace despreciable la electroósmosis, y por ello, es necesario introducir correcciones para este factor en el cálculo de movilidades. En la mayoría de los experimentos con medios anticonvección, sin embargo, la superficie en contacto con el electrolito es muy considerable, en comparación con el volumen de éste, y, en consecuencia, la endósmosis, como también se llama a la electroósmosis, es muy pronunciada, siendo un factor a tener en cuenta en la medida de movilidades.

El sentido de la corriente electrosmótica depende de la carga o aptitud del propio soporte para tomarla. Así, en el caso del papel de filtro o en el del almidón, en los que las superficies de estos materiales están cargadas negativamente a los pH más variados, el flujo de electrolito es hacia el cátodo, siendo tanto más marcado cuanto más elevado es el pH, y disminuyendo cuanto más elevada sea la fuerza iónica, pues al aumentar ésta se reduce la separación, δ pudiendo escribir, para ambas magnitudes, la siguiente relación inversa:

$$\delta = K \frac{1}{\sqrt{\mu}}$$

en la que K es una constante de proporcionalidad y μ representa la fuerza iónica. La fórmula anterior puede escribirse también bajo esta otra forma:

$$\delta = \frac{1}{K' \sqrt{\mu}} \quad (\text{V-10})$$

habiéndose encontrado para las partículas proteínicas, a 25° C, el siguiente valor de la constante:

$$K' = \frac{1}{K} = \frac{1}{3 \cdot 10^{-8}} = 0,33 \cdot 10^8$$

Sustituyendo este valor de K' en (VI-10) se obtiene un valor para δ

(115) DEBYE, P. y HÜCKEL, E., *Phys. Z.*, 24, 185 (1923).

que, sustituido, a su vez, en la expresión (VI-4) da un valor para el *potencial* Z , producido en la superficie de la capa de disolvente que rodea las partículas proteínicas, que guarda, a la temperatura dicha de 25° C, la siguiente relación con la fuerza iónica:

$$Z = \frac{4\pi\sigma\delta}{D} = \frac{4\pi\sigma}{D} \frac{1}{0,33 \cdot 10^8 \sqrt{\mu}} \quad (\text{VI-11})$$

La movilidad, u , según vimos en (V-1), es directamente proporcional al espesor, δ , de la doble capa; éste, a su vez, está también en relación directa con el *potencial* Z según (VI-4); por lo tanto, la movilidad será también directamente proporcional a dicho potencial. De esta manera, llamando K'' a la constante de proporcionalidad entre el *potencial* Z y la movilidad, u , podemos escribir la siguiente relación:

$$u = \frac{K'' 4\pi\sigma}{D} \frac{1}{0,33 \cdot 10^8 \sqrt{\mu}} \quad (\text{VI-12})$$

según la cual, al aumentar el valor del potencial Z , se incrementa también el de la movilidad, siempre que los demás factores permanezcan constantes; esto se puede conseguir trabajando con tampones de intensidad iónica menor. Así, McDONALD, URBIN y WILLIAMSON (116) comprobaron, para el caso de la leucina en un tampón de ftalato ácido de potasio de $\mu = 0,02$, una movilidad de $0,20 \cdot 10^{-4}$ cm²/seg. vol, que ascendió a $0,37 \cdot 10^{-4}$ cm²/seg. vol al disminuir μ a 0,0025.

SOBRE LAS CAUSAS QUÍMICAS DE LA CARCA ELÉCTRICA DEL PAPEL

Algunos autores atribuyen la carga negativa del papel [el papel tiene un potencial electrocinético usualmente negativo (117)] a la presencia, en la celulosa, de un pequeño número de grupos carboxilo, según indicamos en otro lugar. Realmente existe la duda de si estos grupos carboxilo son o no naturales en la celulosa «in situ», o si, por el contrario, son fruto del proceso de elaboración; el hecho es que cada vez se confirma más su presencia en una amplia gama de polisacáridos antes tenidos como integrados exclusivamente por azúcares neutros; en las hemicelulosas es ya un hecho innegable su presencia general, y en la celulosa existen también bastantes pruebas en favor de la presencia de algún eslabón de tipo uró-

(116) McDONALD, H. J., URBIN, M. C. y WILLIAMSON, M. B., *J. Colloid Sci.* 6, 236 (1951).

(117) SVENSON, H., *Ciba Symp.* 1956, pág. 91.



niño; concretamente, en el papel cromatográfico, en sus diversos tipos, como quiera que su elaboración requiere una serie sucesiva de tratamientos, más o menos drásticos, es muy posible la formación de grupos $-\text{COOH}$, aun cuando en la estructura original no existiesen.

FLUJO LÍQUIDO QUE ESTA CARGA ORIGINA

El flujo electroósmótico que origina la carga negativa del papel, sea cual sea su origen, es constante en dirección y magnitud, es decir, cumple las condiciones indicadas al principio de este capítulo para cualquier flujo permisible. Por lo tanto, un flujo de este tipo, siempre que sea moderado para no emborronar los frentes de migración, no supone gran inconveniente, toda vez que, como después veremos, los resultados pueden ser corregidos midiendo la velocidad lineal de dicho flujo.

JERMYN y THOMAS (118) refieren que la fuerza iónica del tampón tiende a contrarrestar el flujo electroosmótico, mientras que éste queda incrementado a valores de pH que favorecen la ionización de los grupos negativos en el sistema capilar.

Diversos autores han sugerido distintos procedimientos para anular o reducir el flujo electroosmótico. Entre ellos citaremos los debidos a JERMYN y THOMAS (118) y a PORATH (119), que recomiendan un tratamiento químico previo del papel, que neutralice sus grupos negativos. Este procedimiento, además de poder resultar molesto, no evita del todo el flujo electroosmótico, debido, probablemente, a la absorción física de los iones de la solución tampón. Otros autores (120) consideran como método más seguro y sencillo, el de adicionar a la disolución electrolítica lo que podríamos llamar «contraiones», los cuales serían absorbibles, preferentemente, por el sistema capilar, en competición con los anteriores. Nosotros, según dijimos antes y a la vista de nuestros resultados, consideramos innecesaria la corrección experimental del flujo electroosmótico, sobre todo mientras sea moderado; por otra parte, como también vimos anteriormente, este flujo puede contrarrestarse con otro controlado, de capilaridad y sifonación, que asciende desde el departamento catódico y que se debe a un mayor nivel de tampón en dicho departamento.

En los experimentos 111 y análogos, puede observarse, a la inversa, cómo las corrientes de evaporación y electroósmosis se compensan tanto más lejos de la línea de partida (permitiendo así mayor desplazamiento) cuanto más bajo sea el nivel en el departamento catódico.

(118) JERMYN, M. A., y THOMAS, R., *Nature*, 172, 728 (1953).

(119) PORATH, J., 1954, comunicación personal a H. SVENSSON, *Ciba Symp.* 1956, pág. 92.

(120) SVENSSON, H., *Ciba Symp.* 1956, pág. 92.

El hecho de que el efecto de la corriente electroosmótica, que se ejerce por igual frente a todas las seroproteínas, no sea observable a primera vista nada más que sobre la globulina gamma, es consecuencia de que esta fracción es la que posee menor velocidad electroforética, a causa de su mayor peso molecular y su menor tensión electronegativa, debido, esto último, a que el punto isoeléctrico de dicha globulina, es decir, el pH en el cual se comporta como neutra o desprovista de carga ($pI = 6$), es el más próximo de todos los de las seroproteínas al pH del medio en que trabajamos ($pH = 8,6$).

La línea donde se detiene la γ -globulina se llama por algunos autores «línea de equilibrio dinámico» y, según consideran, se puede tomar como límite de una zona, dentro de la cual no hay inconveniente en depositar la muestra de suero.

EVAPORACIÓN Y ELECTROÓSMOSIS

La evaporación de agua del tampón, en la tira de papel, ha sido ya indicada como una de las causas, y no de las menos importantes, de flujo de líquido, ya que las pérdidas de evaporación son reemplazadas por líquido que asciende, por succión capilar, desde los depósitos electródicos.

Aun cuando en el anterior comentario nos hemos referido a las corrientes de evaporación producidas sobre la zona catódica del papel, es de suponer, y así lo hemos comprobado experimentalmente, que estas corrientes se producen, de la misma manera, en la zona anódica, e, igualmente, actúan aquí como freno que tiende a contrarrestar la fuerza de migración electroforética de las partículas que se desplazan hacia el ánodo, aunque en su cuantía puedan influir, eventualmente, factores que actúan con asimetría en ambos departamentos electródicos.

El fenómeno de la evaporación ha sido especialmente estudiado por MACHEBOEUF y col. (121) (122) (123), los cuales comprobaron, que, estando el papel libremente apoyado sobre su eje de simetría transversal (que es como se encuentra en nuestro dispositivo habitual), la evaporación es máxima en las zonas de la tira de papel vecinas a los depósitos electródicos, disminuyendo, hacia las partes más elevadas, hasta llegar al vértice mismo en el que, prácticamente, no existe evaporación; en consecuencia, la corriente líquida provocada se inicia en los dos extremos de la tira de

(121) MACHEBOEUF, M., *Chem. Weekblad*, 49, 237 (1953) [*C. A.* 47, 7856d (1953)].

(122) MACHEBOEUF, M., REBEYROTTE, P., DUBERT, J. M. y BRUGNERIE, M., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 35, 334 (1953).

(123) MACHEBOEUF, M., DUBERT, J. y REBEYROTTE, P., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 35, 346 (1953).

papel y se encamina hacia el vértice con velocidad decreciente. Este flujo líquido es esencialmente longitudinal y paralelo a la corriente, pero no es constante, sino nulo en el centro del papel y creciente hacia los extremos.

Con objeto de estudiar el efecto combinado de las corrientes de evaporación y electroósmosis, MACHEBOEUF trabajó en una cabina electroforética con varios orificios en la tapa, con el fin de no entorpecer la evaporación, pero procurando evitar la producción de corrientes de aire. Para el estudio concreto de la corriente de electroósmosis utilizó una sustancia perteneciente al grupo de los llamados «indicadores electroosmóticos», sustancias que se suponen sin carga y que siguen el flujo del disolvente, del mismo tipo que la empleada por KUNKEL (124) para medir las movi- lidades reales de las partículas, según veremos después.

Nosotros hemos realizado un primer estudio de las corrientes de evaporación y electroósmosis, con una disposición análoga a la utilizada por MACHEBOEUF. Como indicador electroosmótico elegimos la glucosa, sustancia que, aparte de cumplir las condiciones requeridas por dichos indicadores, es fácil de detectar y, al mismo tiempo, es sustancia de bajo peso molecular: esta última condición, que recogemos de SVENSSON (125), es interesante, puesto que la adsorción de un solo ión del tampón por parte de la molécula del indicador, más fácil en las de gran tamaño por presentar mayor superficie, daría lugar a una movilidad perceptible de la misma, por acción directa de la corriente eléctrica sobre ella.

En los experimentos realizados con este fin utilizamos papel Archés n.º 301, de dimensiones 6 x 27 cm y tampón de veronal de pH 8,6. En la figura 14 reproducimos gráficamente la disposición adoptada. La línea VV' , que coincide con el centro de la tira de papel, es la arista del ángulo diedro que forma la misma, en el dispositivo electroforético utilizado. En los distintos puntos que se indican con circulitos en blanco, depositamos, con un capilar, las correspondientes muestras de una disolución de glucosa al 45 % aproximadamente. En estas condiciones damos comienzo al proceso electroforético con una diferencia de potencial, entre los extremos de la tira de papel, de 245 voltios y una intensidad de corriente, en este momento inicial, de 5,6 mA. Al cabo de 2^h20^m de electroforesis interrumpimos el proceso, cuando el paso de corriente era de 6,8 mA (la diferencia de potencial se mantiene constante). Retirada la tira de papel, calentamos suavemente para secar, apareciendo, al revelar con p-anisidina, las distintas posiciones alcanzadas por las diferentes muestras de glucosa al cabo de este tiempo de paso de corriente, las cuales, como puede observarse en la figura (circulitos en negro), no coinciden con las primiti-

(124) KUNKEL, H. y TISELIUS, A., *J. Gen. Physiol.*, 35, 89 (1951).

(125) SVENSSON, H., *Ciba Symp.* 1956, pág. 93.

vas, sino que ponen de manifiesto que todas las muestras han experimentado un cierto desplazamiento.

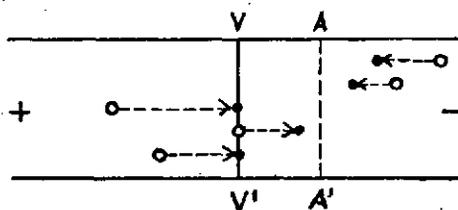


Fig. 14.—Esquema de la disposición adoptada para el estudio de las corrientes de electroosmosis y evaporación

Aun cuando las partículas no han alcanzado todavía la posición de equilibrio, el avance experimentado es ya suficiente para comprobar la influencia de las corrientes electroosmóticas y de evaporación en el desplazamiento de dichas partículas:

1) En primer lugar se observa que la muestra depositada en la línea VV' , en la cual se compensan exactamente las corrientes de evaporación (el nivel de líquido en ambos departamentos electródicos estuvo perfectamente controlado) aparece desplazada hacia el cátodo, o lo que es igual, en el sentido de la corriente electroosmótica.

2) Por otra parte, las muestras depositadas más próximamente al cátodo, se desplazan con más dificultad o menos velocidad (menor desplazamiento en el mismo tiempo) que las otras dos más próximas al ánodo, a pesar de que, por estar aquéllas más cerca del extremo de la tira de papel, el efecto propio de la corriente de evaporación ascendente es aquí mayor. La explicación está, sencillamente, en admitir la corriente de electroosmosis, que, por ir dirigida hacia el cátodo, se suma a la corriente de evaporación de la zona anódica, mientras que se opone a la que se produce en la región catódica.

3) Al mismo tiempo, nos sirve para comprobar la disminución de velocidad de las corrientes de evaporación, a medida que se alejan de los extremos del papel. Según se observa, tanto para partículas de la región anódica, como para las de la catódica, el desplazamiento es menor para las más alejadas del ánodo y del cátodo, respectivamente.

En igualdad de condiciones y siguiendo la misma técnica que en el experimento anterior, sometemos nuevas muestras de glucosa, colocadas exactamente igual que antes, a la acción de la corriente eléctrica, que interrumpimos, ahora, al cabo de 3 horas, siendo la intensidad de corriente, en este momento, de 7,1 mA. Al revelar aparecen todas las muestras algo más desplazadas que antes, en el mismo sentido, pero todavía no en la posición final esperada.

Tras un nuevo experimento de 5^h45^m, en idénticas condiciones, aparecen las distintas manchas casi a lo largo de una misma línea, aunque no completamente, y es en el siguiente experimento, al cabo de 6^h10^m, cuando esto se logra, habiéndose alcanzado en esa posición final, situada a 2,5 cm de la línea VV, el equilibrio entre la corriente electroosmótica y la de evaporación en esa zona del papel. MACHEBOEUF denominó a la línea determinada por esas posiciones (AA' en la fig. 15) «línea de flujo nulo» o «línea π ». Dicha línea permaneció invariable, en nuestros experimentos, al cabo de un nuevo proceso de 6^h45^m, con igualdad de las restantes condiciones.

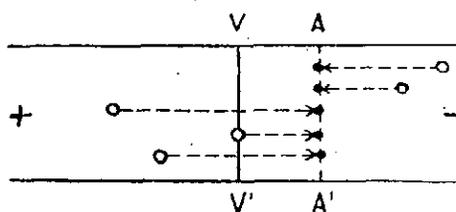


Fig. 15.—Esquema mostrando la posición de equilibrio alcanzada por las partículas de glucosa

Siguiendo la misma marcha demostramos, que, para la inulina, polímero de la fructosa y por tanto de mayor peso molecular que la glucosa, la posición final de la línea de flujo nulo es sensiblemente la misma que en el caso anterior, aunque los experimentos intermedios nos pusieron de manifiesto una menor velocidad de migración; ambas cosas las comprobamos en 2 nuevos experimentos, de 3 y 7 horas respectivamente, con muestras de glucosa e inulina, depositadas a lo largo de una misma línea; sobre pistas paralelas de la tira de papel.

Se demuestra, por tanto, que todas las sustancias no ionizables, bajo la acción de un campo eléctrico en estas condiciones, tienden, sea cual sea su punto de partida, hacia una posición de equilibrio, determinada por la suma algebraica de los efectos de las corrientes de evaporación y de electroósmosis.

EVAPORACIÓN, ELECTROÓSMOSIS Y ELECTROFORESIS

Para el caso de iones (proteínas cargadas, por ejemplo) hemos de considerar que sobre ellos actúan, además de las fuerzas de evaporación y electroósmosis, las propiamente electroforéticas, y, por lo tanto, su migración se modifica, respecto a la considerada anteriormente. Como el movimiento del líquido es el mismo que cuando la sustancia no es iónica,

el desplazamiento de los iones será también la suma algebraica del desplazamiento electroforético y del que experimenta la sustancia por efecto del movimiento del líquido en el papel. Si llamamos v a la velocidad de desplazamiento aparente con que las partículas cargadas emigran hacia el cátodo o hacia el ánodo, según sea su carga positiva o negativa, respectivamente, esta velocidad se compone de movimientos parciales, debidos, principalmente, a la evaporación (en los casos en que no está impedida, naturalmente) y a la electroósmosis. Las partículas en cuestión se encuentran, al principio, sobre la línea de origen VV' , y por efecto de la corriente eléctrica recorrerían un cierto camino, hacia el ánodo o hacia el cátodo, según su carga, con una velocidad de desplazamiento electroforético, ε en relación con su movilidad electroforética; a este traslado se superponen la fuerza de evaporación, E , y la electroosmótica, e , la primera oponiéndose siempre al desplazamiento electroforético, en tanto que la segunda, o electroosmótica, tendrá sentido aditivo o sustractivo según se trate de una migración catódica o de una anódica, respectivamente. Según esto, la velocidad de migración observada, v , o desplazamiento observado dividido por el tiempo del experimento (el factor de corrección del papel afectaría por igual a todos los desplazamientos) vendrá expresada por la suma algebraica siguiente:

$$v = \varepsilon - (E \pm e) \quad (\text{VI-13})$$

en la que el signo positivo para la corriente electroosmótica, corresponde a la migración anódica y el negativo a la catódica. En cada punto determinado del papel y para cada partícula cargada, ε es igual a $(E \pm e)$, y en esta posición, al ser $v = 0$, la partícula emigrante queda detenida. En este punto, alcanzado al cabo de un cierto tiempo, las corrientes electroosmóticas y de evaporación equilibran el desplazamiento electroforético de las partículas cargadas negativamente, como es el caso de las proteínas en los rangos de pH en que trabajamos nosotros con ellas.

La influencia de todos estos factores sobre la migración electroforética exige la introducción de correcciones, necesarias en la determinación de movilidades (tenidas ya en cuenta en las determinaciones efectuadas por nosotros), pero no para los fines analíticos comparativos, más usuales, de la electroforesis.

ELECTORREOFESIS

MACHEBOEUF demostró con una disposición análoga, denominada «electrorreoforesis» o electroforesis con evaporación continua, que la zona en donde queda finalmente detenido un ión es independiente de su punto

de partida; conseguido este punto de equilibrio no tiene lugar desplazamiento posterior alguno y, por tanto, será inútil prolongar la duración del experimento más allá del tiempo mínimo necesario para alcanzar esta posición. Es decir, al equilibrarse el desplazamiento electroforético con la corriente de líquido tampón que asciende y con la debida a la electroósmosis, es posible obtener un punto final de desplazamiento fijo e independiente del tiempo.

En la electrorreoforesis, la posición final de las partículas es completamente independiente de su concentración primitiva en la disolución a ensayar; ello resalta la importancia del método ante los problemas de la Biología, puesto que la mayor parte de las sustancias biológicas que requieren estudio se hallan disueltas, y, en ocasiones (caso de las proteínas del líquido ascítico o del céfalloarraquídeo, por ejemplo) en concentraciones muy pequeñas. La concentración alcanzada por cada sustancia en su punto final de equilibrio puede ser suficientemente elevada para permitir el revelado de materiales cuyas disoluciones habría que concentrar previamente para una electroforesis ordinaria.

Sin embargo, nosotros, a pesar de la preferencia que algunos autores muestran por el método de electrorreoforesis, le encontramos un serio inconveniente, ya que esta destilación continua del disolvente del tampón, con reposición simultánea de disolución nueva, origina una acumulación de los solutos no volátiles, que aumenta constantemente para cada punto del papel. La comprobación de este hecho la hemos efectuado, primero, pesando cuidadosamente las tiras de papel (Whatman n.º 1, 4 x 27 cm), secas, al cabo de tiempos diferentes de electroforesis (30 minutos, 1 hora, 1^h 30^m, 2^h, 2^h 30^m) obteniéndose valores crecientes con el tiempo, lo que, como veremos, no puede deberse a otra causa que no sea una mayor concentración de solutos en el papel. En segundo lugar, cortamos después de un cierto tiempo de electroforesis (unas dos horas y media, a 300 voltios) bandas transversales (de 0,5 cm de ancho), previamente marcadas en distintos puntos de la tira de papel (fig. 16), pesándolos dentro de un tubo cerrado, tarado de antemano para evitar la pérdida de humedad, sometida una nueva tira a electroforesis, en condiciones comprobadamente exactas a las del experimento anterior y al cabo de un tiempo mayor (4 horas) efectuamos la misma operación con las tiras parciales correspondientes a las anteriores. Así repetimos la misma operación para 1, 2, 3 y 4 horas, obteniendo resultados crecientes con el tiempo. Por diferencia entre estas pesadas y las obtenidas después para las mismas bandas, ya secas, pudimos comprobar que la cantidad de agua existente en aquellas situadas a la misma altura era sensiblemente igual en todos los casos, puesto que todas las pesadas habían disminuído aproximadamente en la

misma proporción. Los valores medios de tres determinaciones fueron: 0,0921 - 0,0863 - 0,0825 - 0,0764 - 0,0740 y correspondientes a las diferentes bandas de papel de la zona anódica, empezando a contar por las más próximas al extremo correspondiente del mismo. En la zona catódica los valores son algo mayores, pero del mismo sentido: 0,1021 - 0,0952 - 0,0906 - 0,0854 - 0,0860 g. De esta última pesada, y puesto que los tubos habían sido tarados previamente, pudimos deducir, asimismo, el aumen-

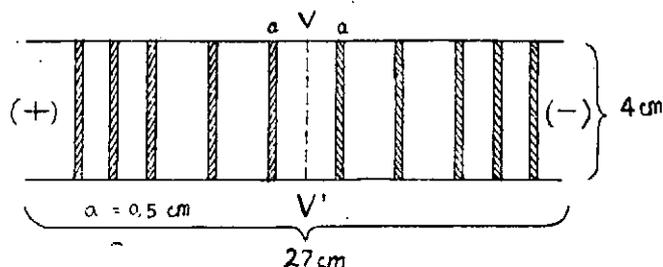


Fig. 16.—Esquema de la disposición adoptada sobre el papel para el estudio de la concentración y distribución longitudinal de solutos y grado de humedad en el mismo.

to hacia el vértice de concentración de sales en el papel (*). El mismo experimento nos permitió comprobar que existe una proporcionalidad directa entre las distancias del papel, medidas desde la línea de origen, y la cantidad de agua, en los puntos correspondientes a esas distancias; es decir, que el grado de humedad disminuye desde los extremos de la tira de papel hacia su vértice o centro, con lo cual la velocidad de las corrientes de evaporación debería aumentar en el mismo sentido.

Estos experimentos se realizaron con papel Whatman n.º 1, de dimensiones 4 x 27 cm. Resultados del mismo sentido se lograron utilizando papel Archés 301, de dimensiones 6 x 27 cm.

CORRIENTES DE EVAPORACIÓN

Los anteriores resultados parecen contradecir, en principio, no sólo los de aquellos autores que han estudiado el fenómeno de la evaporación

(*) A fin de comprobar si la pesada de porciones de papel constituía un criterio suficiente de interpretación, tomamos otra tira de papel idéntica y la mantuvimos sumergida en el tampón durante un tiempo igual al del experimento. Se seca también de la misma manera y se corta en bandas iguales entre sí, aunque cortadas en distintas zonas del papel y en diversas direcciones; tales bandas diferían, en peso, en menos de 0,2 mg. Como la inmersión en el tampón ha sido por tiempo muy prolongado (3 horas) es de suponer que estas pequeñas diferencias observadas se deban exclusivamente al papel, pero, por su cuantía, son despreciables en nuestros experimentos en los que las diferencias de pesadas, por distribución de tampón, han sido siempre superiores a los 2 mg.

[MACHEBOEUF (obs. cito.), E. VALMET y H. SVENSSON (126) y otros], sino también las deducciones propias, según las cuales las corrientes de evaporación, que, en último término, son corrientes de capilaridad, intensificadas durante el proceso electroforético por la evaporación provocada por el desarrollo de calor en la tira de papel, disminuyen en intensidad desde los extremos hacia el centro de la misma. En este aspecto hemos llegado a resultados muy claros con muestras de aminoácidos y azúcares depositadas a distancias diferentes de ambas zonas, anódica y catódica, de la tira de papel, y que, una vez reveladas (los aminoácidos con ninhidrina y los azúcares con p-anisidina), después de haber permanecido un cierto tiempo en el dispositivo electroforético, pero sin hacer pasar la corriente, aparecen desplazadas distancias decrecientes en un valor aproximadamente constante (por cada 2 cm de diferencia de altura se observa una disminución de 0,2-0,3 cm), es decir, que, puesto que el tiempo es el mismo, lo que realmente disminuye es la velocidad de la corriente de evaporación. Repetido a tiempos diferentes, encontramos que los desplazamientos aumentan para tiempos mayores y disminuyen para tiempos menores, pero la diferencia de un punto a otro, para un mismo tiempo, es prácticamente la misma siempre. Efectuados estos experimentos con proteínas obtenemos resultados semejantes, y, aunque menores, los desplazamientos son claramente perceptibles, lo que pone de manifiesto la importancia de las corrientes de capilaridad, aun para sustancias de elevado peso molecular. Esto nos demuestra, a su vez, la existencia de una corriente de evaporación base, debida a la evaporación natural, propia de la gran superficie relativa del papel.

Según estos últimos resultados las corrientes de evaporación disminuirán hacia el centro del papel, en aparente contradicción con lo deducido de los resultados que se obtuvieron por pesada, tanto sobre papel Whatman n.º 1, como sobre el Archés 301. A continuación intentamos una explicación del fenómeno.

CONCURRENCIA DE FACTORES

Después de una rigurosa comprobación de todos los factores que podrían intervenir en el proceso (el dispositivo utilizado fué el de tira de papel en V invertida) dedujimos que esto sólo podía ser explicado como el resultado de una competición entre las fuerzas de gravedad y las de capilaridad, favorable a las primeras cuando todavía no se ha establecido el equilibrio normal de condiciones del proceso. Después comprobamos, si-

(126) VALMET, E. y SVENSSON, H., *Science Tools*, 1, 5 (1954).

guiendo una marcha experimental análoga a las anteriores, para distintos tiempos a diferentes potenciales, que, en efecto, al cabo de un tiempo suficiente y distinto para cada conjunto de condiciones, el decrecimiento de humedad hacia arriba iba siendo cada vez menos sensible, hasta llegar a anularse prácticamente, al cabo de alrededor de 1^h 45^m - 2^h para 200 V, y de unas 4^h para 300 V, con papel Archés 301 de dimensiones 5 x 26 cm, y tampón de veronal de pH 8,6 y $\mu = 0,06$. Por otra parte, hemos comprobado que, disponiendo la tira de papel horizontalmente (el dispositivo adoptado fué muy elemental, pero cumplía todas las condiciones para un correcto control de factores), el equilibrio de condiciones se establecía rápidamente, sin duda, porque aquí desaparece el efecto diferencial de las fuerzas de gravedad.

Como resumen, puede concluirse, que la velocidad decreciente hacia el vértice del papel de las corrientes de evaporación, en general, es el resultado de una preponderancia de las de capilaridad, propias del papel (favorecidas, a su vez, por la evaporación uniforme en toda la tira, previa al paso de corriente), mientras que los efectos que sobre las partículas emigrantes provocan las corrientes superpuestas a aquéllas, debidas a la evaporación por desarrollo de calor, durante el proceso, pueden considerarse constantes, ya que su crecimiento hacia arriba, exigido por la disminución de disolvente encontrada experimentalmente, se ve contrarrestado por el incremento del depósito de sales que entorpecen su avance. lo que justifica, a su vez, la disminución de disolvente encontrada, ya que, de no ser por esta causa, debería hallarse en mayor proporción en estas zonas en las que la evaporación estaría disminuída, precisamente. por el aumento de concentración en sales.

DISTRIBUCIÓN DEL TAMPÓN Y CONDUCTIVIDAD

Para mayor conformidad de nuestros resultados se procedió a hacer una serie de medidas de conductividad sobre los eluidos, con agua destilada, de una serie de tiras o bandas transversales iguales, pertenecientes a una tira de papel sometida a electroforesis, y distribuídas, sobre la misma, de manera análoga al caso de las determinaciones por pesada, pero tomando, ahora, bandas contiguas. Transcurrido el tiempo elegido de paso de corriente (2^h 30^m a 300 V) se saca la tira secándola cuidadosa y uniformemente, se recortan las distintas bandas marcadas con anterioridad al proceso electroforético, y a continuación se verifica la elución de las sales que han quedado en ellas utilizando la misma cantidad de agua destilada (20 c.c.) para todas. Los resultados de un ensayo, que podrán

verse con más detalle en el Apéndice Experimental, se representan gráficamente en las curvas de la figura 17 y ponen de manifiesto una conductividad creciente desde las zonas más próximas a los departamentos electródicos hacia el centro de la tira de papel. Ello prueba un aumento del contenido en sales, en el mismo sentido, ya que, como la elución se hace con suficiente cantidad de agua, queda descartada la posibilidad de

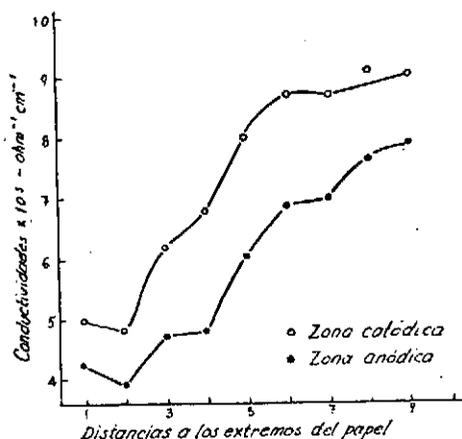


Fig. 17.—Representación gráfica de la variación de conductividad de eluidos, en diferentes zonas del papel

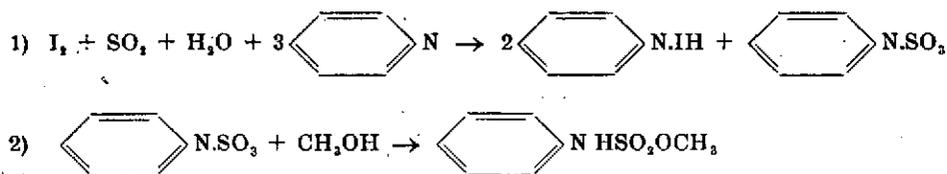
que exista una falta de disociación, por concentración excesiva. Estas gráficas revelan, asimismo, una mayor acumulación de sales en la vertiente catódica de la tira de papel, en cuyo sentido camina la corriente electrosmótica.

DISTRIBUCIÓN DE HUMEDAD A LO LARGO DE LA TIRA DE PAPEL

Para la medida de las cantidades absolutas de agua en cada una de las bandas de papel, en disposición semejante a la que reproduce la figura 16, se procedió, ahora, a ir cortando dichas bandas inmediatamente después de terminado el paso de corriente para evitar pérdidas de humedad, recogiénolas en matracitos aforados y esmerilados, sobre cantidades iguales de metanol, y haciendo, posteriormente, la valoración de cada uno de estos extractos metanólicos de agua mediante el reactivo de KARL FISCHER (*). En esta valoración, como se sabe, la reacción que tiene lugar y

(*) El trabajo original de KARL FISCHER [FISCHER, K., *Angew. Chem.*, 48, 394 (1935)], sobre el método, se publicó en 1935; pero, posteriormente, se han hecho sucesivas revisiones del mismo y se ha incrementado el número de aplicaciones, habiéndose llegado a superar las más diversas dificultades (J. MITCHELL y D. M. SMITH, *Aquametry*, Interscience Publishers, Inc., New York, 1948).

que, según SMITH, BRYANT, y MITCHELL (127), transcurre en dos etapas, es la siguiente:



En nuestros primeros experimentos, realizados con un reactivo de procedencia comercial, resultaba difícil la determinación visual del punto final, debido probablemente a que el reactivo era «viejo»; en estas condiciones, se realizaron, para la determinación de tal punto, medidas electro-métricas, cuyo fundamento está en la potenciometría del sistema redox $\text{I}_2/2\text{I}^-$ que es el que, en definitiva, rige el proceso. Posteriormente preparamos un reactivo a base de productos rigurosamente seleccionados, con el que resultaba fácil determinar el punto de viraje a simple vista y con el cual se lograron resultados coincidentes. Tratándose de una técnica de determinación de agua que no era todavía usual en nuestros laboratorios la pusimos a punto con este motivo.

Pudo apreciarse una disminución progresiva del contenido en agua, de cada una de las bandas, al aproximarse al centro del papel, variando desde 0,0898 a 0,0716 g en la zona anódica del mismo, y desde 0,0943 g a 0,0741 en la catódica.

Es fácil concluir, por lo tanto, que todos estos resultados confirman plenamente los que ya obtuvimos por pesada, con lo cual se refrendan las conclusiones sacadas anteriormente.

MEDIDAS SOBRE LOS EFECTOS DE ELECTROÓSMOSIS Y EVAPORACIÓN COMBINADOS. FACTOR ELECTROOSMÓTICO

Una confirmación posterior, de conjunto, de la interpretación dada a los fenómenos estudiados en este capítulo nos la proporciona un nuevo experimento efectuado con glucosa. La figura reproduce la disposición adoptada sobre la tira de papel (Archés 301, 6 x 27 cm); los circulitos en blanco indican los puntos donde se depositaron las muestras de glucosa, correspondiendo los negros a los centros de gravedad de las manchas que aparecen al revelar con p-anisidina después de 3 horas de paso de corriente a 300 voltios (sistema tampón, veronal/veronal sódico de pH 8,6). En

(127) SMITH, D. M., BRYANT, W. M. D. y MITCHELL, J., *J. Amer. Chem. Soc.*, 61, 2407 (1939).

una de las pistas de la figura se indica, sobre cada mancha de glucosa revelada, la distancia que recorre en la «electroforesis» expresada en centímetros; los valores de la migración de las muestras correspondientes a las otras dos pistas, que inicialmente se sitúan con un desplazamiento, respecto a las anteriores, de 1,5 cm hacia los extremos del papel, varían exactamente en el mismo sentido que los de aquéllas. No obstante, debe destacarse que, en valor absoluto, las distancias recorridas por las muestras de una y otra pista dependen de la posición inicial, siendo algo mayores en éstas últimas, lo que comprueba el aumento de intensidad de flujo ascendente, hacia los extremos.

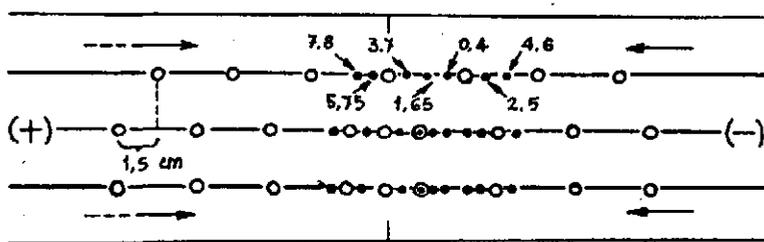


Fig. 18.—Esquema correspondiente a una «electroforesis» de glucosa

A la vista de estos resultados podemos hacer las siguientes observaciones:

1) Zona anódica: Los desplazamientos decrecen hacia el vértice del papel y la diferencia entre el desplazamiento de cada dos muestras consecutivas nos da el decrecimiento de la velocidad de flujo hacia dicho vértice. Este decrecimiento debe atribuirse, en principio, a la velocidad de la corriente de evaporación, puesto que la de electroósmosis, en todo caso, se aceleraría al aproximarse al cátodo. Esta diferencia es constante (2,05 cm).

2) Zona catódica: Los desplazamientos de las muestras situadas simétricamente de las anteriores, respecto al eje central transversal del papel, son menores que los correspondientes de la zona anódica (en la zona catódica, las corrientes de evaporación y electroósmosis son opuestas). Estas diferencias de desplazamiento guardan el siguiente orden: $7,8 - 4,6 = 3,2$; $5,75 - 2,5 = 3,25$; $3,7 - 0,4 = 3,3$; es decir, que las diferencias son mayores hacia el centro del papel, lo cual nos viene a confirmar que la corriente electrosmótica crece al aproximarse al cátodo, toda vez que las de evaporación son, evidentemente, simétricas para ambas vertientes de la tira de papel. Sin embargo, puesto que en dichas vertientes los decrecimientos a distancias diferentes son constantes (2,05 cm para la zona anódica y 2,1 cm para la catódica) puede afirmarse que la deceleración (o aceleración negativa) de las corrientes de evaporación se

compensa exactamente, en cada punto, con la aceleración de la electroósmosis.

Si ahora nos fijamos en estos últimos valores y tenemos en cuenta su significado, como diferencias entre los desplazamientos anódico y catódico de las muestras situadas simétricamente respecto al centro de la tira de papel, y como quiera que, según hemos dicho, el efecto de electroósmosis en la zona anódica se suma al de las corrientes de capilaridad, mientras que en la catódica se opone al mismo, si llamamos E al desplazamiento por evaporación o capilaridad, y e al debido a la electroósmosis, podremos escribir las siguientes relaciones:

$$3,2 = E + e - (E - e); \quad 3,2 = 2e; \quad e = \frac{3,2}{2} = 1,6 \text{ cm}$$

$$3,25 = E + e - (E - e); \quad 3,25 = 2e; \quad e = \frac{3,25}{2} = 1,625 \text{ cm}$$

$$3,3 = E + e - (E - e); \quad 3,3 = 2e; \quad e = \frac{3,3}{2} = 1,65 \text{ cm}$$

que nos dan los distintos valores del desplazamiento electroosmótico, cuyas diferencias o incrementos ($1,65 - 1,625 = 0,025 \text{ cm}$ y $1,625 - 1,6 = 0,025 \text{ cm}$) considerados por unidad de tiempo, nos dan una medida relativa de la aceleración electroosmótica, o bien, si se considera con independencia del tiempo, dicho valor representará lo que podríamos llamar la *contribución* o el *factor incrementante de desplazamiento electroosmótico*.

Si en un sistema de coordenadas llevamos sobre el eje de abscisas, a partir del origen, las distancias de los puntos donde se depositaron las muestras de glucosa al vértice del papel (eje transversal medio de la tira) y en ordenadas los desplazamientos absolutos de dichas muestras (medidos entre los centros de gravedad de las manchas de muestra depositada y de muestra revelada) obtenemos exactamente una línea recta (fig. 19).

En esta representación consideramos como positivos los desplazamientos de las muestras situadas en la zona anódica del papel, las cuales siguen el mismo sentido que la corriente electroosmótica, y como negativos los de la zona catódica cuyas muestras se desplazan en sentido opuesto a dicha corriente. La relación lineal encontrada entre los desplazamientos de las partículas y su posición inicial (distancia al origen) nos prueba la existencia de una ley constante de variación del fenómeno de la evaporación, o mejor dicho, del conjunto evaporación-electroósmosis. En efecto, al hacer todas las medidas sobre un electroforegrama único, es como si hubiésemos medido velocidades relativas en un tiempo fijo, pues no hay duda que la misma relación guardan las velocidades que los espacios re-

corridos por diversos móviles (en este caso, las partículas electroforéticamente inertes de glucosa) en un mismo tiempo.

El movimiento independiente de la corriente de evaporación, que teóricamente debe anularse en el vértice del papel (punto cero u origen de coordenadas, en la representación gráfica), podemos representarlo, cono-

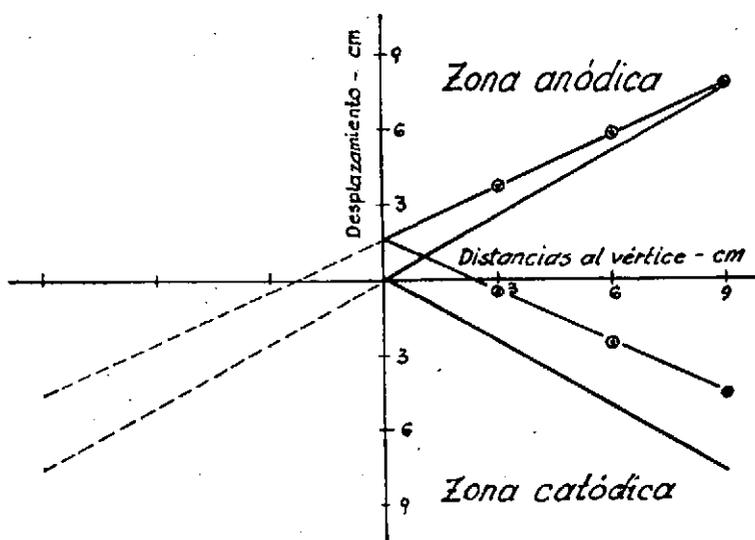


Fig. 19.—Representación gráfica de los efectos electroosmótico y de evaporación sobre la migración «electroforética» de la glucosa

cida su constancia, aunque no su uniformidad, por otra línea recta (de trazo continuo en el diagrama) que, naturalmente, ha de pasar por el origen de coordenadas y que se iniciará en la ordenada que corresponda a un desplazamiento menor que el total (debido a la electroósmosis y evaporación) en una cantidad, que, teóricamente, vendrá dada por el desplazamiento debido a la electroósmosis en el instante cero, lo que en la práctica equivale a un desplazamiento nulo; ello quiere decir que la recta de evaporación se iniciará, como se ha dibujado en la figura, en el mismo punto que representa el movimiento total. Según esto, la diferencia de ordenadas correspondientes a un mismo punto nos da el valor relativo del desplazamiento electroosmótico en ese punto, y, como puede observarse, este valor aumenta constantemente hacia el cátodo. La corriente de evaporación, es decir, la línea que la representa, como corresponde también a las consideraciones hechas en todo lo que antecede, es perfectamente simétrica respecto al eje de abscisas.

EVAPORACIÓN Y DIFUSIÓN

Acercas de la influencia que ejerce la evaporación, en actuación simultánea con la difusión, lo que en realidad queda tratado en el apartado que precede, vamos a referir, aunque sea sólo de pasada, una corta comunicación de J. DE WAEL, aportada en el *Symposium* sobre electroforesis en papel de 1955 en Londres (*) y que suscitó una discusión que nos pone claramente de manifiesto la falta de acuerdo en los puntos de vista de los diversos investigadores sobre esta cuestión. El citado autor hace una discusión matemática del problema, admitiendo una serie de hipótesis, que, si bien simplifican el cálculo, son algo expuestas ante la crítica sobre todo, al haber generalizado un tratamiento analítico, basado en unas premisas que, al parecer, sólo deben cumplirse en las condiciones por él utilizadas.

Así, por ejemplo, admite DE WAEL que la evaporación es uniforme sobre toda la tira de papel. Ciertamente que él utiliza un sistema de papel horizontal en el que, en principio, es fácil pensar en esta uniformidad, pero si tenemos en cuenta que en la velocidad de evaporación pueden influir una serie de factores secundarios, tales como tensión de vapor, temperatura, humedad relativa del ambiente, etc. y dado que estos factores no se manifiestan todos con distribución uniforme, ni aun en el citado dispositivo de tira horizontal, no puede admitirse esta premisa inicial, por lo que el cálculo de DE WAEL, que resulta francamente bonito desde el punto de vista matemático y físico-químico teórico, es algo defectuoso. Sin embargo, tiene mucho de aprovechable, sobre todo, cuando se aplica a un proceso electroforético de larga duración (el experimento de DE WAEL se refiere a 16 horas), ya que entonces podría alcanzarse, en sus condiciones, una cierta uniformidad, por compensación de efectos. Respecto a la falta de uniformidad en las corrientes de evaporación, creemos que constituyen experimentos muy significativos los que nosotros hemos descrito en páginas anteriores consistentes en determinar la distribución de sales y agua a lo largo de la tira de papel, por medida de conductividades, pérdida de peso y aumento absoluta de sales procedentes del tampón; como también se indicó, nuestros experimentos se hicieron en las condiciones de DURRUM con el papel en V invertida, que, naturalmente, no son las mismas que las de DE WAEL, pero que sirven para demostrar el error de la generalización hecha por este autor, que se ha basado en un experimento, que, aunque bien planeado, le condujo a un resultado erróneo.

(*) Repelidas veces, en la bibliografía referida en este trabajo, se ha hecho mención bajo la abreviatura «Ciba Symp. 1956» de una publicación de la Ed. J. and A. Churchill Ltd., que recoge los trabajos presentados en esta Reunión organizada por la Fundación Ciba.

EVAPORACIÓN E INTENSIDAD DE CORRIENTE

WUNDERLY (128) refiere haberse determinado que con una tensión de campo eléctrico de 250 voltios e intensidad de corriente de 0,5 mA, a 20° C, se evaporan 10 mm³ de agua, por cm² de papel y por hora. La evaporación, correlacionada con la intensidad de corriente, se midió pesando los vasos soporte y las tiras de papel cada hora (Tabla 21) (129).

TABLA 21

Intensidad de corriente	Evaporación por hora			
	6° C	20° C	6° C	20° C
	mg de agua por tira de papel		mg de agua por cm ² hora	
0,00	11	11	0,12	0,12
0,25	56	80	0,63	0,91
0,50	225	270	2,57	3,09
1,00		730		8,33

Estos valores de la evaporación, sobre todo los correspondientes a 20° C, justificarían el que se suela recomendar no trabajar con voltajes elevados, puesto que está claro el gran aumento del grado de evaporación con el voltaje. No obstante, ya dijimos que hay sistemas, como el que nosotros hemos seguido en las determinaciones usuales, con evaporación parcialmente inhibida, que permiten elevar el voltaje más de lo corriente, sin que de ello resulte perturbación alguna.

Igualmente refiere el hecho de que para estudiar la relación existente entre el tiempo y el desplazamiento se llevaron a cabo ensayos con una proteína teñida, con dextrina, con púrpura de bromocresol y con dibromofluoresceína. La representación gráfica de los resultados se hace tomando en abscisas el tiempo en horas y en ordenadas el logaritmo de las distancias respectivas entre la sustancia emigrante y el vértice del papel, habiéndose observado, en todos los casos, una relación lineal que facilita mucho la determinación de la velocidad absoluta de desplazamiento de las distintas fracciones.

(128) WUNDERLY, CH., *La Electroforesis en papel*. (Trad. J. GRAS), Ed. Científico-Médica, Barcelona, 1956, pág. 18.

(129) SLOTTA, K. H., BRIL, S. y BALLESTER, A., *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, 296, 141 (1954).

CALOR Y EVAPORACIÓN. OTROS EFECTOS SECUNDARIOS DEL CALOR

Considerando todos estos fenómenos últimamente expuestos, es inmediato pensar que la influencia del calor, disminuyendo las movi­lidades electroforéticas, aun en el caso de las proteínas, no sólo se debe a la posible desnaturalización de las mismas, sino, quizás principalmente, a las corrientes de evaporación a que da lugar y que transcurren en sentido opuesto a la migración de las partículas. De esta manera, sería posible, en principio establecer una medida de la evaporación de agua del tampón, fundada en la disminución que sufriría el desplazamiento de las partículas a igualdad de las restantes condiciones. La retención de migración, en aparatos con evaporación continua, podría ser debida, igualmente, al entorpecimiento que significa la concentración o acumulación creciente de electrolitos no volátiles en el papel, que, por otra parte, en casos como el de las seroproteínas, puede tener otro efecto de primordial importancia, en cuanto que una determinada concentración de sales puede dar lugar a la precipitación de las distintas proteínas, con grado variable de desnaturalización de las mismas.

EFECTO DE SIFÓN

Por último, recordemos que otro factor que se puede superponer a los anteriores y que incluso puede contrarrestar y aún superar al efecto electrosmótico, es el «efecto de sifón» que puede desarrollarse en la tira de papel dada su naturaleza capilar, y que se origina por el distinto nivel de la solución tampón en las vasijas electródicas; este efecto es precisamente el que nosotros provocamos en los ensayos 108 y 111 (Tabla 20), y que nos sirvió, a la vez, de guía y comprobación en la explicación de las aparentes anomalías encontradas en el estudio de las cuestiones referidas en aquel lugar.

Nos hemos referido aquí al efecto de sifón fácil de darse en el dispositivo de tira en V invertida, al que venimos haciendo alusión continuamente. Pero este efecto puede manifestarse también en la técnica de papel horizontal, cuando, por no hallarse el papel suficientemente tenso, su centro queda por debajo del nivel de tampón en los departamentos electródicos. Algunos investigadores [SVENSSON, por ejemplo (130)], basándose en razones teóricas, han propuesto la posibilidad de utilizar este efecto, que en principio puede llegar a provocar el goteo de tampón en

(130) SVENSSON, H., *Ciba Symp.* 1956, pág. 129.

esa zona baja de la comba que forma el papel, en un sentido ventajoso, calculado cuál debe ser el grado de destensión del mismo para que éste efecto de sifonación compense la creciente evaporación de agua hacia el centro, provocando, en definitiva, una regularidad en la distribución de humedad. Esta uniformidad puede parecer ventajosa, en principio; pero si pensamos en que la misma se consigue a base de incrementar las corrientes de evaporación (por sifonación, en este caso), comprenderemos que, en realidad, no existen tales ventajas, en cuanto a la separación de sustancias, o al menos, son muy reducidas.

De acuerdo con las deducciones que se desprenden del estudio de la influencia de las corrientes líquidas en la tira de papel, se suele recomendar el empleo de papeles tupidos y resistentes a la humedad, que poseen menor capacidad de succión, dificultándose más, por esto, dichas corrientes de líquido, al reducirse el efecto de «aspiración» que depende, en primer lugar, de la capilaridad del papel, y que, en definitiva, es perfectamente identificable con el efecto de succión.

EFFECTO ELECTROOSMÓTICO EN LA MEDIDA DE MOVILIDADES

Estos factores de capilaridad que intervienen en el desplazamiento electroforético en papel han sido estudiados por KUNKEL y TISELIUS (131) con vistas a introducir una corrección de la electroósmosis. Para ello utilizaron como indicador electroosmótico el dextrano, polisacárido de elevado peso molecular, que, en la electroforesis libre con tampón de veronal de pH 8,8, mostraba una movilidad prácticamente nula (a valores más bajos de pH hemos podido comprobar que tiene una pequeña movilidad positiva), colocando una gotita de una solución del mismo, al 3 %, en la línea de origen y revelándolo, al final del experimento, con azul de bromofenol. De este modo les fué posible seguir y comparar los desplazamientos del indicador y de las partículas proteínicas.

En el caso de la albúmina, por ejemplo, si d_{alb} es la distancia recorrida por la misma, desde el origen, y d_{dex} la que ha recorrido el dextrano en sentido opuesto, por efecto de la electroósmosis, la distancia total que la albúmina habría recorrido de no existir electroósmosis, sería $d_{alb} + d_{dex}$. Según esto y recordando que el desplazamiento de una partícula cargada en un campo eléctrico es igual al producto de su movilidad en dicho campo, u , por la intensidad del mismo, H , y por el tiempo, t , resultará que

(131) KUNKEL, H. y TISELIUS, A., *J. Gen. Physiol.*, 35, 89 (1951).

para el cálculo de la movilidad de la albúmina, con corrección del efecto electrosmótico, podremos escribir:

$$d_{\text{dex}} - (-d_{\text{alb}}) = (u_{\text{dex}} - u_{\text{alb}}) Ht \quad (\text{VI-14})$$

pero, siendo $u_{\text{dex}} = 0$, nos queda:

$$-u_{\text{alb}} = \frac{d_{\text{alb}} + d_{\text{dex}}}{Ht} \quad (\text{VI-15})$$

Descomponiendo esta expresión en dos sumandos resultará que el segundo, que tendrá igual que el otro las dimensiones de una movilidad, nos medirá la debida al flujo electrosmótico:

$$u_{\text{elec}} = \frac{d_{\text{dex}}}{Ht} \quad (\text{VI-16})$$

y dividiendo (VI-16) por (VI-15) se obtiene la siguiente relación:

$$\frac{u_{\text{elec}}}{-u_{\text{alb}}} = \frac{d_{\text{dex}}}{d_{\text{alb}} + d_{\text{dex}}} \quad (\text{VI-17})$$

constante e independiente del punto de partida, del tiempo y de la fuerza de campo.

INDICADORES ELECTROSMÓTICOS

En la elección de indicadores electrosmóticos debe tenerse en cuenta que si aquéllos resultan afectados por cualquier tipo de adsorción los resultados serán erróneos. Su utilidad es máxima en los casos en que la evaporación de disolvente está impedida, puesto que, entonces, tales sustancias se desplazarán por efecto exclusivo de la corriente de electroósmosis, permitiendo averiguar el desplazamiento electroforético verdadero de las partículas.

Dos ejemplos típicos de indicadores electrosmóticos, descritos en la bibliografía, son la creatinina (132) y el ya referido y utilizado por nosotros dextrano (129). Naturalmente, también son de utilidad, para este fin, sobre todo cuando se trata de medir movilidades de sustancias de peso molecular relativamente pequeño, los diversos azúcares neutros, que, como es sabido, no muestran movilidad electroforética propia, sino que para emigrar por esta causa necesitan estar complejados, de modo que constituyan iones electroforizables. JERMYN y THOMAS (133) proponen la o-nitro anilina, que a partir del pH 7, hacia arriba, carece de carga eléc-

(132) CONSDEN, R. y STANIER, W., *Nature*, 170, 1069 (1952).

(133) JERMYN, M. y THOMAS, R., *Nature* 172, 728 (1953).



trica y tiene color amarillo propio. El volumen molecular de esta sustancia es parecido al de los aminoácidos más frecuentes, así como el peso medio de las partículas de dextrano es aproximadamente igual al peso molecular de la albúmina, analogías que se han de tener en cuenta cuando se utilicen estas sustancias en determinaciones comparativas paralelas, en las que el tiempo del experimento sea inferior al necesario para alcanzar la línea de equilibrio o de flujo nulo. Esta aclaración la creemos de interés por la confusión que en este aspecto existe en algunos casos. Nosotros hemos podido comprobar en experimentos paralelos combinados, con dextrina, almidón, inulina, maltosa y glucosa, que si bien el punto final del equilibrio electroósmosis-evaporación es independiente de las características estéricas de las distintas sustancias, no ocurre lo mismo en cuanto a las posiciones alcanzadas antes de lograrse dicho equilibrio, sino que, como observamos en nuestros experimentos de corta duración (1, 2 y 3^h) con estas sustancias, el desplazamiento es más lento para las de mayor volumen o peso molecular, o lo que es igual, alcanzarán antes la línea de equilibrio las moléculas de peso molecular más pequeño, lo cual está de acuerdo con las objeciones de McDONALD (134) contra la suposición de velocidades de flujo iguales para moléculas de volúmenes diferentes.

Personalmente, para comparación con moléculas de tamaño grande, hemos ensayado, sobre todo, el almidón y la inulina; en la Tabla 22 se

TABLA 22

Indicador electroosmótico	$u_e \cdot 10^5$ (cm ² seg ⁻¹ vol ⁻¹)				
	Albúmino	Globulinas			
		α_1	α_2	β	γ
Almidón	5,13	4,16	2,53	2,10	0,35
Inulina	5,50	4,50	2,85	2,45	0,70
Maltosa	5,75	4,74	3,15	2,70	0,95

dan los resultados medios obtenidos con ellos en la medida de las movi- lidades de fracciones seroproteínicas, y, a título comparativo, los obteni- dos utilizando maltosa como indicador. Según se observa, existe una falta de concordancia en los valores obtenidos con los distintos indicadores, lo cual es debido al diferente desplazamiento de los mismos, que en nuestro criterio, anteriormente expuesto, era claramente previsible, por tratarse de un proceso de corta duración (3 horas) realizado con indica- dores de un grado de complejidad molecular manifiestamente diverso.

(134) McDONALD, H. J., *Science*, 121, 403 (1955).

FLUJO TRANSVERSAL DE LÍQUIDO: DISTORSIÓN DE BANDAS
Y EFECTO DE BORDE

Finalmente, vamos a considerar otro efecto de evaporación, indiscutiblemente más grave que los anteriores, puesto que origina distorsiones y frentes curvados e irregulares en las bandas de las sustancias separadas, principalmente, en las de fracciones proteínicas. Se trata de un flujo de líquido transversal, comprobado por nosotros, igual que el longitudinal, por un gradiente, transversal también, de concentración de soluto en el papel; este flujo está integrado por dos corrientes líquidas que caminan en sentidos opuestos desde el centro de la tira de papel hacia sus orillas laterales.

La comprobación experimental de tal flujo fué doble, habiéndose hecho por pesada de bandas de papel, primero húmedas, como se sacan de la cabina electroforética, y después secas, cortadas en sentido longitudinal, en diferentes puntos de la misma línea transversal del papel, es decir, a la misma altura y simétricos respecto al eje longitudinal. La disposición adoptada se representa en la figura 20, en la que las bandas de experimentación, de 0,5 cm de ancho y 5 cm de largo cada una, aparecen como zonas rayadas; la separación entre las dos primeras bandas de ambas orillas es de 0,5 cm y entre la segunda y tercera, también de cada lado, es de 1 cm.

Los resultados medios de tres determinaciones (280 v, 3 h) de la cantidad de agua existente en las distintas bandas, desde las orillas al centro del papel, fueron: 0,0703, 0,0662 y 0,0601 g.

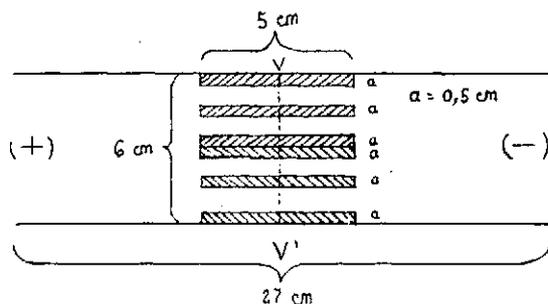


Fig. 20.—Esquema de la disposición adoptada sobre el papel, para el estudio del flujo transversal de líquido

La otra comprobación consistió en la medida de las conductividades de los eluidos de las distintas porciones del papel después de la electroforesis (la elución se verificó con 20 c. c. de agua destilada). En ambos casos

queda patente una disminución de la concentración de sales desde el centro del papel a las orillas del mismo, en las que se encuentra menor cantidad de sales (menor conductividad de los eluidos correspondientes) y mayor cantidad de agua. Este resultado es, por lo tanto, completamente distinto al que era de esperar y al que obtuvimos en el estudio de las corrientes líquidas longitudinales. No obstante, en la investigación de sus causas encontramos una explicación, de sentido análogo a la de aquel caso, en la mayor intensidad de evaporación en las orillas del papel que en el centro de éste (efecto de borde). La diferencia está en que ahora el líquido que reemplaza, en la tira de papel, las pérdidas de agua no proviene inmediata y directamente de los departamentos electródicos, y, dicho líquido, por capilaridad transversal, se acumula con velocidad mayor que la de evaporación en las orillas del papel hacia las cuales encuentra camino más libre, por haber menor cantidad de sales en ellas, según los resultados experimentales que preceden.

Un flujo de esta naturaleza podría responder, según VALMET y SVENSSON (135), a un gradiente de temperatura transversal, que no nos ha sido posible comprobar en nuestro dispositivo, aunque sí lo que puede considerarse como efectos suyos sobre la evaporación, de agua del tampón, dando origen a un gradiente transversal de concentración salina en el papel. La causa próxima de esta corriente líquida será, por lo tanto, la pérdida de líquido que tiene lugar desde las orillas del papel, donde, por la mayor superficie libre (tercera dimensión), la destilación hacia las paredes de la cámara, más frías, será más intensa que en el centro del mismo. A pesar de lo dicho, nos parece más probable que este gradiente de evaporación sea originado, casi exclusivamente, por un efecto de superficie (efecto de borde, en este caso concreto) y no de diferencia de temperaturas, ya que, de ser así, no hubiéramos encontrado, como nos ha ocurrido en las medidas de centímetro en centímetro, efectuadas sobre papel Archés 301 (6 x 27 cm) tanto en sentido longitudinal como transversal, que la intensidad de corriente es, aunque no con gran diferencia, algo mayor en el centro que hacia los bordes.

Los efectos marginales o de borde a que dan lugar estos fenómenos nos aparecieron claramente manifiestos en una serie de experimentos con aminoácidos, cuyos muestras se depositaron más próximas a los extremos de la tira de papel que a la línea de equilibrio, pero cerca de ambas orillas, constituyendo dos pistas paralelas. Al cabo de una y de dos horas de permanecer en el dispositivo electroforético se reveló con ninhidrina, apareciendo las manchas correspondientes a los aminoácidos depositados como «escapándose» por las orillas del papel y completamente deforma-

(135) VALMET, E. y SVENSSON, H., *Science Tools*, 1, 5 (1954).

das, tanto si ha pasado la corriente (200 volt., 3,8 mA, 1^b; 200 volt., 4,7 mA, 2^b; papel Whatman n.º 1, 4 x 27 cm) como si no; esta última circunstancia nos confirma en que la causa de la evaporación de borde no estriba principalmente en un gradiente de temperatura, originado como se ha querido, por el paso de corriente a través del papel, sino más bien en un incremento de superficie. Colocadas las muestras a la misma distancia que las anteriores, pero en el centro longitudinal de la tira es decir, a una distancia conveniente de las orillas, se anula prácticamente por completo la deformación de manchas encontradas en los casos anteriores.

CORRECCIÓN DE LOS EFECTOS DE BORDE

Por todo esto, es de suma importancia disminuir todo lo posible la evaporación de disolvente en el sentido transversal, lo cual hemos conseguido nosotros, con resultados completamente satisfactorios, construyendo un sencillo dispositivo que describiremos inmediatamente. Lo más general es, sin embargo, que la evaporación normal se deba al gradiente de temperatura que se establece entre el papel, parte más caliente de la cámara, puesto que es la resistencia que atraviesa la corriente y en la que tiene lugar el efecto Joule, y las paredes de la misma, necesariamente más frías. Por ello, para evitar o disminuir las corrientes de evaporación, en general, longitudinales y transversales, lo más inmediato es inhibir la evaporación sobre la tira de papel, por saturación rápida del espacio que la rodea, lo que hemos conseguido construyendo una cabina electroforética de volumen muy pequeño, el indispensable para encerrar el papel. Según hemos visto el calor es conducido en todas direcciones desde el papel a las paredes de la cámara electroforética; si la mayor superficie de estas paredes corresponde a planos paralelos al papel, la conducción de calor tendrá lugar, preferentemente, en la dirección perpendicular al plano del mismo, y sólo una pequeña parte paralelamente a este plano, lo cual equivaldrá a disminuir el efecto de borde, toda vez que las corrientes de evaporación siguen el mismo sentido que la conducción de calor. La cabina electroforética que nosotros construimos con vistas a corregir estos defectos responde a todas estas exigencias, constituyendo, además, un sencillo dispositivo en el que la cámara húmeda que encierra el papel está constituida por dos láminas paralelas de vidrio o plexiglás, extremadamente juntas, pero sin tocar el papel, y entre las que se coloca éste, apoyado ligeramente en su centro sobre la arista de un prisma, que descansa, a su vez, en la lámina inferior. En algunas ocasiones, la tira de papel permaneció tensada longitudinalmente por medio de unas varillas planas

de vidrio que cierran los bordes laterales de la cámara así formada. Cuando no ocurre así, el papel se tensa, naturalmente, por efecto de la adherencia de sus extremos a las láminas de plexiglás que separan, en las vasijas electródicas, los departamentos en donde se introducen los electrodos de aquellos otros en donde penetran los extremos de la tira de papel, los cuales quedan en comunicación mediante unos orificios pequeños.

También para disminuir los efectos marginales de evaporación, en la técnica de tira inclinada, hemos construido y utilizado, con resultados satisfactorios, una cabina o cámara electroforética (fig. 21) cuyo techo,

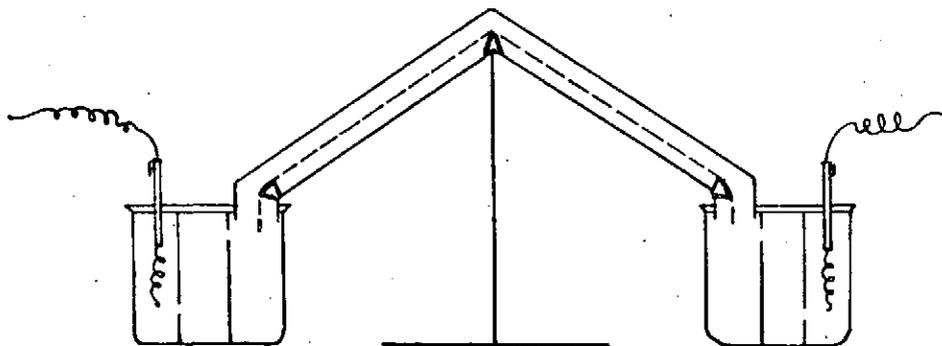


Fig. 21.—Esquema del dispositivo de cámara húmeda reducida, de planos paralelos al papel.

normalmente horizontal en los dispositivos conocidos, o que si no lo es, como hemos encontrado en algunos casos, forma parte de una cabina de grandes dimensiones, se reduce aquí, prácticamente, a una línea en donde se unen las láminas de plexiglás que constituyen las paredes de la cámara, las cuales son paralelas y de la misma inclinación que los planos de las dos vertientes de la tira de papel; por debajo de ésta, las paredes inferiores siguen la misma dirección, paralela al papel, que las superiores, quedando cerrada lateralmente, la cabina así formada, igual que en dispositivo anterior de tira horizontal, por vaillas planas de vidrio o plexiglás.

OTROS FACTORES DE EVAPORACIÓN

En el grado de evaporación influye, igualmente, la concentración de las sustancias disueltas en el tampón, que como es sabido, disminuyen la presión de vapor del disolvente y, por tanto, su evaporación. Teniendo esto en cuenta, diversos autores han propuesto, con objeto de disminuir los efectos de evaporación, adicionar al líquido tampón algunas sustancias (a algunas de las cuales hemos hecho alusión varias veces) que, natural-

mente, deben cumplir ciertas condiciones: a) en primer lugar, deberán ser sustancias químicamente inertes frente al tampón y frente a las sustancias problema, no ejerciendo efecto alguno sobre el pH del medio; b) serán no volátiles, de acuerdo con su finalidad concreta en este caso; c) deberán ser también no iónicas, para no incrementar la fuerza iónica del tampón, ni su conductividad; d) serán preferentemente de bajo peso molecular, en orden a producir la disminución de presión de vapor apetecida, con cantidades relativamente bajas de las mismas. Entre las sustancias que reúnen estas características, VALMET y SVENSSON (135) han ensayado la glicerina y el glicol, con excelentes resultados, y DURRUM (136) utiliza también la glicerina y el propilen glicol. Nosotros hemos efectuado ensayos análogos adicionando al tampón un 15 % de glicerina; utilizando este tampón modificado sometimos a electroforesis (300 voltios) una muestra de suero sobre una tira de papel (Archés 301, 6 x 27 cm), para comparar los resultados con los obtenidos en otro caso de condiciones rigurosamente iguales, pero con tampón normal; al cabo de 3 horas interrumpimos el proceso, y con un papel de filtro corriente, pesado previamente seco, recogemos el agua condensada sobre las paredes de la cámara; por nueva pesada del papel, en estas condiciones, obtuvimos una medida del grado de evaporación, que resultó ser bastante pequeño (1,3221 g de agua condensada) en el caso en que se había adicionado glicerina, y, por el contrario, muy considerable en el otro (4,8340 g de agua, recogida de las paredes); ambos experimentos se realizaron con nuestro aparato usual de cámara pequeña, pero no tanto como en los casos últimamente descritos. En el pH del medio tampoco pudo apreciarse alteración alguna (si acaso, y dudosamente, del orden de las centésimas) y, por otra parte, la separación de las fracciones proteínicas y longitud de espectro fué algo mayor (unos 5 mm) en el experimento en que se había adicionado glicerina al tampón.

(136) DURRUM, E. L., *J. Amer. Chem. Soc.*, 75, 4875 (1951).

VII

ELECTROFORESIS LIBRE

Expuestos los fundamentos teóricos de la electroforesis, pasamos a examinar a continuación las características prácticas de sus dos métodos más generales: *Electroforesis libre* y *Electroforesis soportada*. En el presente capítulo, trataremos de la primera, advirtiendo previamente que, sobre ella, tan sólo nos limitaremos a transcribir, resumidas, las noticias encontradas en la bibliografía, y, sobre la segunda, que desarrollaremos a lo largo de los capítulos VIII y IX, nos concretaremos, principalmente, al caso más interesante, desde el punto de vista práctico, de la Electroforesis en papel, aun cuando hagamos alguna alusión a otros casos particulares de electroforesis soportada.

La electroforesis libre es también llamada «clásica» o «de TISELIUS», quien, en 1937 (137), puso a punto esta técnica, superponiendo una solución tampón, de fuerza iónica y pH determinados, a soluciones de mezclas de proteínas en un tubo en U que NERNST y HARDY utilizaran ya para las primeras determinaciones de movilidades electrolíticas, y que fué perfeccionándose hasta que TISELIUS ideara el tipo óptimo para electroforesis, en el cual se puede registrar ópticamente la situación de los planos de separación de las zonas correspondientes a cada proteína. Es decir, que como elementos fundamentales de esta técnica debemos distinguir, por una parte, la célula y los electrodos, y, por otra, los dispositivos de registro óptico del proceso, elementos que se corresponden con las dos fases fundamentales de este método:

- a) Proceso electroforético, propiamente dicho.
- b) Obtención de resultados.

(137) TISELIUS, A., *Trans. Faraday Soc.*, 33, 524 (1937); *Biochem. J.*, 31, 1464 (1937).

Proceso electroforético

El tubo en U de TISELIUS, en el que se verifica el proceso electroforético, o la electroforesis propiamente dicha, debe su éxito a las características que TISELIUS le dió, especialmente las de ser su sección rectangular y sus caras paralelas, de manera que, a los efectos ópticos y de refrigeración, se comporta como una cubeta. Además, el tubo está integrado por tres tramos perfectamente acoplados entre sí, y que, con la ayuda de unos dispositivos laterales, pueden deslizarse con gran facilidad hasta interrumpir o establecer la comunicación entre los mismos. En la figura 22 se representa un esquema del tubo de TISELIUS, en el que aparecen aquellos dispositivos en posición desplazada, esto es, de comunicación interrumpida.

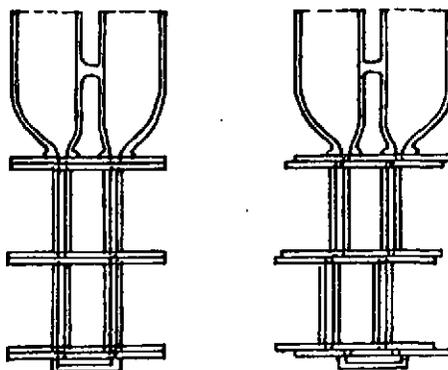


Fig. 22.—Esquema del tubo de Tiselius mostrando un caso de desplazamiento

Los electrodos, de Ag, se encuentran en unos departamentos de vidrio, unidos lateralmente al tubo en U. De esta manera, al estar separados del tubo, se evita el peligro de que lleguen allí los productos de reacción, formados en los compartimientos electródicos.

Las dos porciones ensanchadas del tubo de TISELIUS se encuentran igualmente en comunicación, por medio de un tubo transversal que mantiene la igualdad de presiones hidrostáticas, necesarias para evitar los movimientos de la interfase tampón-problema, al comunicar la parte central del tubo en U con las restantes. Los electrodos van sumergidos en una solución concentrada de ClK, para hacerlos impolarizables, y, a su vez, el conjunto del tubo en U y de los electrodos va sumergido en un baño con termorregulador, manteniéndose de esta manera a la temperatura de 4° C. Posteriormente, estos dispositivos han sido modificados, aunque no en su fundamento, sino en cuanto a detalles secundarios.

En el tubo en U se introduce una solución de la sustancia problema (por ejemplo, una mezcla de proteínas) y en las ramas ascendentes una solución tampón, de pH y fuerza iónica determinados. De esta manera, aun antes del paso de corriente, queda definida una línea de demarcación, o «frontera», entre la solución tampón y la problema.

Si se proyecta perpendicularmente a la célula de electroforesis un haz de rayos luminosos paralelos, una parte de éstos es desviada al pasar la frontera, es decir, al pasar de un medio a otro de índice de refracción distinto (el del tampón, que se toma como cero, y el del problema).

Al hacer pasar una corriente continua, las partículas, que, en el medio tampón, quedarán cargadas positiva o negativamente según el pH del medio y el pI de las partículas (caso de las proteínas y en general, de los anfólitos), se desplazan hacia el ánodo o hacia el cátodo, respectivamente, con una velocidad que es función de su carga y del campo eléctrico. En el caso de las seroproteínas, suelen usarse tampones alcalinos respecto al pI de las mismas, por lo cual éstas quedan cargadas negativamente. Si la solución contiene un solo componente proteínico, la frontera se desplaza hacia el ánodo y el dispositivo óptico señalará una sola discontinuidad de concentración. Si la solución contiene varios componentes proteínicos, de cargas diferentes en cuanto a magnitud, estas diferentes fracciones se desplazarán también hacia el ánodo, pero produciendo diferentes fronteras. Como vamos a ver inmediatamente, por medio de un dispositivo óptico, variable según el tipo de aparato utilizado, se pueden definir estas diferentes fronteras, correspondientes a índices de refracción determinados.

Obtención de resultados

Como indicamos, se lleva a cabo por medio de un sistema de registro óptico. Para hacernos cargo de él consideremos de nuevo que, al someter a la electroforesis una mezcla de distintas proteínas, por ejemplo, todas en un tampón de pH alcalino respecto a sus puntos isoeléctricos, actuarán como aniones, y, al emigrar hacia el ánodo, se distribuirán de acuerdo con su velocidad de desplazamiento electroforético, lo que producirá diferencias de concentración en las distintas regiones del tubo, apareciendo entonces límites de separación entre dichas regiones, los cuales serían indudablemente bien precisos de no existir fenómenos de difusión.

Es ahora cuando se requiere un artificio óptico adecuado que nos muestre las proteínas, ya que, al ser incoloras, no se aprecian directamente. Para ello, puede recurrirse a una medida refractométrica, puesto que las diferencias de concentraciones dan lugar a zonas de diferentes índices de refracción, y este gradiente de concentración entre una y otra zona

producirá una desviación de los rayos luminosos que atraviesan aquélla. Los diferentes haces luminosos son recibidos, generalmente, sobre una placa fotográfica.

La utilización, en el dispositivo, de una hendidura oblicua que capte lateralmente los rayos desviados permite obtener la imagen de una curva que pone de manifiesto la proporcionalidad existente entre la altura de los máximos de la misma y la concentración de cada fracción proteínica.

A TISELIUS se debe también el aplicar el método de los rielos de TOEPLER para hacer visibles estos gradientes de índice de refracción. El método se funda en el principio de TOEPLER, según el cual «cuando un haz de rayos paralelos pasa rasante la superficie límite de dos estratos líquidos de diferente densidad, se desvía hacia el más denso».

En el método de TOEPLER los gradientes de concentración se presentan como bandas horizontales oscuras en la imagen vertical del tubo, las cuales se producen debido a que los rayos desviados de su trayectoria ordinaria son eliminados, de la imagen que resulta, mediante una rendija horizontal situada de manera que sólo deja pasar los rayos no desviados. Si el borde superior de la misma se sitúa de tal forma que sólo elimine los rayos de máxima desviación, correspondientes a la parte central del gradiente de refracción, se obtiene una zona oscura estrecha. Si este borde inferior está colocado de forma que puede eliminar incluso los rayos sólo ligeramente desviados, se obtiene una zona oscura más ancha que abarca todo el gradiente; este gradiente y, por lo mismo, la correspondiente zona son proporcionales a la diferencia de concentración entre una zona y otra, es decir, entre uno y otro componente.

Para el registro óptico se ha utilizado también el diagrama directo de THOVERT-SVENSSON (138), el diagrama de sombras de PHILPOTT (139), o el sistema de los rielos según LONGSWORTH (140), quien, combinando la situación de la rendija con el movimiento de la placa fotográfica, obtuvo la imagen óptica de los gradientes de concentración en forma de una zona oscura sobre fondo claro.

El método de electroforesis libre presenta grandes ventajas en cuanto que con él se consiguen determinaciones bastante seguras de las movilidades de las distintas sustancias, especialmente de las fracciones proteínicas. Sin embargo, también tiene sus inconvenientes, unos de orden puramente técnico (complejidad del aparato y precio del mismo, volumen elevado de suero necesario para el examen proteico y duración relativamente larga del experimento, etc.) que impiden las determinaciones en serie,

(138) SVENSSON, H., *Kolloid, Z.*, **87**, 181 (1939).

(139) PHILPOTT, J. S. L., *Nature*, **141**, 283 (1938).

(140) LONGSWORTH, L. G., *Ann. New York Acad. Sci.*, **39**, 105 (1939); *J. Amer. Chem. Soc.*, **61**, 529 (1939).

aparte de otras desventajas inherentes a la propia estructura compleja de las proteínas principalmente, muchas de las cuales, asociándose con sustancias de otros grupos, como lípidos y glúcidos para el caso concreto de las seroproteínas, dan lugar a errores de valoración, no permitiendo estudiar por separado cada componente de estos proteidos, ya que el método de valoración se basa exclusivamente en las diferencias de índice de refracción.

VIII

ELECTROFORESIS EN PAPEL: METODOS DISCONTINUOS

Las técnicas de electroforesis en papel pueden denominarse discontinuas o continuas, según que la muestra a electroforizar se suministre en una sola operación, o que dicho suministro se mantenga ininterrumpidamente a lo largo de todo el proceso electroforético.

Los procesos discontinuos, en papel, se realizan con fines eminentemente analíticos, aun cuando no puede descartarse la posibilidad de su utilización con fines preparativos en microescala, como tendremos ocasión de exponer.

Por el contrario, los procesos continuos, aunque de indudable utilidad analítica, son valiosos, especialmente, desde el punto de vista preparativo.

A unos y a otros métodos nos referiremos, respectivamente, en éste y en el próximo capítulo.

A) Métodos discontinuos con fines analíticos

Los métodos propiamente analíticos de la electroforesis en papel comprenden tres fases fundamentales, a saber:

- 1.^a: Proceso electroforético, propiamente dicho.
- 2.^a: Revelado del papel o tinción del problema, con manifestación del espectro electroforético.
- 3.^a: Valoración del mismo y obtención de resultados.

Proceso electroforético

GENERALIDADES

Al establecer una diferencia de potencial entre los extremos de una tira de papel de filtro, que constituye el soporte sólido del medio de dispersión de las partículas a separar, la migración de las partículas dispersas, hacia un polo o hacia otro de la corriente eléctrica, se produce con intensidad distinta según la carga y demás características de las mismas. Los factores principales que influyen en esta migración han sido considerados ya ampliamente en los primeros capítulos de este trabajo. La posición que ocupa al final del experimento cada partícula, o grupo homogéneo de partículas, de la mezcla a separar, es, precisamente, lo que tiene un verdadero sentido analítico, puesto que dicha posesión (por su relación con la movilidad electroforética) es característica para cada fracción homogénea de partículas. En el caso de las seroproteínas, por ejemplo, utilizando un pH que quede al lado alcalino del punto isoeléctrico de las mismas, ocurre, igual que en la electroforesis libre, que todas emigrarán hacia el ánodo, distribuyéndose sobre la tira de papel de acuerdo con sus velocidades de desplazamiento. La causa primera de este desplazamiento es la diferencia de potencial establecida entre los extremos del papel, los cuales, como es sobradamente conocido, se introducen en sendos recipientes, que, en principio, pueden ser de cualquier forma, y que contienen una solución tampón en la que van sumergidos los electrodos.

La fuerza electromotriz, que se corresponde con aquella diferencia de potencial necesaria para la separación y desplazamiento de las partículas, proviene de un generador de corriente continua, en cualquiera de sus tipos, de un acumulador o, lo que es más frecuente, de cualquier modelo de rectificador; la gama de rectificadores utilizables es amplia, siendo los más usados en la actualidad, por la comodidad de su manejo y condiciones, los rectificadores de selenio, aun cuando los que realmente presentan mayores ventajas son los rectificadores de válvula o electrónicos, ya que pueden funcionar en circuito compensado, o sea, anulándose las variaciones de tensión que derivan de las alteraciones del sector eléctrico alterno. Con estos últimos se pueden obtener corrientes continuas, estabilizadas electrónicamente, con un error de $\pm 0,2 \%$, desde 0 a 300 voltios.

ALGUNAS CONSIDERACIONES SOBRE LA ESTABILIZACIÓN DE VOLTAJE

Algunos autores, como VALMET y SVENSSON (141), consideran innecesaria la estabilización de tensión a lo largo del experimento. Otros [J. M. FINE, J. GROULADE, M. SAINT-PAUL y R. J. TIZZANI (142)] son todavía más radicales y opinan que la estabilización de la tensión sólo presenta inconvenientes, pues el aumento de imbibición del papel en el tampón durante la electroforesis lleva consigo un aumento de su conductividad y, por lo tanto, una disminución de su resistencia. Si no existe estabilizador de tensión, ésta disminuye, pero si se mantiene constante la ley de OHM ($I = \frac{E}{R}$), dicen ellos, exige que la intensidad aumente todavía más.

Desde el punto de vista de la naturaleza íntima del problema no parece razonable la conclusión de estos autores, pues estimamos, que cuando se trabaja con tensiones no estabilizadas, producidas generalmente por simples rectificadores de selenio de media o doble onda, con un amplio circuito de filtro y conectados directamente a la red de alumbrado (120 ó 220 voltios), aquéllas suelen tener una gran capacidad de corriente, del orden de 100 mA o más. En estas condiciones, si se trabaja con pocas bandas de papel o, lo que es igual, con bandas estrechas (corriente de 1 a 1,5 mA por cm), las caídas de potencial que pueden producirse por variaciones de corriente son de poco valor. Por otra parte, si la tensión no está estabilizada, pudiera ocurrir que, al final del proceso, la tensión aumentase, porque así ocurriese a la tensión de la red. En este caso, el resultado sería totalmente desfavorable.

Atendiendo ahora a los efectos de la estabilización o no estabilización de la tensión sobre los resultados prácticos de la electroforesis en papel, admitimos que, en principio, pudiera no ser necesaria dicha estabilización, pero, aun esto, tan sólo en los casos en que los resultados son considerados independientemente unos de otros, pues las variaciones de potencial que pueden ocurrir a lo largo de un experimento afectan prácticamente por igual a todas las sustancias a separar; pero no creemos que carezca de interés la estabilización de corriente, en el caso de determinación de movilidades absolutas o en el de comparación de resultados de experimentos distintos, y, sobre todo, como veremos después, en la exactitud y corrección del proceso de electroforesis preparativa.

Aunque, como antes se ha indicado, los estabilizadores de fundamento electrónico resultan algo costosos, son, por hoy, los de mayor seguridad

(141) VALMET, E. y SVENSSON, H., *Science Tools*, 1, 4 (1954).

(142) FINE, J. M., GROULADE, J., SAINT-PAUL, M. y TIZZANI, R. J., *Biologie Médicale*, 45, 601 (1956).



y eficacia en el logro de su cometido. Nosotros hemos trabajado precisamente con un estabilizador de este tipo.

La fuente de corriente continua utilizada por nosotros forma una unidad, independiente de la célula electroforética propiamente dicha, con dispositivos de ajuste, voltímetro y amperímetro, y consiste en un rectificador electrónico de alterna, adecuado para la red de 125 voltios, que produce una corriente continua de 0 a 500 voltios, estabilizada también electrónicamente. El circuito del estabilizador electrónico de corriente continua utilizado en nuestro equipo de electroforesis se esquematiza en la figura 23. Dicho estabilizador, de un tipo usual, muestra gran capaci-

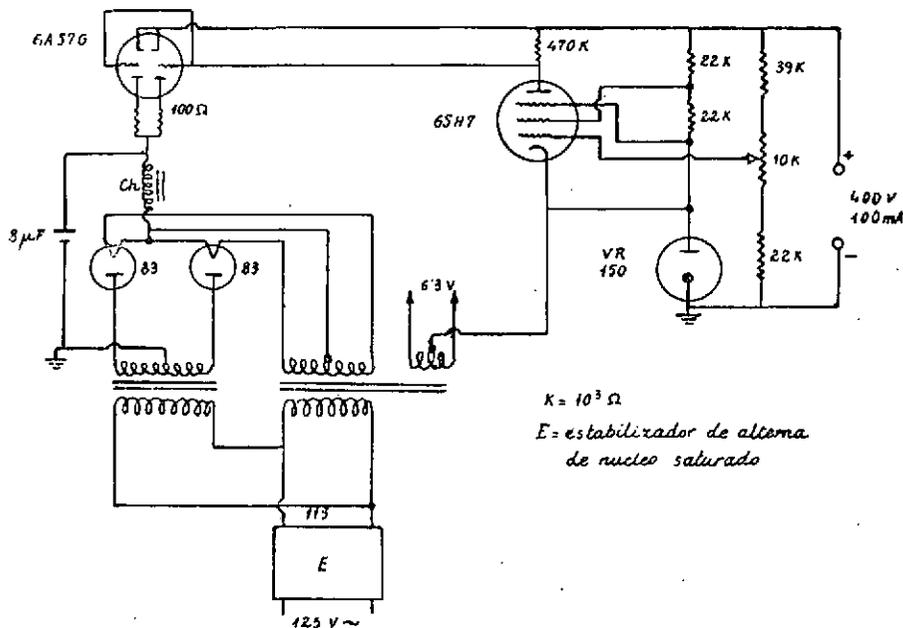


Fig. 23.—Esquema del circuito del estabilizador electrónico de corriente continua utilizado

dad para compensar las caídas de tensión por variaciones de carga. En él se incluye un circuito estabilizador de corriente alterna, E, de núcleo saturado, que permite una estabilización inicial de corriente continua de $\pm 1\%$ para variaciones de $\pm 25\%$. En estas condiciones, la estabilidad en continua de salida del circuito electrónico es de $\pm 0,5$ por mil.

DISEÑO DE APARATOS ELECTROFORÉTICOS Y ELECCIÓN DE TÉCNICA. INTERACCIÓN DE FASES

Para el diseño del aparato de electroforesis, propiamente dicho, y para la elección de la técnica a seguir resulta de interés, y hasta de necesidad,



el estudio previo, con un sentido eminentemente práctico, de los factores que intervienen en el proceso.

A lo largo de los capítulos precedentes se han considerado una serie de factores que determinan la eficacia de un proceso electroforético. Estas consideraciones se han hecho, en principio, desde un punto de vista algo teórico, pero su conocimiento sirve de base para la elaboración de los dispositivos electroforéticos, que deberán ajustarse a ciertas características tendentes a favorecer los factores útiles y a evitar los perjudiciales. Aparte de los factores que se han considerado hasta el momento, vamos a referirnos, ahora, a otros que pueden resultar de gran interés, sobre todo, a los que derivan de interacciones entre las diversas fases (*) que se establecen como consecuencia de la disposición práctica adoptada.

Las fases principales que intervienen en la electroforesis en papel son tres: el papel, la solución electroforética que moja a éste, y el medio ambiente que constituye la atmósfera envolvente de ambos en la cámara electroforética.

El estudio teórico y experimental de cada una de estas fases, por separado, ha sido desarrollado ya realmente, en capítulos anteriores. Interesa ahora destacar las interacciones entre dichas fases, algunas de las cuales también fueron consideradas anteriormente.

En primer lugar, podemos citar las interacciones entre el papel y la solución electrolítica que lo baña, y, aun dentro de éstas, cabe distinguir, de acuerdo con SVENSSON (143), entre interacción papel-disolvente e interacción papel-soluto, sobre las cuales se hizo ya una discusión detallada (**).

En segundo lugar, consideraremos las interacciones entre la solución electrolítica y las fases adyacentes, distinguiendo, dentro de esto, tres casos distintos, según que la fase adyacente sea de naturaleza gaseosa, líquida o, incluso, sólida. Si es un gas, debe ser por supuesto un dieléctrico, que, además, actuará como refrigerante de la tira de papel en la que tiene lugar el proceso electroforético, pudiendo verificar la disipación de calor tanto por conducción como por convección, y también indirectamente al hacer posible la evaporación de disolvente, con la correspondiente sustracción del calor latente de evaporación. No obstante, la disipación de calor, en este caso, es mucho menos efectiva que si se utilizan líquidos o sólidos como fases adyacentes. Es natural que la posibilidad a que se ha hecho alu-

(*) Damos a la palabra «fases», en este lugar, un sentido físico-químico real.

(**) Nos referiremos, principalmente, a los fenómenos relacionados con la humidificación y electroósmosis para el caso de la interacción papel-disolvente y a las consecuencias de las trayectorias serpenteantes de los iones del líquido en el papel y fenómenos de adsorción, en el caso de la interacción papel-soluto.

(143) SVENSSON, H., *Ciba Symp.* 1956, pág. 90.

sión, de utilizar la evaporación de disolvente del tampón como medio para eliminar el calor desarrollado en la tira de papel, no sería la más conveniente, puesto que la evaporación, sobre todo si no está controlada, lleva consigo una serie de efectos perjudiciales (corrientes líquidas, por ejemplo), ya estudiados. Para evitar esto se recurre, o bien a una cámara de pequeño volumen, según vimos anteriormente, o, como ensayaron VON HOLT, VOIGT y GARDE (144), a compensar la pérdida de disolvente por un suministro de agua caliente al papel, o también a adicionar al tampón sustancias que disminuyan la presión de vapor del disolvente. WERNER y WESTPHAL (145) dispusieron de tal manera su aparato que la atmósfera gaseosa quedaba a un solo lado del papel, estando el otro apoyado sobre una lámina plana bien refrigerada. Sobre el uso bastante general de atmósferas gaseosas conductoras de calor, distintas al aire (hidrógeno, helio, etc.), ya hemos hablado en otro lugar y volveremos a ello donde proceda.

El uso de un líquido como fase adyacente en contacto inmediato con el papel, presenta algunas ventajas en cuanto a la disipación del calor y disminución de la evaporación. Pero, a pesar de que, como veremos, este procedimiento ha sido utilizado por diversos autores, presenta serios inconvenientes en otro sentido, que, a nuestro modo de ver, lo hacen inaceptable en la práctica.

Cuando se utiliza como fase adyacente un sólido, se consiguen enfriamientos muy efectivos. Algunos autores [KOIW, WALLENIS y GRONWALL (146); KUNKEL y TISELIUS (147); SCHNEIDER (148); MICHL (149); WOODS y GILLESPIE (150)] utilizan dos láminas planas entre las que colocan el papel prensado. Otros [GOA (151); WEBER (152); WERNER y WESTPHAL (145)] tienen el papel simplemente extendido sobre la superficie de una lámina, por lo cual es probable que no se deba considerar propiamente este caso como de fase adyacente sólida, ya que parece lógico pensar que exista una fina capa o película de tampón, junto con burbujas de aire, entre la lámina sólida y el papel mojado; en este caso, habría que considerar, por tanto, posibles interacciones entre la lámina y el tampón; puede ocurrir, por ejemplo, que el potencial electrocinético de la lámina sea diferente al del papel, originándose por esto un flujo desigual,

-
- (144) VON HOLT, C., VOIGT, K. D. y GARDE, K., *Biochem. Z.*, **323**, 345 (1953).
(145) WERNER, G. y WESTPHAL, O., *Angew. Chem.*, **67**, 251 (1955).
(146) KOIW, E., WALLENIS, G. y GRONWALL, A., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **33**, 1940 (1951).
(147) KUNKEL, H. y TISELIUS, A., *J. Gen. Physiol.*, **35**, 89 (1951).
(148) SCHNEIDER, G., *Acta Chem. Scand.*, **5**, 1020 (1951).
(149) MICHL, H., *Monatsh.*, **83**, 737 (1952).
(150) WOODS, E. F. y GILLESPIE, J. M., *Australian J. Biol. Sci.*, **6**, 130 (1953) [*C. A.*, **47**, 6479 i (1953)].
(151) GOA, J., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **3**, 236 (1951).
(152) WEBER, R., *Helv. Chim. Acta*, **34**, 2031 (1951).

inmediato a la lámina y dentro del papel, que originaría, a su vez, un emborronamiento de bandas. También, si la lámina tuviese un carácter hidrofílico acentuado, resultaría difícil separar el papel de ella sin originar fenómenos de «inundación», que darían lugar, igualmente, a alteraciones de los espectros analíticos.

Existen varios dispositivos electroforéticos distintos, con características propias, que responden a técnicas diferentes, pero cuyo fundamento es el mismo en todas, variando solamente en detalles de operación, disposición de las tiras de papel, etc. Las más utilizadas son las técnicas de cámara húmeda, entre las que podemos citar las debidas a WIELAND y FIESCHER (153), la de DURRUM (154), y otras muchas, entre las cuales las diferencias están en otros detalles, existiendo además unas en las que la evaporación está inhibida [de CREMER y TISELIUS (155), por ejemplo] y otras con evaporación continua [MACHEBOEUF (156)].

DISPOSITIVO ADOPTADO

La técnica que nosotros hemos seguido, después del estudio realizado sobre los diversos factores que intervienen en el proceso, es fundamentalmente análoga a la de DURRUM (147) y MACHEBOEUF y REBEYROTTE (158), cuyas condiciones hemos encontrado ventajosas en cuanto a los resultados. Esto no quiere decir, sin embargo, que a lo largo de nuestro trabajo, no hayamos introducido algunas modificaciones, que, consideradas en principio oportunas, hemos sometido a comprobación posterior.

En nuestra técnica usual, la tira de papel, humedecida en el tampón, está dispuesta libremente, en forma de V invertida, sobre un caballete, T, de plástico, de manera que sus dos extremos se pueden sumergir en las cubetas electródicas, C, que contienen la solución tampón (fig. 24); todo esto constituye un sistema cerrado, en el que la tira de papel queda cubierta en el interior de una cabina de plástico, de manera que, una vez saturado de humedad ese recinto, se impide prácticamente la evaporación, evitándose la desecación de la tira de papel y las corrientes líquidas a que puede dar lugar dicha evaporación. En nuestro dispositivo esta cabina forma una unidad con la tapa general que cubre los depósitos de la solución tampón y en la que van fijos los electrodos, que, al cubrir la tira

(153) WIELAND, T. y FIESCHER, E., *Naturwissenschaften*, **35**, 29 (1948).

(154) DURRUM, E. L., *J. Amer. Chem. Soc.*, **72**, 2943 (1950).

(155) CREMER, H. D. y TISELIUS, A., *Biochem. Z.*, **320**, 273 (1950).

(156) MACHEBOEUF, M., *Chem. Weekblad*, **49**, 237 (1953) [*C. A.*, **47**, 7856 d (1953)].

(157) DURRUM, E. L., *J. Amer. Chem. Soc.*, **72**, 2943 (1950).

(158) MACHEBOEUF, M., REBEYROTTE, P. y BAUNERIE, M., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **33**, 1543 (1951).

de papel, una vez colocada en el caballete, quedan sumergidos en la solución tampón y el conjunto en condiciones de que se conecte el circuito eléctrico y comience el proceso. Uno de los tornillos de sujeción de la tapa debe estar a tope para que se pueda establecer este circuito. A todo este conjunto se suele dar, como es sabido, el nombre de «cuba electroforética» y la descrita, corrientemente utilizada por nosotros, viene a ser, aproximadamente, como se representa en la figura 24.

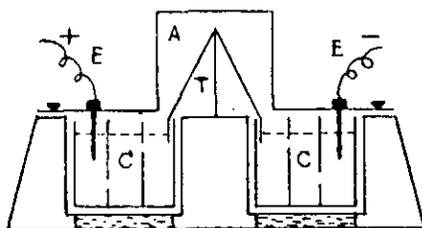


Fig. 24.—Esquema del dispositivo usual de electroforesis analítica en papel (técnica de DURRUM)

Es conveniente que la solución tampón quede a igual nivel en las dos cubetas, para evitar que la tira de papel desarrolle cualquier efecto de sifonamiento, lo que conseguimos fácilmente por medio de un puente de tubo de goma que comunica las dos vasijas electródicas, comunicación que se interrumpe antes de comenzar el proceso electroforético. Además, es de sumo interés asegurar la invariabilidad del pH, el cual, como hemos dicho, podría sufrir modificaciones por efecto de las reacciones que tienen lugar en los electrodos. Para operar con esta garantía, las cubetas de tampón las hemos construido divididas en tres departamentos que se comunican entre sí por medio de agujeritos practicados en las láminas de plástico que efectúan dicha separación, estando, los de una lámina, en la parte superior y los de la otra en la inferior; de esta forma, los departamentos en los que se introducen los electrodos van separados de aquéllos en los que penetran los extremos del papel por otros dos terceros departamentos, uno en cada cubeta. En la bibliografía se suele recomendar que al cabo de unos cuantos experimentos se cambie todo el tampón. Sin embargo, nosotros hemos podido comprobar que, con nuestra disposición, esto no es necesario (sobre todo, cuando impedimos la evaporación de disolvente, con lo cual desaparece también el peligro de variación de fuerza iónica), toda vez que el cambio de pH, de 2 a 3 décimas todo lo más, sólo es apreciable en los dos compartimientos donde se introducen los electrodos, y esto al cabo de 15 ó 20 operaciones, de 2-4 horas y 100-300 voltios. Lo que sí hacemos nosotros, y tampoco resulta completamente im-

prescindible, es mezclar el contenido de tampón de las dos vasijas, con lo cual se regenera exactamente el pH primitivo. El mantenimiento de pH viene favorecido, además, por el gran volumen de solución electrolítica utilizada.

Hay autores que recomiendan el empleo de electrodos de platino. Nosotros los hemos utilizado de carbón (mucho más económicos) obteniendo con ellos muy buenos resultados. El único inconveniente que hemos encontrado, y es por lo que en muchos casos utilizamos ánodo de platino, es que este electrodo anódico, cuando es de carbón, sufre una disgregación progresiva, con lo que las porciones carbonosas ensucian el tampón. En nuestro caso, este inconveniente queda también bastante atenuado por el uso de las vasijas electrolíticas de tres compartimentos descritas anteriormente. Al disponer de estos tres departamentos, que comunican entre sí por orificios no enfrentados (de esta manera, las corrientes de líquido siguen trayectorias más largas) se consigue bastante bien al entorpecer, y casi anular, la marcha de los productos electrolíticos, que se forman y acumulan, especialmente, alrededor de los electrodos propiamente dichos.

Con otros dispositivos, de los que se utilizan para evitar cambios de pH en la zona de solución tampón próxima al papel, la disgregación de la masa carbonosa que forma el ánodo puede llegar a adquirir verdadera importancia. Este es el caso, por ejemplo, de la utilización de membranas permeables o semipermeables envolviendo los electrodos, pues la destrucción progresiva del ánodo lleva consigo, por un lado, la liberación de partículas carbonosas cuyo tamaño varía desde magnitudes del orden de las correspondientes a partículas coloidales hasta el de las de suspensiones groscras, además de que es preciso contar con las partículas del o de los aglutinantes utilizados en la elaboración de los electrodos. En definitiva, en estos casos, y según hemos tenido nosotros ocasión de comprobar con unas membranas a base de celofán y con otras a base de plato poroso, se produce una disminución continua de diferencia de potencial, por causa del depósito obturante. En los casos en que no hay subdivisiones en las cubetas electrolíticas, queda, pues, por descontada la conveniencia de utilizar electrodos, por lo menos el ánodo, de platino.

Con nuestro aparato y técnica, las únicas precauciones particulares que hay que adoptar, realmente, son las de procurar trabajar en condiciones iguales de temperatura exterior, por un lado, y de campo eléctrico en la tira de papel, por otro. Nuestra experiencia personal nos permite afirmar que esto basta para obtener unos buenos resultados, incluso comparativos. Este método tiene la ventaja de hacer innecesario cualquier dispositivo para encauzar corrientes laterales de tampón, para refrigerar la

tira de papel, etc., que siempre llevan consigo un aumento del grado de complicación e incluso son nuevas fuentes de error.

Por otra parte, debemos señalar, que, con la técnica utilizada, hemos conseguido una clara separación de la globulina α , del suero sanguíneo, lo cual es interesante, pues según deducimos de la bibliografía consultada, son más bien raros los casos en que esto se logra. También hemos conseguido, en la mayoría de los ensayos, separar las subfracciones β_1 y β_2 de la fracción β -globulínica.

TÉCNICA OPERATORIA

La técnica operatoria en la electroforesis en papel es prácticamente la misma en todos los aparatos. En nuestro caso el método que seguimos es el siguiente: la muestra de la sustancia a analizar se deposita en sentido transversal, sobre el papel seco, con una micropipeta dividida en centésimas de centímetro cúbico y de manera que quede en forma de estría uniforme y lo más fina posible; al mismo tiempo, cuidamos que dicha muestra diste, por lo menos, unos 5 mm de los bordes de la tira de papel, con objeto de evitar distorsiones marginales. Cuando se trata de suero sanguíneo, se suele verter, según su contenido proteínico, de una a dos centésimas de cc.; según WUNDERLY (159) la cantidad óptima de proteína para obtener una buena separación analítica es de 1 a 2 mg; otros autores señalan como norma el depósito de 0,007 cc. de suero, cuando éste contiene 72 g de proteína por litro, es decir, una cantidad de proteína algo menor que la que recomienda WUNDERLY (alrededor de los 100 gr/l), existiendo aún otros autores que marcan cantidades distintas a las anteriores. Es importante que el extremo de la pipeta no hiera el papel, puesto que de ser así podría dar lugar, cuando menos, a depósitos posteriores de colorante, que falsificarían los resultados. El lugar de colocación del problema es hacia la mitad de la longitud de la tira de papel, o sea, en el dispositivo descrito, en la zona del papel que descansa sobre el borde horizontal del caballete. En realidad, el sitio donde se debería depositar la muestra de sustancia es en el punto de equilibrio hidrostático-electroosmótico, determinado, como vimos anteriormente, por medio de indicadores electroosmóticos; sin embargo, como quiera que hemos podido comprobar que para los efectos analíticos y comparativos usuales no representa ventaja alguna apreciable, puede evitarse la determinación de tal punto, colocando el problema según hemos dicho.

(159) WUNDERLY, CH., *La electroforesis en papel*. (Trad. J. GUAS), Ed. Científico-Médica, Barcelona, 1956, pág. 23.

Otras técnicas, en vez de micropipeta, utilizan para poner la muestra de suero el borde menor de un porta o cubreobjetos de microscopio mojado en el problema, el cual se deposita en el papel a modo de sello (*).

Como nota práctica podemos indicar que, una vez alcanzado el adiestramiento necesario, y siempre que no interesen valores absolutos, el método más sencillo de aplicación del problema, que a la vez permite una mayor uniformidad en su depósito sobre el papel, consiste en utilizar un pincel fino, de cerda corta y apuntada.

Algunos autores prefieren poner la muestra de suero en forma de gota (procedimiento de CREMER) pero la mayoría utilizan el método seguido por nosotros (sugerido por TURBA) que permite separaciones más claras.

Una vez colocada la muestra de suero (nos referimos a determinaciones de seroproteínas, que son las que muestran mayor dificultad en este aspecto) se deja secar brevemente, para evitar anomalías de la corriente líquida, por difusión; sin embargo, no debe desecarse demasiado, pues se fijarían las proteínas al papel, a la vez que se desnaturalizarían. Seguidamente, se pasa con rapidez la tira de papel por la solución tampón de manera que se humedezca toda ella uniformemente; el exceso de tampón se retira entonces de la misma, mediante toques con papel de filtro seco, hasta que la superficie del papel quede sin zonas brillantes. Nosotros hemos ensayado a invertir el orden, poniendo la muestra de suero sobre el papel ya humedecido, habiéndose obtenido, igualmente, buenos resultados. La idea de esta modificación surgió al observar que, en muchas tiras de papel, después de reveladas, quedaba una mancha de proteínas en la línea de partida, lugar que corresponde al fibrinógeno, el cual no tiene por qué encontrarse en el suero. Dicho fenómeno podría ser debido, o bien a un fallo en la separación del suero, quedando en él fibrinógeno, o bien a que, por desecación excesiva de la muestra depositada, no hubiesen emigrado parte de las proteínas. Primero mojamos el papel en el tampón y después de separar el exceso de éste se pone la muestra de suero. El resultado obtenido fué satisfactorio, apareciendo limpia la línea de partida después de revelado el papel. Sin embargo, lo ocurrido anteriormente fué puramente casual y no volvió a repetirse, obteniendo de ambas maneras resultados cuantitativos con tan pequeña diferencia, que cae dentro de los límites del error experimental.

(*) Varios dispositivos se han comercializado con este fin. Entre ellos podemos citar el aplicador de muestra LKB, modelo 3276-SA, que en esencia consiste en una pieza rectangular deslizable en el interior de otra a modo de caja. El borde inferior de la pieza deslizante consta de una doble hilera de diminutos dientes de sierra en la que se deposita la muestra de suero, que, por contacto, pasará íntegramente del aplicador al papel. De fundamento análogo es el aplicador de la *Beckman Instruments, Inc.* (Spinco División).

Una vez efectuadas las operaciones que se han indicado, se apoya la tira de papel, exactamente por su mitad, sobre el caballete del dispositivo electroforético, introduciendo los extremos en las cubetas de tampón. Conectada la corriente y finalizada la electroforesis, se secan y revelan las tiras con las precauciones necesarias. Para la operación de secado merece la pena el hacer algunas observaciones. Entre otras, diremos que es importante mantener una horizontalidad rigurosa y una uniformidad constante de temperatura en toda la banda de papel, para lo cual nos ha ido bien realizar el secado con una lámpara de infrarrojo convenientemente situada respecto a la tira de papel. No obstante, el secado solemos hacerlo en estufa. Los diversos autores recomiendan para el secado condiciones variadas; unos secan a 37°, otros a 80°, ó a 100 y 110° C, durante tiempos también variables. Nosotros hemos efectuado electroforesis paralelas (varias tiras iguales trabajando a la vez) del mismo suero, secándolas después en condiciones distintas, y, ciertamente, hemos encontrado diferencias, más o menos acusadas, según las distintas condiciones.

El secado de la banda tiene por objeto principal la fijación de las distintas fracciones de sustancias separadas en el proceso electroforético, con el fin de evitar desplazamientos posteriores. Para el caso de las proteínas, que es el que más ha preocupado a los distintos autores, y al que nos referiremos nosotros ahora, esta fijación consiste en una desnaturalización de las mismas, que puede ser provocada por un agente físico, como el calor, químico, como el alcohol y cloruro mercurico, o por ambos agentes sucesivamente. Sobre esto ya hemos visto la división de opiniones existentes, pero hay más, pues, por ejemplo GRASSMANN y HANNIC, no consideran indispensable la fijación por el calor, y MACHEBOEUF y colaboradores tampoco secan las tiras de papel, sumergiéndolas, todavía húmedas, en una disolución diluída de colorante. DURRUM, y con él nosotros, defiendo la importancia de la fijación de las proteínas por medio del calor, para conseguir la regularidad de reacción con el colorante. De esta manera, se asegura más la insolubilidad de las mismas en las disoluciones de los colorantes y en las de lavado, así como la imposibilidad de arrastre durante estas operaciones. DURRUM (160) atribuye a una disolución parcial de las proteínas, por insuficiencia de fijación, las discordancias entre los diferentes valores que se han dado para los coeficientes de corrección de las afinidades de las distintas fracciones proteínicas para los colorantes. Sin embargo, debe evitarse un excesivo calentamiento durante el secado, pues la formación de una costra, sobre todo en la albúmina, dificultaría la penetración de colorante.

(160) BLOCK, R. J., DURRUM, E. L. y ZWEIG, G., *Paper Chromatography and Paper Electro-phoresis*, Academic Press Inc., Publishers, New York, 1955, pág. 392.



En los diagramas que ofrecemos a continuación (fig. 25), correspondientes al mismo suero e igualdad de condiciones de electroforesis (papel Archés 301, 6 x 25 cm; tampón de veronal, pH = 8,6; 300 voltios; 10,5 mA. 2^h 50^m) puede observarse la diferencia entre el obtenido previo secado en la estufa (15^m y 105° C) y posterior tinción [(a): Albúmina 58 %; globulina α_1 = 4,18 %; globulina α_2 = 5,96 %; globulina β_1 = 11,45 %; globulina β_2 = 4,32 %; globulina γ = 16,05 %] y el que se obtuvo tiñendo directamente la tira en la disolución de azul de bromofenol [(b): Albúmina = 47,71 %; globulina α_1 = 5,34 %; globulina α_2 = 7,12 %; globulina β_1 = 10,17 %; globulina β_2 = 3,47 %; globulina γ = 26,18 %] en cuya preparación entra el cloruro mercuríco, que es, precisamente, un reactivo químico de precipitación de proteínas

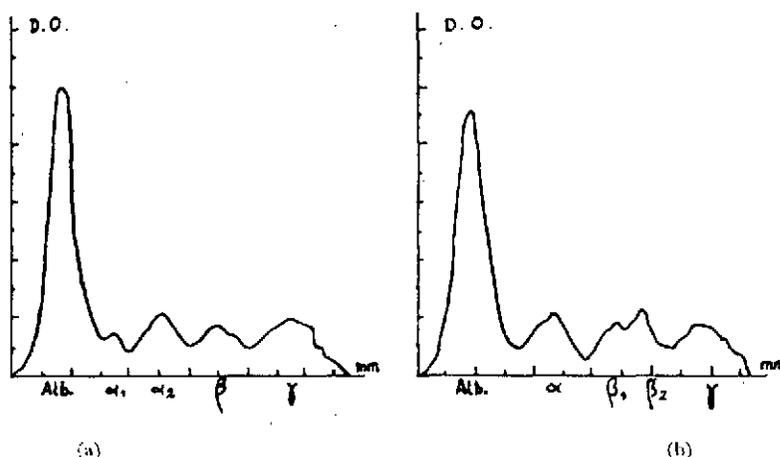


Fig. 25.—Diagramas proteicos correspondientes a un mismo suero aproximadamente normal. (a): tinción, previo calentamiento en estufa; (b): tinción directa

Para la desecación de las proteínas, nosotros mantenemos las tiras de papel horizontal en la estufa, durante unos 10 a 20 minutos, y a una temperatura alrededor de los 95-105° C. De esta manera se fijan ya las proteínas en el lugar que han alcanzado durante la electroforesis y quedan en condiciones de retener ellas, a su vez, el colorante que las revele, cuya disolución, como hemos dicho, lleva además un coagulante de proteínas, el cloruro mercuríco.

Existen otros dispositivos electroforéticos, también de cámara húmeda cerrada, en los que las tiras de papel están colocadas horizontalmente, por medio de artificios distintos, como ya se ha indicado, pero cuya descripción detallada no creemos oportuna en este trabajo. En algunas de ellas las tiras de papel se colocan entre dos láminas de cristal, procedimiento aproximadamente igual al que también hemos utilizado nosotros

en algunas experiencias; en las cuales el papel se coloca entre dos láminas de plástico, que, sin tocar las superficies del papel, constituyen una cámara húmeda muy pequeña.

Nuestros aparatos usuales, como la mayoría de los que se construyen modernamente, están hechos a base de plexiglás, material que siendo más resistente a la rotura que el cristal y menos pesado que él, tiene todas las ventajas del mismo.

ALTO VOLTAJE

Si el dispositivo electroforético no es de cámara húmeda y, sobre todo, si se trabaja con tensión elevada, es preciso eliminar el calor desarrollado por el paso de la corriente eléctrica, con objeto de evitar un calentamiento local de la tira de papel. El uso de tensiones elevadas es recomendable especialmente en las separaciones de sustancias de bajo peso molecular, sobre las cuales ejerce gran influencia la difusión, que queda disminuída al acortarse el tiempo del experimento (puede reducirse incluso a 5 minutos, en algunos caso) por aumento del potencial [KICKHOFEN (161)]. La eliminación del calor se ha llevado a cabo por distintos procedimientos, entre los que podemos citar los debidos a CREMER y TISELIUS (155), que sumergían en clorobenceno las tiras de papel colocadas entre dos láminas de cristal, y los de MICHL (162) y TURBA y ESSER (163) que propusieron utilizar, con este fin, el tolueno. Otros autores usan hidrocarburos aifáticos, como el hexano [HEILMEYER y col. (164)] y el heptano. CONSDEN y STANIER hablan, simplemente, del uso de un «líquido orgánico». Nosotros, por nuestra parte, no consideramos en general aceptable el uso de disolventes orgánicos, previendo la solubilidad de algunas sustancias, por ejemplo de los líquidos, en ellos. En efecto, en tres electroforesis de sueros humanos distintos, en las que sumergimos las tiras de papel pinzadas horizontalmente en un baño de hexano, fué imposible obtener los lipidogramas correspondientes, pues al revelar con Sudán III aparecía, a lo más, una tenue mancha continua de colorante, cosa que no ocurría, para los mismos sueros, con nuestra técnica usual. Inconvenientes análogos en último término, encontramos en el uso de láminas de vidrio engrasadas como las que se utilizan con otros fines. Otra cosa es el procedimiento se-

(161) KICKHOFEN, B., *Ciba Symposium on Paper Electrophoresis*, J. and A. Churchill Ltd., London, 1956, pág. 206.

(162) MICHL, H., *Monatsh.*, 82, 489 (1951) [C. A., 46, 2429 b (1952)].

(163) TURBA, F. y ESSER, H., *Angew. Chem.*, 65, 256 (1953).

(164) HEILMEYER, L., CLOTTEN, R., SANO, I., STURM, A., JR. y LIPP, A., *Klin. Wochschr.*, 32, 831 (1954) [C. A., 48, 13779 i (1954)].

guido por KUNKEL y TISELIUS (165) y otros, que, al objeto de impedir la evaporación, embadurnan las juntas laterales de las láminas de cristal con una silicona, es decir, con una sustancia inerte, tanto desde el punto de vista físico como químico.

Otros autores, para disipar el calor desarrollado, utilizan atmósferas de gases inertes en la cabina electroforética, lo cual, sobre todo por la complicación que añade a la técnica, sólo lo consideramos justificado en los casos en que hay que prevenir la oxidación de sustancias sensibles a la misma. En otros casos (166), además de utilizar un gas ligero como atmósfera de la cabina electroforética, queda ésta introducida en un termostato, a temperatura convenientemente regulada, con objeto de asegurar la uniformidad del proceso en este sentido. Con nuestra técnica, combinación aproximada de varias de las indicadas, conseguimos resultados tan satisfactorios o más, principalmente en cuanto a la resolución de fracciones y reproductibilidad, que con las técnicas más complicadas descritas en la bibliografía. Las características de la misma han quedado explicada ya a lo largo de la exposición de las distintas cuestiones que se han tratado.

OTROS DETALLES DE TÉCNICA

Sobre la clase de papel utilizado corrientemente en nuestro trabajo (Archés n.º 301 y Whatman n.º 1 y n.º 4) y sobre sus características y ventajas e inconvenientes, ya discutimos como se recordará, en capítulos anteriores. Respecto al tampón utilizado depende en cada caso de las sustancias a separar, y su influencia, condiciones de utilización y características fueron también tratadas en aquel lugar. Asimismo quedaron explicadas otras cuestiones relacionadas con la técnica, como son las de longitud del papel, suministro de tampón, corrientes líquidas, factores potencial y tiempo, etc.

Revelado

En la investigación cualitativa o identificación de los componentes de una sustancia compleja, o mezcla de sustancias (casos del suero sanguíneo, suero lácteo, extractos vegetales, etc.), podría pensarse en la tinción específica de cada uno de dichos componentes. Así, sería posible, por ejemplo, que el revelado selectivo de algunas proteínas de suero, por reactivos adecuados, fuera la base de una utilísima diferenciación de proteínas

(165) KUNKEL, H. y TISELIUS, A., *J. Gen. Physiol.*, 35, 89 (1951).

(166) McDONALD, H. J., URBIN, M. C. y WILLIAMSON, M. B., *J. Amer. Chem. Soc.*, 73, 1893 (1951).

patológicas. Desgraciadamente, esto parece que no se ha conseguido, lo cual no es difícil de comprender si tenemos en cuenta que, en último término, se trata de sustancias pertenecientes todas ellas a un mismo grupo químico o con características químicas comunes.

Pero, en cambio, en el campo de la electroforesis, se cuenta con un factor característico, como ya dijimos, que es la posición que ocupa cada componente de la mezcla a analizar después de haber estado sometido a la acción de un campo eléctrico, y que se revela, para su valoración posterior, por medio del proceso de tinción, obteniendo lo que por su aspecto podríamos llamar «espectro electroforético», constituido por una serie de manchas o de bandas alargadas transversalmente, según se deposite la muestra en forma de gota o de estría, respectivamente; estas manchas o bandas ocupan posiciones paralelas a lo largo de la tira de papel, que corresponden, en el mejor de los casos, a las distintas sustancias individuales de la mezcla.

En este apartado nos detendremos especialmente en lo que se refiere al revelado de proteínas (tinción, propiamente dicha) y aminoácidos, por haber constituido estos dos tipos de sustancias el material principal de nuestro trabajo. Igualmente nos referiremos a lipo- y glucoproteínas, y también, aunque de pasada, a glúcidos.

REVELADO DE PROTEÍNAS

a) Algunos colorantes utilizados en la tinción de proteínas.

Para la tinción de proteínas desnaturalizadas por el calor, se refieren, en la bibliografía, varios colorantes, debiendo seguirse, con cada uno de ellos, técnicas un tanto específicas.

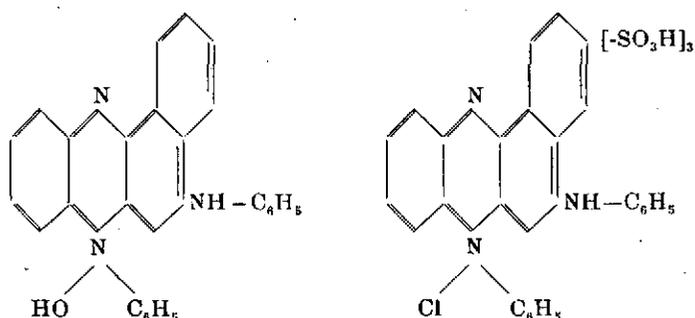
Todos son colorantes de lana, ácidos o aniónicos, en cuya molécula existen grupos sulfónicos, que son los que dan al conjunto un carácter más o menos ácido y los que reaccionan con los grupos básicos de las proteínas salificándolos. Entre los principales citaremos el *Azocarmin B* (*), que es la sal sódica ácida del derivado trisulfónico de la N-fenil-rosindulna, que, como se sabe, es el hidróxido del 10-fenil-3-anilino 1-2 benzo fenazinio [$C_{28}H_{21}ON_3$]. En la práctica, se suele utilizar el cloruro correspondiente al derivado trisulfónico citado, en el cual la posición de los grupos sulfónicos es insegura [$C_{28}H_{20}O_3N_3S_3Cl$; Pm = 673,5].

El uso del *Azocarmin B*, para la tinción de proteínas, fué propuesto en 1950 por KORVER (167).

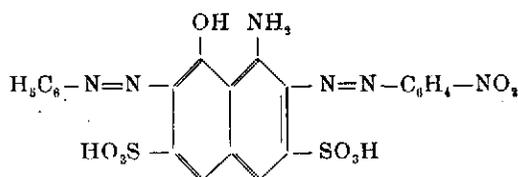
(*) De la BASF, D. R. P. 58601.

(167) KORVER, G., *Klin. Wochschr.*, 28, 603 (1950); id., 31, 1036 (1953).

A continuación se dan las fórmulas correspondientes a los dos referidos compuestos $C_{28}H_{21}OH_3$ y $C_{28}H_{20}O_1N_3S_3Cl$.

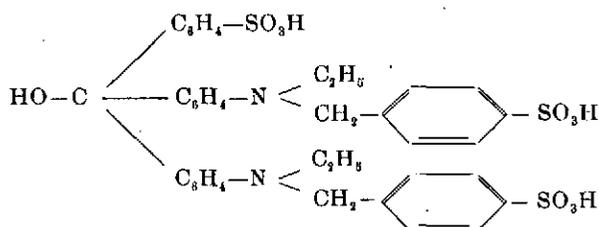


Otro colorante utilizado para este fin es el *Negro anilina 10 B* o *Negro naftol 12 B* ($C_{22}H_{16}O_3N_6S_2$; Pm = 572), conocido en la nomenclatura alemana por *Amidoswarchz* y en la inglesa por *Naphtalene Black 12 B 200*:



Fué propuesto, también en 1950, por GRASSMANN y HANNIG (168), y, por su fidelidad, es objeto de preferencia por muchos autores (169).

También se utiliza un colorante derivado del trifenil metano, el *Verde brillante SF* o *Lichtgrün SF gelblich*, de los alemanes, también llamado «verde ácido»:



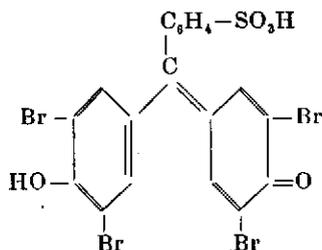
Para su obtención se parte del benzaldehído y de la N-N-etil-bencil anilina, que por condensación dan el 4'-4''-bis (etil-bencil amino) trifenil metano, una leucobase, que, por sulfonación con óleum, da el correspondiente derivado leucotrisulfónico, y éste, a su vez, por oxidación con peróxido de plomo, da el colorante, que, en la práctica, se suele utilizar en

(168) GRASSMANN, W. y HANNIG, K., *Naturwissenschaften*, 37, 496 (1950).

(169) FINE, J. M., GROULADE, J., SAINT-PAUL, M. y TIZZANI, R. J., *Biologic Medical*, 45, 604 (1956).

forma de sal sódica. Según CASPANI y MACISTRETTI (170) el citado colorante tiñe con mucha uniformidad a la albúmina y a la globulina gamma.

Finalmente, señalaremos el *Azul de bromofenol*, colorante indicador preferido, junto con el verde de bromocresol, por MARTIN (171) y que ha sido el utilizado también con preferencia en nuestro trabajo. Se trata de un colorante ácido, la tetrabromofenolsulftalcína ($C_{19}H_{10}O_5Br_4S$; Pm = 669,6) cuya fórmula estructural es la siguiente:



b) Técnicas de teñido con el azul de bromofenol.

Para teñir las proteínas con este colorante se recomiendan técnicas algo distintas entre sí, no sólo en cuanto al tiempo de inmersión en el baño tintorial, a la composición de los líquidos de lavado posterior para quitar el exceso de colorante retenido por el papel, etc., sino también por lo que se refiere a la composición del líquido de tinción, propiamente dicho, o sea de la disolución del colorante mismo. Así, CASPANI y MACISTRETTI (172) sumergen durante 16 horas las tiras de papel, ya secas, en una disolución de 50 mg del colorante, 50 g de Cl_2Hg y 50 cc de ácido acético, en 1 litro de agua, lavándolas después con ácido acético al 5 % durante unos segundos y exponiéndolas, entonces, a la acción de vapores de amoníaco. VON FRIJTAG DRABBE y G. REINHOLD (173) preparan la disolución de colorante disolviendo 0,5 g del mismo en 7,45 cc de ácido acético 0,1 N, completando el volumen a 100 cc con agua. Por último, DURRUM (174) aconseja que las tiras de papel se bañen durante cinco minutos en una solución saturada de Cl_2Hg en metanol con el 0,1 % de azul de bromofenol. Los lavados posteriores deben empezar, según él, por uno previo de agua corriente durante 20 minutos, extrayéndose seguidamente el colorante residual con metanol primero y con Cl_2Hg al 1 % en metanol después; a continuación se sumergen los electroforegramas en una disolución de Cl_2Hg al 1 % en etanol, lavándolas, finalmente, con meta-

(170) CASPANI, R. y MACISTRETTI, M., *Plasma*, 2, 1 (1954).

(171) MARTIN, N. H., *Ciba Symposium on Paper Electrophoresis*, J. and A. Churchill Ltd., London, 1956, pág. 165.

(172) CASPANI, R. y MACISTRETTI, M., *Plasma*, 2, 33 (1954).

(173) VON FRIJTAG, DRABBE, C. A. J. y REINHOLD, J. G., *Anal. Chem.*, 27, 1090 (1955).

(174) DURRUM, E. L., *J. Amer. Chem. Soc.*, 72, 2943 (1950).

nol puro hasta que el papel quede blanco; el secado posterior puede facilitarse pasando rápidamente la tira de papel por éter. Otros autores recomiendan, como hemos visto, un lavado con ácido acético, y todavía existen otras pequeñas variaciones en estos detalles de operación. Naturalmente, si se acepta la existencia de una relación exacta entre el colorante retenido por la proteína y la cantidad de ésta, los lavados del colorante en exceso deberán ser realizados bajo condiciones cuidadosamente controladas de tiempo, temperatura y pH (175), para conseguir un suficiente margen de seguridad, de forma que sea separado todo el colorante no retenido en unión salina.

Para el tiempo de tinción hay también diversidad de opiniones. Según unos autores (FLYNN y DE MAYO) el grado de coloración, o cantidad de colorante retenido, aumenta con el tiempo de tinción, mientras que otros (WALSH, por ejemplo) demuestran que, a partir de 10 minutos, no se afecta para nada la cantidad de colorante retenido por las proteínas, aunque un tercero (GRIFFITHS) fija, para esto, un tiempo de 15 minutos.

Nosotros hemos seguido una técnica de tinción con azul de bromofenol un tanto personal y sencilla en extremo, a la que hemos llegado después de ensayar otras, comprobando que los resultados obtenidos son, en nuestro criterio, tanto o más satisfactorios que utilizando las demás. Su mérito consiste casi exclusivamente en ser el resultado selectivo y concordante de una comprobación detallada de condiciones diferentes sugeridas por las técnicas conocidas.

La preparación del colorante (cuyo viraje tiene lugar en el rango de pH 3,0-4,6) la hacemos al 0,1 % en solución saturada de Cl_2Hg en etanol (unos 33 g/100 cc, a 25°) con lo que se obtiene tan buen resultado como cuando es metanol, y, sin embargo, la preparación y manipulación del baño de tinción es mucho menos desagradable. La tira de papel, una vez seca después de la electroforesis, la mantenemos en este baño de colorante durante cinco minutos, procurando que se encuentre uniformemente bañada (no conviene que esté mucho más tiempo, pues entonces se adhiere demasiado colorante al papel que cuesta luego quitar, introduciendo errores en los resultados). Al cabo de este tiempo, se saca de la disolución de colorante y se somete a un lavado de agua corriente durante 7-10 minutos (los mismos para los casos comparativos), con lo que ya logramos generalmente una blancura de papel y una uniformidad de esta blancura, casi superior a la conseguida con las otras técnicas; de todas formas, si hacemos uso de lavados posteriores, los efectuamos sucesivamente con Cl_2Hg al 1 % en metanol, con etanol conteniendo también un 1 % de Cl_2Hg y, finalmente, con metanol puro. De esta manera damos por termi-

(175) MARTIN, N. H., *Ciba Symp.*, 1956, pág. 169.

nada la segunda fase de la electroforesis, dejando entonces secar las tiras de papel, bien al aire libre o bien ayudando suavemente con calor, por ejemplo en la estufa a temperatura baja, e incluso sometiéndolo a la acción de una lámpara de infrarrojos algo alejada.

c) *pH y concentración salina del baño de colorante.*

El uso sucesivo de un mismo baño de tinción lleva consigo una serie de modificaciones en el mismo, que, en principio, pueden reducirse a dos fundamentales comprobadas experimentalmente: variación del pH del baño y cambios de concentración salina del mismo, originados ambos por la incorporación, a la disolución del colorante, de parte de las sales del tampón, que quedaron en la tira de papel después de su desecación. Conocido esto, interesa comprobar las posibles influencias del hecho sobre la capacidad de tinción del colorante (azul de bromofenol) y, sobre todo, sobre la constancia de esta capacidad en las distintas condiciones a que se llega, y, en consecuencia, sobre los resultados cuantitativos obtenidos con este colorante. Para ello, realizamos varios electroforegramas del mismo suero, tenidos sucesivamente en el mismo baño, pero completando el volumen, que disminuye naturalmente en cada tinción, con disolución de colorante no usada. Los resultados, que se dan en el Apéndice Experimental, ponen de manifiesto que las variaciones en el baño de colorante que implican un cambio de pH desde 2,33 (correspondiente a la tinción con colorante no usado previamente) a 3,12 (posterior a la quinta tinción no tienen efecto apreciable sobre la tinción de las proteínas, que muestran prácticamente la misma capacidad de fijación de colorante en todos los casos aquí comprendidos. Por el contrario, las tinciones realizadas con el colorante a pH superiores al último citado muestran una intensidad o poder de tinción menor, que continúa disminuyendo en las tinciones siguientes. En consecuencia, es conveniente, en el proceso de revelado, comprobar el pH del baño tintorial a partir de la quinta, o todo lo más, de la sexta tinción realizadas con el mismo baño.

Aun cuando en el Apéndice Experimental se den con detalle los valores numéricos de estas variaciones de pH y de sus efectos, insertamos a continuación los diagramas de las figuras 26 y 27, que reflejan gráficamente tales resultados y en las que se aprecia fácilmente la influencia del pH del baño tintorial sobre la capacidad de fijación de colorante por las diversas fracciones seroproteínicas, cuyo valor se da indirectamente al representar en ordenadas tantos por ciento de transmisión de luz (fig. 26) y densidades ópticas (fig. 27), respectivamente, de los eluidos del colorante retenido por las distintas fracciones. No obstante, como puede observarse

en la Tabla 23, que recoge los resultados de la valoración proteínica en los dos casos más extremos (por no dar aquí todos), correspondientes a los

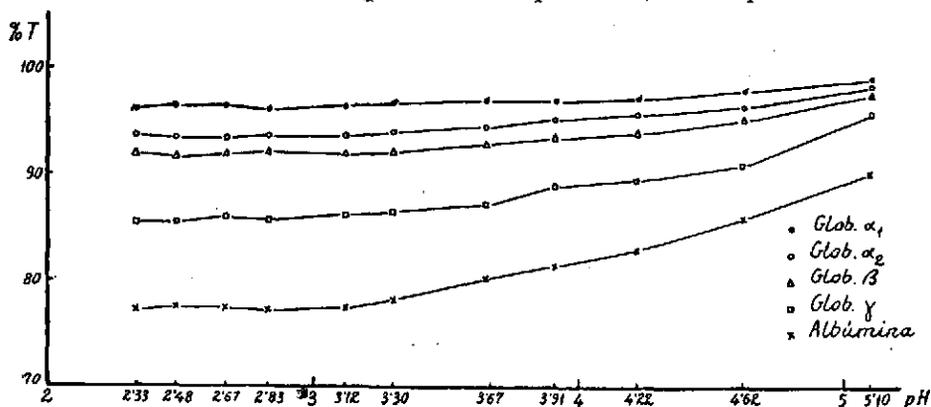


Fig. 26.—Variación de las transmisiones luminosas frente a los pH del baño tintorial

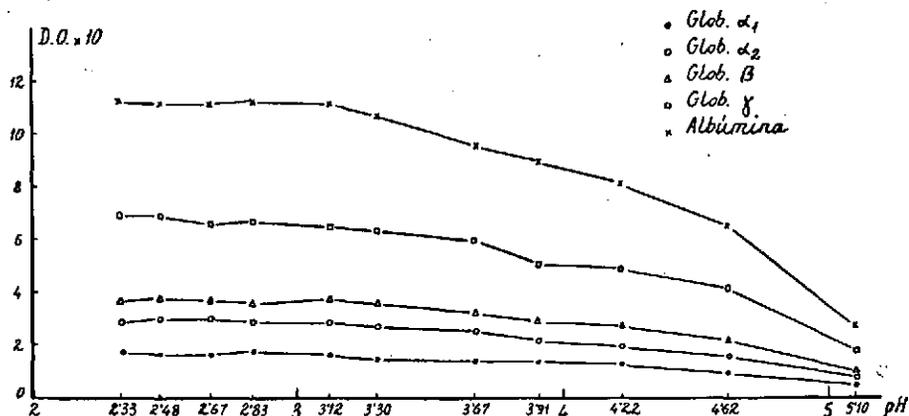


Fig. 27.—Variación de las densidades ópticas frente a los pH del baño tintorial

pH 2,33 y 5,10, el cuadro proteico resulta prácticamente inalterado; esto resta importancia a los fenómenos en consideración, mientras que no nos

TABLA 23

pH	Valores porcentuales				
	Albúmina	Globulinas			
		α_1	α_2	β	γ
2,33	42,85	6,35	10,74	14,03	26,03
5,10	42,23	5,18	9,89	14,91	27,79

sitúen en rangos de aplicabilidad de la ley de BEER. distintos para las diversas fracciones proteínicas.

Junto a esta variación de pH, se da también una clara variación, simultánea y progresiva, de la concentración salina, lo que nos fué fácil comprobar, por pesada, evaporando a sequedad 6 baños iguales, en los que se habían teñido, en igualdad de condiciones, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 tiras, respectivamente y de una manera sucesiva, determinando el volumen final después de las respectivas tinciones. La composición salina de cada uno de los baños progresivamente enlodados no es tampoco cualitativamente idéntica, ya que la aportación de veronal del tampón va incrementando, este componente en perjuicio de los elementos activos del baño de colorante. Sin embargo, pese a estas diferencias de composición salina de los baños sucesivamente utilizados, pudimos comprobar que su influencia, en sí, no era tan importante como la del pH que corresponde a cada composición, ya que, en efecto, lograda la regeneración del pH primitivo por adición de ácido acético, se consiguieron tinciones prácticamente análogas a las obtenidas con baños tintoriales nuevos.

- d) *Otros factores que influyen en el proceso de tinción. Calentamiento desigual y diferencias de rugosidad en las caras del papel. Afinidad para el colorante.*

Sobre el proceso de tinción influyen otros factores que podríamos calificar de externos. Un primer efecto puede provocarse por la forma en que se haya realizado la operación de secado. Ya el hecho de que en esta operación la temperatura sea más elevada en una cara del papel que en otra, por la simple razón de la mayor proximidad al foco calorífico es suficiente para producir una manifiesta diferencia de intensidad de colorante, que es mayor en la cara que ha estado a mayor temperatura. La explicación que nos parece más satisfactoria, después de repetidas comprobaciones realizadas en condiciones distintas, es que se trata de un efecto de evaporación más rápida en la cara más caliente, con lo cual se originan succiones, hacia ésta, desde la cara opuesta, del conjunto tampón-proteína, produciéndose, en consecuencia, una mayor concentración de proteínas en aquélla, fenómeno que se manifiesta por una mayor intensidad de coloración.

El mismo fundamento tiene otro fenómeno que observamos repetidamente en unos primeros experimentos, en los cuales la operación de secado se hacía permaneciendo extendida la tira húmeda sobre una superficie de vidrio, disponiendo este conjunto en la estufa a temperatura controlada, para lograr así la desnaturalización y fijación de las proteínas. Se observaba, en efecto, al revelar el electroforegrama con azul de bromofenol, una mayor tinción en la cara que no había estado en contacto con el

vidrio. La explicación posible es, en parte, análoga a la del caso anterior, ya que puede suponerse que la evaporación queda impedida en la cara más en contacto con el vidrio (por un efecto de cámara saturada), quedando, por el contrario, favorecida en la cara libre, con lo cual la succión de que hablamos antes tiene lugar en este segundo sentido. También cabría admitir como explicación el que la placa de vidrio actúe a manera de pantalla que intercepta un tanto la transmisión de calor, desde el foco calorífico a la cara del papel en cuestión.

Ante la posibilidad, más o menos remota, de que se tratase de un efecto casual, puesto que experimentalmente se había descartado ya el que estas diferencias de teñido de una a otra cara fuesen motivadas por la simple disposición del papel durante la electroforesis o durante la tinción, procedimos a hacer el secado de las tiras sobre una lámina de vidrio estrecha, de forma que sólo ocupaba la mitad longitudinal, en unos experimentos, y la transversal, en otros; los resultados fueron sumamente demostrativos en todos los casos, al reproducirse el fenómeno de una menor concentración de proteínas teñidas en la zona parcial de la cara inferior en contacto con el vidrio. En la otra mitad, longitudinal o transversal, que no estuvo en contacto con la lámina de vidrio y en la que, por tanto, no se daba el efecto de pantalla, el aumento de teñido aparecía en la otra cara.

Ahora bien, en este caso, y según la explicación dada, era de esperar la aparición de una mayor intensidad de coloración en la zona opuesta del papel, correspondiente a aquella otra de coloración, más débil de la cara que había estado en contacto con la lámina de vidrio; sin embargo, esto no pudo ser comprobado con seguridad, lo cual pensamos que podría ser debido a dos causas: 1.^a) que parte de las proteínas hubiesen quedado adheridas al cristal, 2.^a) que hubiese tenido lugar realmente el fenómeno de succión descrito, pero que la mayoría de las proteínas no hubiesen alcanzado la superficie superior del papel, quedando a mitad de camino, entre los intersticios que, en el sentido del grosor de aquél, dejan las fibrillas del mismo. En cualquier caso, la lectura comparativa de resultados de un electroforegrama normal y de otro del mismo suero obtenido en igualdad de condiciones, pero cuyo secado se realizara sobre una superficie de cristal cuyo contacto afectara solamente a unas fracciones proteínicas del espectro (en el caso de afectar por igual a todas, los resultados porcentuales obtenidos serían iguales) nos podría esclarecer la cuestión.

En efecto, realizada una electroforesis doble (papel Archés n.º 301, 3 x 27; 250 vol; 4^h 30^m; tampón de veronal pH 8,6) con muestras de un mismo suero, y con la diferencia que hemos indicado en cuanto a la operación de secado del papel, los resultados cuantitativos que se obtuvieron

en un caso y en otro son prácticamente concordantes (Tabla 24). Este hecho confirma la segunda hipótesis, a la vez que descarta la primera.

T A B L A 24

Electroforegrama	Valores porcentuales					
	Albúmina	Globulinas				
		α_1	α_2	β_1	β_2	γ
A	38,36	3,15	6,60	15,75	8,85	27,76
B	40,79	2,21	6,65	14,72	10,08	25,51

Nota: A, corresponde a un electroforegrama secado normalmente en estufa a 105° C durante 10 minutos, mientras que el B se secó en las mismas condiciones, pero apoyado parcialmente sobre una varilla de vidrio que cogía la zona que, según se vió después, correspondía exactamente a las fracciones globulínicas gamma y beta (β_1 y β_2). Los resultados se obtuvieron por lectura fotocolorimétrica de los eluidos de las distintas fracciones teñidas con azul de bromofenol.

Pensando en que pudiesen existir otros fenómenos distintos superpuestos a aquéllos, intentamos la desecación uniforme del papel por ambas caras, en unos casos situando las tiras en posición perpendicular al foco calorífico y en otros, haciendo cambiar a las mismas, con gran frecuencia, de posición relativa frente a dicho foco. Así pudimos demostrar que, en estos casos, seguía existiendo una ligera diferencia de teñido en una y otra cara, pero cuyo origen lo encontramos en la distinta porosidad de ambas, ocasionada por el alisado de las fibrillas en una de ellas, inherente a la forma de elaboración del papel, lo que se observa de una manera más marcada en los papeles más gruesos, como es el Archés n.º 301 entre los utilizados por nosotros. La mayor intensidad de coloración aparecía invariablemente en la cara más esponjosa, en la que el efecto de evaporación, con la consiguiente succión de proteínas, quedaba favorecido por la mayor superficie libre.

Otro efecto importante es el inherente a la propia afinidad de cada una de las fracciones proteínicas hacia el colorante, ya que ésta no es la misma para todas, como consecuencia de que las diferentes fracciones no son entre sí idénticas, ni física ni químicamente.

A simple vista es ya manifiesta la diferencia de tinción que sufren tales fracciones, aunque este fenómeno sólo tiene real significado cuando se comparan los resultados de sueros normales con los obtenidos, en la electroforesis libre para sueros también normales, usando métodos de valoración no tintoriales, ya que, en principio, esta aparente diferencia de tinción podría ser consecuencia de la mayor proporción real de unas fracciones frente a otras.

En nuestros experimentos de valoración densitométrica, tanto directa

sobre el papel transparentado, como indirecta sobre los eluidos de las distintas fracciones coloreadas, se comprueba que existe una manifiesta diferencia de resultados entre los obtenidos y los previstos, pero no existiendo un factor de proporcionalidad único, sino que, por el contrario, cada fracción requiere el suyo propio. Es decir, que la afinidad para el colorante es distinta en cada una de las fracciones proteicas. La menor capacidad de fijación de colorante (azul de bromofenol y demás colorantes ácidos) se manifiesta invariablemente en las globulinas alfa y beta, lo cual podría explicarse por la naturaleza de lipoproteínas de tales fracciones globulínicas, cuya porción grasa solamente se logra teñir con los colorantes lipófilos, también llamados grasos. Esta cuestión ha sido abordada por varios investigadores que han propuesto diversos factores de corrección (no siempre concordantes) para cada una de las fracciones seroproteínicas. Más adelante tendremos ocasión de insistir sobre esto.

e) *Retención de colorante*

Vuelto a mojar en tampón un electroforegrama de seroproteínas revelado con azul de bromofenol, y sometido a nueva electroforesis observamos, al final de ella, un nuevo desplazamiento hacia el ánodo de las manchas correspondientes a las distintas fracciones proteínicas. Esto plantea el problema de si lo que realmente emigra es el colorante sólo, o si se trata de cualquier tipo de complejo (físico o químico) colorante-proteína, formado por el colorante con todas o con parte de las moléculas que integran cada una de las diversas fracciones proteínicas, desnaturalizadas tras el primer proceso; esto, a su vez, plantea un segundo problema, ya que habrá que decidir si ha tenido lugar la rotura del complejo colorante-proteína, o lo que sería más grave, si en la primera tinción no hubiese llegado a formarse dicho complejo, sino que se tratara de una retención no estequiométrica de colorante, en cuyo caso, la valoración cuantitativa, tal como se efectúa, daría lugar a resultados erróneos. No obstante, a no ser que existiese alguna causa especial en este caso concreto, consideramos improbable esta segunda explicación, no sólo porque así nos lo hace suponer el examen directo del electroforegrama, sino además, porque son numerosísimos los investigadores que, siguiendo técnicas semejantes de revelado o tinción, han obtenido los mismos resultados (hechas las correcciones particulares que luego se indicarán) tanto con estos métodos como con otros no electroforéticos, que gozan también de sobrada garantía.

Revelado de nuevo el electroforegrama en que habíamos observado este fenómeno, pudimos comprobar que las fracciones proteínicas ocupaban prácticamente la misma posición ahora que al final de la primera

electroforesis; las proteínas desnaturalizadas no habían sufrido nuevo desplazamiento, dándonos ahora su valoración densitométrica directa resultados sensiblemente concordantes con los primitivos. Además, el espectro desplazado desapareció tras la segunda tinción y lavados posteriores, todo lo cual nos lleva a concluir que la migración electroforética de esta segunda fase ha sido, exclusivamente, del colorante retenido por las proteínas (que emigró hacia el ánodo, como tal colorante ácido o aniónico) sobre el cual habría actuado el tampón de veronal a modo de eluyente. Caso de que se hubiesen desplazado los complejos correspondientes, no se hubieran perdido estas manchas en el lavado y menos aún en la tinción; queda así descartada también la posibilidad remota de que, aunque fuese en forma compleja como había tenido lugar la migración, se hubiese alcanzado un estado lábil para dicho complejo que sería el responsable de la desaparición de color en el lavado, pero que no justificaría el porqué no volvió a teñirse en el lugar alcanzado después por las manchas. En consecuencia, no queda más posibilidad que la de admitir la migración exclusiva de colorante.

Estos últimos datos nos prueban, o bien que la tinción ha sido completa, o que, en el caso en que hubiese sido sólo parcial, se debería a la propia naturaleza de cada fracción, que tendría que ser heterogénea, aunque de movilidad electroforética uniforme, ya que al volver a teñir lo hizo en idéntica cuantía. Este hecho se pronuncia, también, a favor de los autores que proponen la introducción de factores experimentales de corrección generalizados para cada fracción seroproteínica.

REVELADO DE AMINOÁCIDOS

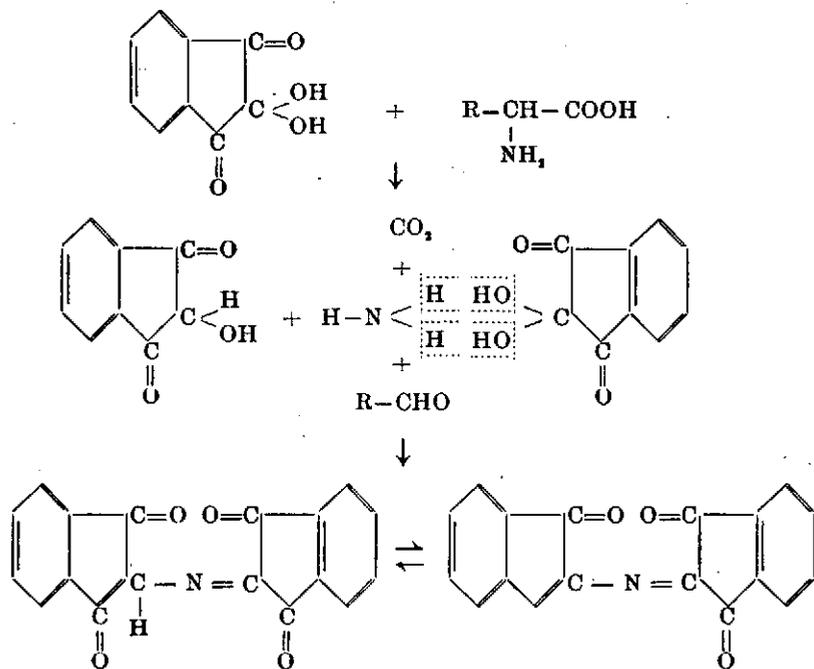
Para los aminoácidos empleamos como revelador una solución de *Ninhidrina* (hidrato de triceto hidrindeno) preparada, generalmente, al 1 por mil en isopropanol. Ahora bien, cuando los tampones utilizados son alcalinos, al objeto de neutralizar el álcali con ácido acético (176) (177), preparamos la disolución de ninhidrina según una variación del reactivo de McFARREN (1952) (178), utilizando una concentración del 2 por mil (McFARREN la utiliza del 4 por mil) en n-butanol saturado de agua y añadiendo, a esta disolución, un 2 ó un 4 por ciento de ácido acético, según que el pH del tampón sea menos o más alcalino, respectivamente; la primera concentración de acético se utiliza para un pH de 6 a 8,5 y la segunda para un rango de 8,5 a 12. Las manchas de los productos de reacción

(176) CONSDEN, R., *Nature*, 162, 359 (1948); id., 162, 1007 (1948).

(177) CONSDEN, R. y GORDON, A. H., *Nature*, 162, 180 (1948).

(178) McFARREN, E. F. y MILLS, J. A., *Anal. Chem.*, 24, 650 (1952).

de los aminoácidos con la ninhidrina, de un color violado generalmente (color debido al sistema conjugado de dobles enlaces existentes en el compuesto que se forma), aunque de tonos algo distintos según el aminoácido de que se trate (la prolina, por ejemplo, da color francamente amarillo), aparecen cuando el papel, ya rociado con el reactivo, se seca por calentamiento a unos 55-60° C durante 10-15 minutos. La marcha de la reacción puede esquematizarse de la manera siguiente:



REVELADO DE GRASAS Y LIPOIDES

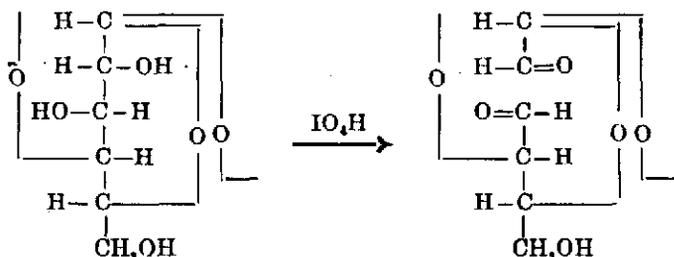
Para la tinción de grasas y lipoides se emplean distintos reveladores. Si se trata de aminolípidos puede utilizarse la ninhidrina; si de glucolípidos, se puede aprovechar la oxidación de glicoles a aldehidos con ácido periódico, haciéndolos visibles, después, con rosanilina decolorada con sulfuroso (reactivo de SCHIFF). Si son lipoproteínas, ya hemos visto, que, en principio, se tiñen también con el azul de bromofenol, tal y como lo hemos preparado para la tinción de proteínas típicas. Pero los colorantes que podríamos llamar clásicos en electroforesis, para la tinción de grasas y lipoides en general, son otros. En primer lugar, podemos citar el *Negro Sudán*, preparado según SWAHN (179) como una disolución del colorante,

(179) SWAHN, B., *Scand. J. Clin. and Lab. Invest.*, 4, 98 (1952).

en alcohol del 60 %, saturada en el punto de ebullición, enfriada y filtrada dos veces. DURRUM, PAUL y SMITH (180) utilizaron el *Sudán II* y FASOLI (181) y KUNKEL y SLATER (182) el *Sudán III*, que ha sido el empleado por nosotros como solución saturada en alcohol etílico del 50 %, en la cual se sumerge el electroforegrama durante 30^m a 40° C, lavándose en seguida con alcohol del 50 % y luego con agua destilada. Finalmente, ROSENBERG (183) utiliza el *Sudán IV* en la tinción de lípidos, mientras que WUNDERLY y PEZOLD (184) tiñen con *Azul BZL* (Ciba).

REVELADO DE GLUCOPROTEÍNAS

Las glucoproteínas se tiñen, al igual que los glucolípidos, previa oxidación con ácido periódico de los oxhidrilos correspondientes a la porción hidrocarbonada, según el procedimiento utilizado por Koiv (185).



Los grupos aldehído se tiñen con el reactivo de SCHIFF, a base de rosanilina decolorada con ácido sulfuroso.

REVELADO DE AZÚCARES

El revelado de azúcares no ofrece dificultad, ya que, con este fin, se han desarrollado en cromatografía una cantidad enorme de reactivos (p-anisidina, resorcina, antrona, orcina, etc., etc.) que son utilizables también en electroforesis. Uno de los más extendidos es el de p-anisidina (186) que es el que con mayor frecuencia hemos utilizado nosotros en

(180) DURRUM, E. L., PAUL, M. H. y SMITH, E. R. B., *Science* 116, 428 (1952).

(181) FASOLI, A., *Lancet*, 262, 106 (1952); *Acta Med. Scand.*, 145, 233 (1953).

(182) KUNKEL, H. G. y SLATER, R. J., *J. Clin. Invest.*, 31, 677 (1952); *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 80, 42 (1952).

(183) ROSENBERG, I., *J. Clin. Invest.*, 31, 657 (1952).

(184) WUNDERLY, CH. y PEZOLD, F. A., *Z. Ges. Exptl. Med.*, 120, 613 (1953) [C. A., 47, 11314 i (1953)].

(185) KOIV, E. y GRONWALL, A., *Scand. J. Clin. and Lab. Invest.*, 4, 244 (1952) [C. A., 47, 1767 a (1953)].

(186) HOUGH, L., JONES, J. K. N. y WADMAN, W. H., *J. Chem. Soc.*, 1702 (1950).

el revelado general de mono y oligosacáridos, neutros y ácidos. Para el caso particular de la inulina el reactivo usado ordinariamente ha sido el de resorcina (187).

Valoración de resultados

Esta última fase de la electroforesis analítica constituye, por sí, la propiamente cuantitativa, siendo, en realidad, la más interesante.

Nuevamente vamos a hacer uso principal del caso concreto de las proteínas, para, de esta manera, explicar los procedimientos seguidos en dicha valoración, ya que la naturaleza del problema no hace variar las bases de los métodos.

A este efecto, consideremos que la tinción de las proteínas no sólo tiene por objeto el revelado de éstas, sino que, existiendo además una relación directa, aunque no lineal como veremos después, entre la intensidad de coloración y la cantidad de proteínas desnaturalizadas que fijan el colorante, esto nos proporciona un método cómodo de dosificación de las mismas. Sobre esta base, se han utilizado dos técnicas principales:

- 1.ª) Fotometría directa del papel hecho transparente, o lo que es igual, medida densitométrica sobre el papel mismo.
- 2.ª) Elución del colorante fijado por la proteína, seguida de la medida colorimétrica correspondiente.

FOTOMETRÍA DIRECTA Y LEY DE BEER

El primer procedimiento utilizado para la valoración de las concentraciones de colorante retenido por las proteínas, fué el de fotometría directa del electroforegrama. Este ha sido el empleado también por nosotros primeramente y al cual pueden concederse, en principio, ventajas sobre el segundo, en cuanto a la economía de tiempo del experimento, que facilita las determinaciones seriadas, aunque sin suponer ventajas para el operador.

Este método, debido a GRASSMANN y colaboradores (188) (189), se basa en pasar directamente la tira de papel ante la ranura de un fotómetro y medir, milímetro a milímetro a lo largo de todo el espectroforegrama, la absorción de un flujo de luz monocromática (*) determinada por

(187) RACHINSKI, V. V. y KNYAZATOVA, E. I., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.*, 85, 1119 (1952) [*C. A.*, 47, 448 D (1953)].

(188) GRASSMANN, W. y HANNIG, K., *Naturwissenschaften*, 37, 496 (1950).

(189) GRASSMANN, W., HANNIG, K. y KNEDEL, M., *Deut. med. Wochschr.*, 76, 333 (1951).

(*) El monocromatismo de la luz se consigue con un filtro para el cual el máximo de transmisión coincide con el máximo de absorción del colorante empleado.

las diferentes manchas de proteínas, admitiendo implícitamente el cumplimiento de la ley de BEER y LAMBERT que, como se sabe, expresa una relación exponencial entre las transmisiones de luz y las concentraciones de sustancia coloreada; cuando en lugar de transmisiones se consideran densidades ópticas, la ley toma la forma:

$$\log \frac{I_0}{I} = k l c$$

en donde, I_0 es la intensidad de la luz incidente

I » » » » » transmitida

k , el coeficiente de extinción molar, característico del colorante empleado

l , espesor del medio coloreado y

c , concentración de sustancia colorante.

El primer término de esta relación se designa con el nombre de densidad óptica (opuesto de la extinción, cuyo valor es $\log \frac{I_0}{I} = -klc$) y, según se deduce de dicha expresión, para un colorante dado y un espesor constante, la concentración es directamente proporcional a la densidad óptica.

La densidad óptica se mide, indirectamente, gracias a una célula fotoeléctrica que controla el flujo luminoso transmitido por el papel. Cada mancha de sustancia teñida disminuirá la transmisión (*) de luz en un valor que no es directamente proporcional a la concentración de colorante. La transmisión, según sabemos, es la relación de dos intensidades luminosas (la que ha atravesado el medio y la incidente), y la densidad óptica es el logaritmo de la relación inversa; sólo este último valor guarda una relación sencilla con la concentración.

La relación entre densidades ópticas y concentraciones es, en principio, perfectamente lineal y puede servir para calcular dichas concentraciones. Ahora bien, no debe olvidarse que se trata de una ley límite, y que, por lo tanto, requiere una determinación experimental del rango de concentraciones más adecuado para su aplicación.

En el caso que nos ocupa, como se trata de medir concentraciones de colorante retenido en cuantía muy distinta por las diversas fracciones proteicas, como consecuencia de las cantidades absolutas de cada una y también de la distinta afinidad de éstas para el colorante, resulta que

(*) Concedemos ventajas a las lecturas por transmisión, frente a las efectuadas por reflexión, ya que, en este último caso, existirían efectos diferenciales que darían lugar a errores, tales como los debidos a la distinta intensidad de coloración en las dos caras del papel, fenómeno considerado ya anteriormente.

también por este concepto se haría necesario, en principio, el uso de factores de corrección, diferentes para las varias fracciones, y, en especial, para aquellas que se encuentran en mayor concentración, o cuya concentración aparece exaltada hasta sobrepasar un cierto valor, límite para cada longitud de onda, al que corresponde una cierta absorción por encima de la cual la respuesta densitométrica no es lineal.

De esto se deduce que la retención de colorante por las proteínas es de tal naturaleza que no permite una aplicación ortodoxa de la ley de BEER, punto en el que la mayoría de los investigadores (190) (191) (192) van estando de acuerdo, quedando como único rango en el que se cumple dicha ley, el de las grandes diluciones.

a) *Relaciones fotométricas en las que se considera la naturaleza del medio.*

De la misma manera que hemos admitido en un principio la aplicación de la ley de BEER, acabamos de hacer ahora referencia, de una manera general, a las limitaciones que su aplicación lleva consigo. Aparte de esto, refiriéndose al caso concreto de lectura sobre papel, cabe todavía citar otras desviaciones, que quizás haya que buscarlas en la propia naturaleza del mismo. Como quiera que el estudio óptico de este medio dispersante homogéneo es todavía incompleto, no es posible, por el momento, dar una interpretación teórica sencilla de estas desviaciones. Un estudio sobre la transmisión en papel de una luz perfectamente difundida fué realizado, en el año 1948, por KUBERKA (193), el cual propuso para la transmisión, T , la fórmula siguiente:

$$T = \frac{b}{a \operatorname{sh} bSx + b \operatorname{ch} bSx}$$

en la que, a y b son dos constantes dadas por las ecuaciones: $a = \frac{S + K}{S}$ y $b = (a^2 - 1)^{1/2}$, siendo S el coeficiente de difusión, K el de absorción y x el grosor del papel. El problema será naturalmente más complejo para luz no difusa, y, puesto que K y S son términos que dependen, además, de la cantidad de colorante, se comprende que, aun limitándonos sólo a las fibrillas superficiales del papel, como primera aproximación, las curvas de transmisión resultantes sean bastante más complejas que las que serían de esperar si se cumpliese la ley de BEER. En general, el aumento

(190) VAN OS, G. A. J., *Chem. Weekblad*, **49**, 242 (1953).

(191) CROOK, E. M., HARRIS, H., HASSAN, F. y WARREN, F. L., *Biochem. J.*, **56**, 434 (1954).

(192) JENCKS, W. P., JETTON, M. R. y DURRUM, E. L., *Biochem. J.*, **60**, 205 (1955).

(193) KUSBLKA, P., *J. opt. Soc. Amer.*, **38**, 448 (1948).



de densidad óptica con la concentración no se incrementa en la proporción que sucedería si se cumpliera la citada ley. Con todo, a densidades ópticas bajas, la aproximación entre la curva teórica de BEER y la obtenida en la práctica es mayor.

Algunos autores, como CROOK y WURN, entre otros, han obtenido relaciones algébricas de la corriente de fotocélula y el contenido de colorante del papel, deducidas de sus resultados experimentales. Así, CROOK y colegas (191), por un lado, encuentran que la opacidad (medida en una escala arbitraria) y la concentración de colorante en el papel se relacionan entre sí por la ecuación de una hipérbola rectangular:

$$y = \frac{ac}{b+x}$$

en donde y representa el decrecimiento de la corriente de fotocélula en unidades arbitrarias y c la concentración de colorante, también en unidades arbitrarias; a y b son dos constantes.

Por otro lado, WURN (194) observó análogamente la existencia de una proporcionalidad entre densidad óptica y logaritmo de la concentración de colorante.

En resumen, independientemente de que nuestro conocimiento de la óptica del papel sea pequeño, conviene ya admitir, como cierta, una falta de cumplimiento de la ley de BEER, lo cual se debe, casi con toda seguridad, a la forma en que se distribuye la materia colorante, ya se encuentre retenida sólo físicamente, o ya en combinación con la sustancia revelada. Este aserto simplifica las exigencias que, a primera vista, podrían tenerse para lograr un excelente densitómetro, pues, ciertamente, con cualquier sencillo aparato pueden lograrse buenos resultados; basta tener en cuenta las correcciones que surgen de estas leyes últimamente supuestas (la de CROOK, por ejemplo), para trabajar en las mejores condiciones, procurando, además, introducirse en el rango de concentraciones más favorables. Conviene, igualmente, trabajar, como ya se dijo, con luz lo más monocromática posible, evitando los haces de luz difusa y los de luz parásita; para lograr este último efecto se utilizan rendijas de dimensiones adecuadas que seleccionan el haz luminoso más conveniente para incidir sobre el papel, así como los rayos que deben llegar a la célula.

El uso de rendijas estáticas lleva consigo una sucesión de lecturas, a lo largo de una línea longitudinal de la tira de papel; pero siendo la distribución de colorante en el papel marcadamente heterogénea, como demuestran JENCKS y otros (192) por una serie de microfotografías, cabe

(194) WURN, M., *J. Clin. Invest.*, 33, 973 (1954).

pensar, que, en una lectura así efectuada, se cometerían bastantes errores. Con esta misma idea BEAVEN (195) sugirió la posibilidad de utilizar rendijas oscilantes transversalmente, que permitieran la integración práctica de la coloración total a lo largo de cada línea transversal, con lo que la lectura, después del recorrido de la tira, abarcaría todo el conjunto, con más aproximación a la realidad. No obstante, DURRUM, contestando a las sugerencias de BEAVEN, refiere que en su laboratorio se habían realizado intentos de estas lecturas transversales, concluyendo que las correcciones obtenidas no merecían la pena, para la complicación que el procedimiento significaba. DURRUM alude también a otro intento de integración, llevado a cabo mediante una rendija que giraba alrededor de superficies de una pulgada cuadrada cada una.

b) *Transparentantes en la fotometría directa*

En la realización práctica del método se ha de tener en cuenta que, para leer directamente el grado de tinción en las tiras de papel, hay que hacerlas, en primer lugar, al menos translúcidas, siendo ideal el logro de la transparencia absoluta en aquellas zonas en donde no hay sustancia teñida. Esto se lleva a cabo sumergiendo las tiras en un líquido transparente (en realidad, sólo transluciente), cuya misión fundamental es, en último término y en gran medida, la de hacer que el papel, que de por sí es eminentemente un medio homogéneo de difusión, se transforme en un medio homogéneo de transmisión, no importando, en cierto modo, el que no se logre la transparencia absoluta; no obstante, cuanto mayor sea ésta, mayor será también el margen de sensibilidad de las medidas. De no recurrirse a este procedimiento, habría una gran parte de luz que no sería ni transmitida ni absorbida, sino difundida en todas direcciones.

De esta forma se logra, indiscutiblemente, un mayor grado de homogeneidad óptica del papel, con la consiguiente aproximación al comportamiento de las disoluciones, y, en consecuencia, a la relación lineal que en éstas existe, al menos en un cierto rango, entre intensidad de color y adsorción luminosa. Como es sabido, los efectos de difusión, de que hemos hablado anteriormente, se deben a la falta de uniformidad en el tramado de las fibrillas celulósicas del papel, y, también, a la existencia de aire entre las mismas; en realidad, este defecto no se anula totalmente por el uso de fluidos de inmersión, pero, sin duda, se logran grandes mejoras.

Nosotros hemos verificado un estudio de diversos líquidos, posibles transparentantes, al objeto de escoger aquellos que más eficacia tuvieran en el sentido de homogeneizar el medio y lograr una mayor transparen-

(195) BEAVEN, G. H., *Ciba Symp.* 1956, pág. 148.

cia. Así, empleando una misma clase de papel (Whatman n.º 1), un mismo tiempo de inmersión en el líquido (10 minutos) e idéntica disposición para la lectura (*), se obtienen los valores que incluimos en la Tabla 25, expresados en tantos por ciento de transmisión. Estos valores se refieren, los de la primera columna (%T) al sistema integral formado por las láminas de vidrio-transparente-papel, y los de la segunda (% T'), al sistema láminas de vidrio-transparente, sin papel. Damos, además, los índices de refracción de estos líquidos, tanto los encontrados en la bibliografía, n , como los medidos experimentalmente, n' , indicando, con un número colocado en la parte superior derecha de cada valor, la temperatura a que los mismos se refieren, entendiéndose, en el caso de no hacerlo así, que aquélla es la de 22° C, temperatura a la cual efectuamos nosotros las determinaciones.

TABLA 25

<i>Sustancia transparentante</i>	% T	% T'	n	n'
o-Dicloro benceno	72	92	1,5518	—
Esencia de clavo	67	95	—	1,5122
Salicilato de metilo	66	90	1,5369	1,5284
Aceite de parafina + α -bromo naftaleno (1 : 1)	64	90	—	1,5149
Xilol.	62	85	1,50777	15.5°C 1,4937
p Cimeno	55	95	1,49474	1,4897
Decalina (cis)	52	95	1,4828	1,4758
Esencia de romero	49	93	—	1,4731
Esencia de limón.	49	93	—	1,4668
α -Pino	48	95	1,4658	1,4568
Polietilenglicol 400	45	94	—	1,4668
Ciclohexanol	44	91	1,4656	22.6°C 1,4633
Glicerina	35	93	1,4729	1,4692
Esencia de bergamota	34	93	—	1,4024
Heptano	33	95	1,3867	23°C 1,3792
Hexano.	30	95	1,37536	1,3683

A la vista de estos resultados se deduce, que, al ser mayor el índice de refracción del líquido transparentante o transluciente, se facilita la trans-

(*) La tira de papel, después de sumergida durante 10 minutos en el líquido a ensayar, se saca del mismo y se coloca entre dos láminas de vidrio que actúan a la manera del porta- y cubre-objetos en microscopía, adoptando precauciones en cierto modo parecidas a las de allí, tales como la de evitar la inclusión de burbujas de aire, ya que éstas contribuirían a falsear los resultados.

misión, al menos, para el intervalo 1,3754 (hexano)-1,5518 (o-dicloro benceno) abarcado en la tabla de valores que hemos dado. Ahora bien, como quiera que desde el punto de vista práctico interesa que la transmisión fondo (la del papel transparentado o translúcido, sin colorante) sea alta, resultan recomendables aquellos líquidos que hagan que el papel impregnado transmita, por lo menos, un 60 % de la luz incidente, valor que coincide con los de los líquidos que tienen un índice de refracción de 1,5 hacia arriba; de esta forma, el índice de refracción del conjunto líquido-papel no difiere, prácticamente, del propio de las placas de vidrio entre las cuales se aprisiona el papel impregnado (*).

Pero aparte de la importancia del índice de refracción, en sí, pueden intervenir, en la eficacia de los transparentantes, otros factores tales como tensión superficial, afinidad para el papel, etc. Estos últimos factores pueden determinar que el conjunto papel-líquido muestre transmisiones bastante distintas para líquidos diferentes, en tanto que, cuando éstos se encuentran con las láminas de vidrio sólo, dan transmisiones prácticamente análogas entre sí. Este es el caso, por ejemplo, de la esencia de clavo y del hexano, los cuales, en nuestros experimentos, dan con el vidrio una transmisión del 95 %, mientras que, al intervenir el papel, la transmisión pasa a ser del 67 % para la esencia de clavo y sólo del 30 % para el hexano. Es decir, que la transparencia lograda en el sistema láminas de vidrio-transparentante-papel es, en cierto modo, independiente de la transparencia propia del líquido, dependiendo más bien de las características del complejo físico líquido-papel.

Algunos de los transparentantes que hemos indicado han sido utilizados ya, con éxito, por otros autores; otros han sido usados probablemente por vez primera en nuestro caso. Entre los primeros pueden citarse el salicilato de metilo (196) y la mezcla de GRASSMANN y HANNIG (197), de aceite de parafina y α -bromonaftaleno a partes iguales, que estos autores utilizan empapando en ella las tiras de papel a vacío, técnica seguida también por CROOK (191) y que presenta la ventaja de facilitar, o mejor, forzar, simultáneamente, la eliminación de burbujas de aire de papel.

Ensayados todos estos líquidos elegimos para nuestro trabajo la mezcla, a partes iguales, de aceite de parafina y α -bromonaftaleno, anteriormente citada, aunque también utilizamos, con cierta frecuencia, el salicilato de metilo. El preferir estos transparentantes a los otros dos (o-dicloro benceno y esencia de clavo) en los que encontramos una mayor transmi-

(*) Los índices de refracción de unos cuantos vidrios bien conocidos oscilan entre los siguientes valores, para la luz del sodio: Vidrio «crown», al cinc: 1,517; «crown» de alta dispersión: 1,520; «flint» ligero: 1,575; «flint» denso: 1,650; «flint» superdenso: 1,890.

(196) LATNER, A. L., *Biochem. J.*, 52, XXIX (1952).

(197) GRASSMANN, W. y HANNIG, K. *Ciba Symp.* 1956, pág. 155.

sión, se debe, sencillamente, a que su manejo resulta bastante menos molesto. De los demás podemos decir que la glicerina, por ejemplo, resulta muy útil para los casos en que la tinción se ha hecho con colorantes solubles en los otros líquidos, como ocurre, por ejemplo, cuando se han teñido lipoproteínas con negro sudán, siguiendo la técnica de SWAHN, ya descrita.

Por otro lado, BARROLLIER (198) y DE WAEL (199) refieren un tratamiento del papel, ya revelado, con una laca o barniz adecuados, que, una vez secos, quedan en forma de película transparente. Si este barniz tiene un índice de refracción conveniente (1,51 - 1,54) las tiras de papel adquieren un alto grado de transparencia, de gran utilidad para la fotometría directa, con la evidente ventaja de comodidad, frente al uso de los transparentantes líquidos. Otra ventaja del uso de estos barnices (*) es la de conservar los electroforegramas por tiempo indefinido, propiedad de gran interés, pues aunque el uso de colorantes ácidos para proteínas produce teñidos de por sí bastante sólidos, en otros casos, como por ejemplo en el de los colores desarrollados por la ninhidrina en el revelado de aminoácidos, por la isatina, en el de los péptidos y por la *p*-anisidina en el de los azúcares, éstos se alteran y debilitan fácilmente, por lo que el uso de los transparentantes-protectores propuestos resulta muy aconsejable.

Precisamente, en nuestro laboratorio se está realizando, con este fin, un estudio sistemático de barnices de naturaleza variada, algunos de los cuales nos han sido ya útiles en el transparentado y conservación de nuestros últimos electroforegramas. Pero, puesto que este trabajo será objeto de una referencia más amplia, prescindimos de hacerla en este lugar.

c) Lectura de electroforegramas

Continuando nuestras referencias sobre la técnica seguida, diremos que el papel, una vez «transparentado», se coloca entre dos láminas de cristal, evitando, en lo posible, que queden burbujas de aire, para lo cual extendemos sobre las placas de cristal una fina película, lo más uniforme posible, del mismo líquido transparentante; estas dos láminas, llevando entre sí la tira de papel, se montan sobre una plataforma, o carro que se desliza por medio de un tornillo micrométrico a través de una hendidura de 2 mm de ancho. El diafragma de esta hendidura se ilumina con una bombilla de filamento recto. Sobre las placas de vidrio, y correspondiéndose con la hendidura anterior, está situada la célula fotoeléctrica, de ma-

(198) BARROLLIER, J., *Naturwissenschaften*, 42, 126 (1955).

(199) DE WAEL, J., *Ciba Symp.* 1956, pág. 155.

(*) BARROLLIER propone una resina de poliuretano incolora, la Herpophan-Ueberzugslack, de la casa Herbig-Haar, de Colonia.

nera que a ella llega solamente la luz que atraviesa el papel; por esto, cuando ante la hendidura se encuentra una mancha de proteínas teñidas (o de cualquier sustancia, en general) la corriente luminosa que se registra está atenuada, y tanto más atenuada se registrará, cuanto más intensa sea la coloración.

El aparato de lectura directa con corriente estabilizada, que hemos empleado nosotros, lleva, a continuación de la célula fotoeléctrica, un galvanómetro que nos da directamente la intensidad luminosa expresada en tantos por ciento de transmisión. Como es sabido, las fórmulas que ligan transmisiones y densidades ópticas son las siguientes:

$$D. O. = \log \frac{1}{T} = - \log T = - \log \frac{I}{I_0}$$

No obstante, nosotros, para facilitar la labor, teníamos confeccionadas unas tablas, por medio de las cuales se pasa cómodamente de transmisiones a densidades ópticas.

d) *Trazado de curvas y valoración de resultados*

El trazado de las curvas se hace en papel milimetrado, representando en ordenadas los valores de las densidades ópticas y en abscisas los del trecho recorrido, resultando curvas similares a las de TISELIUS, en las que cada onda, o mejor, los máximos de las mismas, corresponden al máximo de intensidad de cada fracción de sustancia coloreada.

Esta representación, que podemos llamar manual, puede evitarse con los llamados densitómetros de registro automático o semiautomático, en los cuales una plumilla, cuyas oscilaciones se corresponden con las del galvanómetro del aparato, inscribe la curva correspondiente, de trazo continuo, sobre un papel arrollado en un tambor, que se mueve sincrónicamente con el carro portaelectroforegrama; en definitiva, se trata del dispositivo usual en multitud de aparatos registradores.

Como fase final, que justifica las anteriores, sigue la valoración, propiamente dicha, o cálculo proporcional de cada una de las fracciones separadas, que se efectúa midiendo la superficie que abarca, sobre el eje de abscisas, cada una de las curvas parciales caracterizadas por los diversos máximos de la gráfica total.

La medida de estas superficies puede hacerse por varios procedimientos, que, en definitiva, son todos los métodos analíticos y gráficos de integración conocidos (descomposición en trapecios o rectángulos, ecuación de SIMPSON, planimetría, etc.). Un procedimiento elemental, pero que puede ser práctico, aunque pesado, consiste en contar los cuadraditos de

papel milimetrado abarcados por cada curva parcial, si se ha hecho la representación en papel milimetrado, o superponiendo un transparente reticulado, si se hizo sobre papel en blanco; también puede ser útil el recortar, sobre cartulina por ejemplo, unos patrones de las diferentes superficies, pesándolas individualmente y hallando los distintos valores porcentuales de las sustancias según estos pesos, toda vez que las superficies son proporcionales a los mismos. En todos los casos se admite, aunque con las limitaciones expuestas, que las concentraciones de colorante y de sustancia que lo retiene son proporcionales a estas superficies.

El método más exacto de medida de superficies es el de la ecuación de SIMPSON, pero su complejidad matemática hace que, en la práctica, no sea el usado corrientemente. Nosotros, generalmente, efectuamos dicha medida por el método de contar los cuadraditos, quizás no muy exacto, pero más asequible, o por el de pesada de las distintas superficies, tal como hemos expuesto antes.

La delimitación de la superficie que corresponde a cada fracción seroproteínica puede hacerse, o bien trazando rectas perpendiculares al eje de abscisas desde los mínimos o valles de la curva total, o bien por curvas de GAUSS (extrapolación a mano en curvas individualizadas) (fig. 28). El área total nos da el contenido, también total, en sustancia problema y las áreas parciales, el de las distintas fracciones separadas que integraban aquélla, obteniendo así, valores relativos, que, como se ha indicado, se suelen expresar en tantos por ciento.

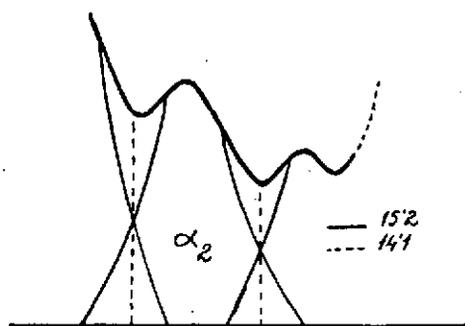


Fig. 28.—Ejemplo de delimitación de la superficie correspondiente a la globulina α_2 de un suero humano (McDONALD)

e) Un caso práctico

Como ejemplo de aplicación de lo expuesto hasta aquí, ofrecemos los resultados de los distintos pasos dados en la obtención, lectura y valoración de un proteinograma correspondiente a un suero sanguíneo humano

de diagnóstico clínico desconocido, así como el electroforegrama y el correspondiente proteinograma (*) (fig. 29).

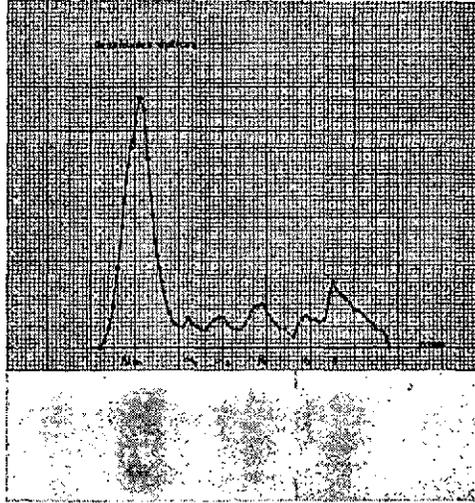


Fig. 29.—Electroforegrama y proteinograma correspondiente a un suero aproximadamente normal (ligeramente hiperbeta - globulinémico).

Las características del electroforegrama son:

Papel, Archés n.º 301, 3 × 25 cm

Dif. potencial, 300 voltios.

Intens. corriente, 1,26 mA/cm

Tiempo, 3 horas.

Long. espectro, 6,6 cm.

Los valores obtenidos para las distintas fracciones seroproteínicas son los siguientes:

Albúmina	59,11 %
Globulina α_1	3,60 %
» α_2	5,74 %
» β_1	10,14 %
» β_2	4,53 %
» γ	16,88 %

(*) Ann cuando en principio parezca nimia la observación, debemos establecer la clara diferencia que existe entre un electroforegrama de proteínas y el correspondiente proteinograma, términos que, en la bibliografía, aparecen con frecuencia usados inpropriadamente, al menos según nuestro criterio. Para nosotros, el electroforegrama es, simplemente, la tira de papel portadora de las sustancias electroforizadas, teñidas o sin teñir; en cambio, el proteinograma es la representación gráfica de la distribución cuantitativa, a lo largo del electroforegrama, de los diversos componentes proteínicos de la muestra en ensayo. En el mismo sentido puede hablarse de electroforegramas de glúcidos o de lípidos y de sus correspondientes diagramas electroforéticos (glucidogramas y lipidogramas, respectivamente).

El colorante empleado para teñir las proteínas ha sido, como casi siempre, el azul de bromobenol, habiendo utilizado, para transparentar el papel, la mezcla de aceite de parafina y α -bromonaftaleno (1:1). En el Apéndice Experimental que figura al final de este trabajo, presentamos la tabla de los valores obtenidos en dicha lectura, expresados en tantos por ciento de transmisión, como se leen directamente en el galvanómetro, y en densidades ópticas $\times 10$, a lo que hemos pasado aquellos valores para así representar gráficamente densidades ópticas frente a milímetros; la lectura se ha hecho de izquierda a derecha, empezando por la albúmina de manera, que el primer máximo que obtenemos en la gráfica corresponde a esta fracción proteínica, a la que siguen, por este orden, las globulinas α_1 , α_2 , β_1 , β_2 , (todas perfectamente diferenciadas) y la γ -globulina.

f) *Dos ejemplos de diagnosis clínica.*

Esta técnica de valoración y trazado de curvas ha sido la más utilizada en el terreno clínico, donde, como se sabe, la fórmula proteica (*), de

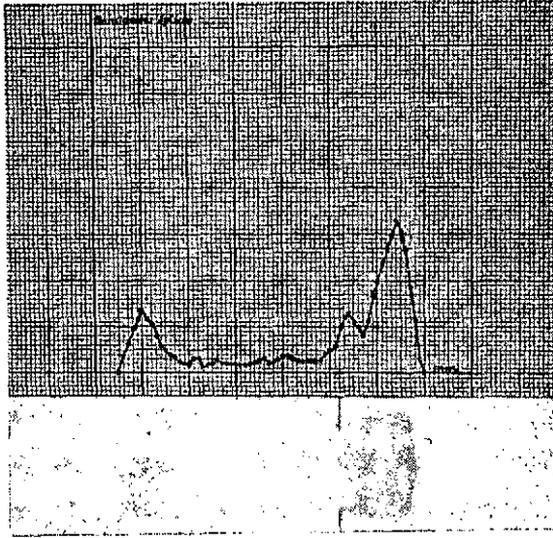


Fig. 30.—Electroforegrama y proteinograma de suero, correspondiente a una cirrosis hepática

fácil determinación electroforética, juega un papel de extraordinario interés como auxiliar clínico, tanto para el establecimiento de diagnósticos

(*) Puede referirse al suero o al plasma sanguíneo, o incluso a otros líquidos fisiológicos, así como puede ir acompañada igualmente, en algunos casos, de la fórmula lipídica o de la glucoproteica.

diferenciales, como para seguir el curso evolutivo de procesos patológicos o la eficacia de una terapéutica determinada, aparte de que existen cuadros clínicos (agammaglobulinemia y mieloma) detectables simplemente por electroforesis. Sólo a título informativo, ya que éste no es objeto de nuestro trabajo, aportamos dos casos de los varios que incidentalmente nos han surgido en nuestra labor experimental utilizando sueros anormales, cuyo diagnóstico clínico facilitado resultó coincidir completamente

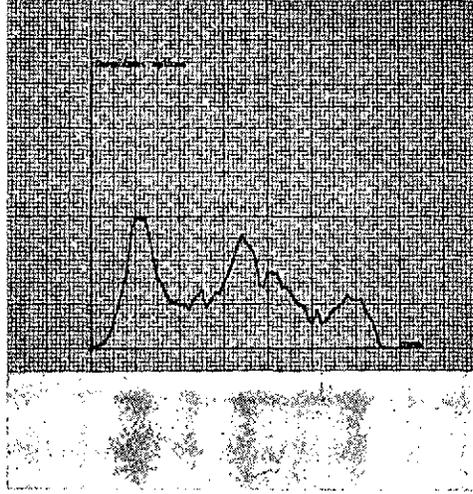


Fig. 31.—Electroforegrama y proteinograma de suero, correspondiente a una leucemia sobreaguda

con el que a priori nos habíamos atrevido a deducir de nuestros proteinogramas, basándonos en datos bibliográficos. En las figuras 30 v 31 se muestran los electroforegramas y proteinogramas referidos, que corresponden, respectivamente, a un caso de cirrosis hepática y a otro de leucemia sobreaguda. La valoración de tales proteinogramas conduce a las fórmulas proteicas que se dan a continuación junto con la correspondiente a un suero medio normal, deducida igualmente de su electroforegrama realizado en las mismas condiciones que los anteriores:

	Cirrosis hepática	Leucemia sobreaguda	Fórmula proteica normal
Albúmina	19,92 %	35,65 %	58,13 %
Globulina α_1	1,48 %	5,28 %	3,82 %
Globulina α_2	12,08 %	12,08 %	27,21 %
Globulina β_1	12,08 %	16,81 %	8,17 %
Globulina β_2	15,25 %	1,68 %	3,94 %
Globulina γ	51,27 %	13,33 %	18,20 %

Fácilmente se deduce que el primer caso se caracteriza por una marcada hipergammaglobulinemia, que se manifiesta a expensas de una hipoalbuminemia también muy acentuada, hasta el punto de que el diagrama parece estar invertido respecto al correspondiente a un suero normal o casi normal. El segundo caso constituye un ejemplo típico de hipoalbuminemia e hiperglobulinemia en general, y, especialmente, en lo que se refiere a las globulinas α_2 y β_1 .

g) *Trazado de la línea base*.

Al hacer la lectura de la manera que hemos indicado se observa que, antes de llegar a la mancha de albúmina, e igualmente, después de pasar la de la globulina gamma, se obtienen los valores máximos de tantos por ciento de transmisión, que corresponden al blanco del papel, y que, en este caso (no siempre ocurre igual, como vamos a ver) son iguales entre sí. La mayoría de las veces, sin embargo, se observa que, después de la última fracción, no se recupera el valor del tanto por ciento de transmisión, que correspondía al blanco del papel en las lecturas de las zonas anteriores a la albúmina; según hemos podido comprobar, el principal origen de esta caída de % T está en una cierta fatiga de la célula fotoeléctrica. En los casos en que estas disminuciones de transmisión se observan en zonas del papel que han sido recorridas por la sustancia problema en su marcha electroforética (o, incluso, en la originada por efectos electroosmóticos o de otro tipo) el hecho puede deberse a fenómenos de retención sobre el papel; de este tipo son los que motivan la corrección recomendada por GRASSMANN y HANNIG (200), SOMMERFELT (201) y otros investigadores, al proponer el trazado de una línea base» adecuada, que tenga en cuenta estas retenciones, antes de hacer la integración de la gráfica correspondiente. El trazado de esta línea ha de hacerse considerando los resultados experimentales de cada caso, puesto que la retención varía según las condiciones del papel y del problema.

Existen criterios diferentes para el trazado (localización o situación) de la línea base. Según SOMMERFELT (202) la mejor manera consiste en hacer 10 ó 20 lecturas antes de iniciarse el espectro electroforético y otras 10 ó 20 después de terminar el mismo, tomar los puntos medios de cada una de estas dos series y trazar una recta que pase por ambos. GRASSMANN (200) hace la corrección de una manera algo distinta, pues toma como punto cero de la línea base el primero donde se inicia la curva elec-

(200) GRASSMANN, W. y HANNIG, K., *Klin. Wochschr.*, 32, 838 (1954).

(201) SOMMERFELT, S. CH., *Ciba Symp.* 1956, pág. 151.

(202) SOMMERFELT, S. CH., *Ciba Symp.* 1956, pág. 153.

troforética, y como último, aquel en el que las lecturas, después de pasar la fracción gamma-globulínica, empiezan a mantenerse constantes; esta forma de trabazón salva simultáneamente el error de lectura por fatiga de la célula (cuando la lectura se hace en el orden que hemos indicado) y el debido a la retención de las sustancias que pasaron sucesivamente y que, aun encontrándose en cantidad mínima (la necesaria para saturar la trayectoria sobre el papel) se tiñen igualmente. Algunos autores suponen que, en el caso de las seroproteínas, esta retención fondo es atribuible sólo a la albúmina, y que su cuantía total alcanza hasta un 4 % (*) del contenido total en dicha proteína. Si la colocación de la muestra de suero (en el caso que estamos refiriendo) se hace en el centro de la tira de papel, ese 4 % de albúmina deberá sustraerse, proporcionalmente a la anchura de bandas (admitiendo una adsorción uniforme a lo largo del camino recorrido), de todas las fracciones, salvo de la γ -globulina, que, debido a la electroósmosis, emigra en sentido opuesto recorriendo, por lo tanto, una trayectoria limpia de rastros de otras fracciones; por supuesto, que tampoco habrá que sustraerse este 4 % a la albúmina, sino, al contrario, sumarlo a la misma.

Esta opinión no parece sin embargo correcta del todo, en nuestro criterio, puesto que, en primer lugar, todas las fracciones serán capaces de quedar retenidas, aunque en menor cuantía, tanto por su menor facilidad para la desnaturalización (uno de los factores que influyen en esta retención), como porque ellas, normalmente, se encuentran en menores proporciones. En un sentido rigorista debería determinarse la adsorción para cada una de las restantes fracciones, que afectarían siempre los valores de aquellas de menor movilidad electroforética.

En el trazado de la línea base se puede incurrir, asimismo, en un error al adoptar el criterio de GRASSMAN, criterio que es completamente correcto siempre que la muestra a separar se sitúe en aquellas zonas en las cuales la fuerza electroosmótica no sea suficiente para cambiar el sentido de migración de alguna o de algunas de las sustancias; pero si la muestra se depositó en la línea central, puede suponerse que la zona de espectro anódico estará entonces afectada por el fenómeno de adsorción, mientras que no ocurrirá así para la zona catódica, hacia la que emigra, normalmente, la globulina gamma.

El método de fotometría directa, sobre el papel, se ha utilizado también en cromatografía para la valoración cuantitativa de aminoácidos

(*) Este dato se refiere a papeles gruesos, del tipo Whatman 3MM, y de 3 cm de anchura, utilizando un volumen de suero de 0,01 ml, con lo que se obtuvo un desplazamiento de la albúmina de 8 cm. Para papeles más delgados el tanto por ciento correctivo se hace más bajo.

(203) (204) y azúcares (205), aplicándose, de modo análogo, en la electroforesis de tales sustancias.

FOTOMETRÍA TRAS ELUCIÓN

Con estas consideraciones sobre la forma de valoración de electroforegramas por lectura directa, y sobre los factores que deben tenerse en cuenta en esta lectura, creemos haber dado una visión suficiente de lo que, respecto a ello, se conoce hasta el momento. Pasemos ahora a hacer otras breves consideraciones sobre la forma, ventajas e inconvenientes de la valoración fotocolorimétrica de fracciones con elución previa del colorante fijado por las mismas.

a) *Métodos para la selección de bandas a eluir.*

Para esta valoración pueden seguirse dos procedimientos. En uno de ellos, el de CREMER y TISELIUS (206), las tiras de papel, una vez teñidas y secas, se cortan transversalmente en bandas de 5 mm, empezando antes de la albúmina y terminando poco después de la globulina gamma, de manera que la primera y última bandas no contengan colorante, ya que han de servir para determinar la cuantía del «valor blanco», el cual, por otra parte, no puede considerarse constante, puesto que está comprobado que varía con el baño tintorial utilizado en cada caso. Cada una de estas bandas de papel se pone en un tubo de ensayo y se cubre con 3 cc de solución de CO_2Na_2 al 5% en metanol de 50%, durante un tiempo que, para unos autores (207), es de media hora y para otros (208) de 2 ó 3 horas, agitando de vez en cuando para facilitar la elución. Nosotros, con una hora, por lo general, o con hora y media, para más seguridad, obtenemos una decoloración absoluta del papel. Si la cantidad de proteínas es elevada, debe practicarse una segunda elución con otros 3 cc de eluyente. Cuando los pedacitos de papel quedan completamente limpios o decolorados se vierte el líquido y se determina, en el espectrofotómetro de BECKMAN, o, simplemente, en un fotocolorímetro de filtros, la densidad óptica con la longitud de onda correspondiente al colorante; tomando como base la ley de BEER, que nos expresará, como se dijo, la dependencia entre la inten-

(203) ROCKLAND, L. B. y DUNN, M. S., *J. Amer. Chem. Soc.*, **71**, 4121 (1949).

(204) MCFARRREN, E. F. y MILLS, J. A., *Anal. Chem.*, **24**, 650 (1952).

(205) MCFARRREN, E. F., BRAND, K. y RUTKOWSKI, H. R., *Anal. Chem.*, **23**, 1146 (1951).

(206) CREMER, H. D. y TISELIUS, A., *Biochem. Z.*, **320**, 273 (1950).

(207) GRAS, J., *Proteínas plasmáticas*, Ed. JISS, Barcelona, 1956, pág. 94.

(208) WUNDERLY, CH., *La electroforesis en papel*. (Trad. J. GRAS). Ed. Científico-Médica, Barcelona, 1956, pág. 43.

sidad luminosa que transmite el blanco del papel y la atenuación de esta intensidad, dependiente para cada caso de la concentración de colorante del experimento, podemos levantar una curva con los resultados obtenidos, poniendo los valores de la extinción o, más frecuentemente, de las densidades ópticas en ordenadas, y la distancia de las tiras de papel, desde el punto de partida, en abscisas. Los gráficos de concentración que a su vez se deducen de aquellas curvas, son, en el caso de las proteínas, semejantes a los obtenidos en la electroforesis libre de TISELIUS.

Si sólo interesa la determinación de los porcentajes de las distintas fracciones separadas, sin obtención de la curva total de electroforesis, puede seguirse otro procedimiento debido a TURBA y ENENKEL (209) en el que, conseguida una correcta separación de las fracciones, se marcan perpendicularmente, a lápiz, los correspondientes trazos de separación, por los cuales se corta el papel, eluyendo el colorante de las distintas porciones igual que en el caso anterior. Como entonces, deben cortarse bandas paralelas de papel cuyas anchuras se correspondan con las de las distintas fracciones separadas y que, eluidas de la misma forma, sirven de blanco para la lectura fotocolorimétrica; los valores de % de transmisión obtenidos para cada una de estas bandas se restarán de los que corresponden a las porciones coloreadas.

Las fracciones que aparezcan con una intensidad de coloración mayor que la albúmina en los sueros normales, conviene dividir las en dos porciones y sumar después el valor de las dos lecturas; si una vez efectuada la elución obtenemos una intensidad de color excesiva puede hacerse una ulterior dilución, que luego habrá que tener en cuenta para el cálculo numérico. En definitiva, lo que se pretende, de esta manera empírica, es procurar que las lecturas se hagan en el rango de concentraciones en el que se cumple la ley de BEER.

b) *Consideraciones prácticas sobre los límites en que se cumple la ley de BEER.*

Aun cuando el anterior criterio es el más generalizado, quisimos comprobar si tal criterio tenía justificación suficiente para las concentraciones en que ordinariamente se opera. Para ello, muestras de magnitud creciente de seroproteínas, dentro todas de un rango amplio (sobre todo por lo que respecta al límite superior), que abarca holgadamente a todas las concentraciones de fracciones proteicas que puedan presentarse en la práctica analítica electroforética, se depositan directamente sobre papel, se fijan, tiñen y eluyen en igualdad de condiciones y en forma análoga a la

(209) TURBA, F. y ENENKEL, H. J., *Naturwissenschaften*, 37, 93 (1950).

usual en la obtención de proteinogramas. Por medida espectrofotométrica se comprueba el cumplimiento de la ley de BEER (fig. 32), al menos hasta la concentración del eluido correspondiente a la muestra de 0,015 cc de problema, por lo que juzgamos que las advertencias anteriores, sobre la elución fraccionada, son, en realidad, innecesarias por este concepto, si bien puede hacerse conveniente, dicho fraccionamiento, en aquellos casos en los que, por encontrarse alguna fracción en concentración muy pequeña sea aconsejable utilizar, para la misma, un pequeño volumen de eluyente, en cuyo caso, en las operaciones análogas correspondientes a las otras fracciones, conviene actuar en condiciones iguales; por el temor de que cantidades pequeñas de eluyentes no sean capaces de lograr una elución exhaustiva de colorante en las fracciones proteínicas concentradas, resulta aconsejable, a veces, el hacer la referida elución fraccionada.

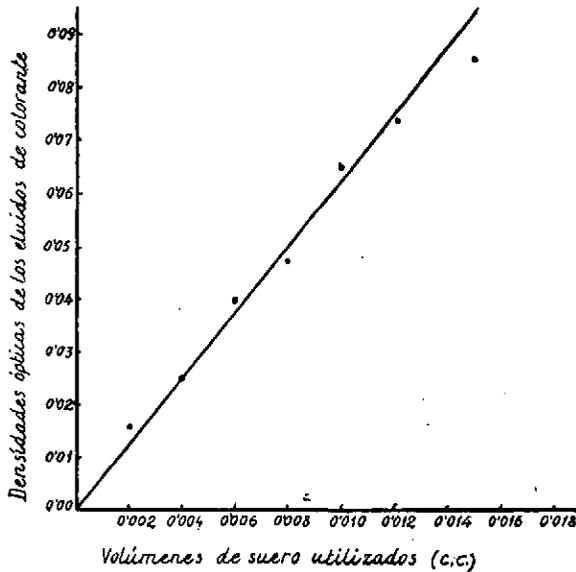


Fig. 32.—Comprobación de la ley de BEER en un caso práctico de elución de colorante

Estos mismos experimentos nos sirvieron indirectamente para establecer la cantidad mínima de suero sanguíneo a utilizar en electroforesis, si se pretende que no pasen desapercibidas las fracciones que se encuentran en menor proporción, valor que consideramos no debe bajar de los 0,0085 cc, cuando se ha de hacer la valoración de fracciones por elución, utilizando, para la lectura espectrofotométrica, cubetas de pequeñas dimensiones, que no suelen ser menores de 1,5 cc, tamaño para el cual ha sido calculado el límite anterior.

c) *Propuesta de un sistema para el trazado de diagramas de valoración.*

La fotometría tras elución, al igual que la directa, aunque de una manera más sencilla, nos permite obtener los valores porcentuales de las distintas fracciones proteínicas del suero. La única desventaja se debe a la destrucción y pérdida del espectroforegrama. Para compensar este inconveniente, nosotros hemos elaborado un sistema de representación sencillo en extremo, que nos permite obtener, a partir de los datos colorimétricos, un gráfico muy intuitivo, al igual que el obtenido en la lectura directa sobre el papel, y que nos pone de manifiesto la distribución cuantitativa de las distintas fracciones de una muestra. Para la confección de estos gráficos, basta representar, en abscisas, las anchuras de bandas (medidas, como es natural, antes de la destrucción del electroforegrama) una a continuación de la otra, y, en ordenadas (levantadas en los puntos medios respectivos de estas anchuras) el doble de aquellos valores que, multiplicados por las anchuras, nos den el valor numérico obtenido para la densidad óptica de cada fracción o para un múltiplo convencional de la misma (en nuestro caso, D.O. \times 1000). Gráficamente, bastará unir el afijo de cada ordenada con los correspondientes a las dos abscisas que limitan cada banda, para obtener una serie de triángulos isósceles, cuyas áreas respectivas miden el múltiplo elegido de la D.O. de cada fracción teñida y eluída. Para que el gráfico sea más intuitivo se procurará que las unidades en el eje de abscisas sean sensiblemente idénticas a las reales en el espectrograma. Esta representación puede ser de interés para las interpretaciones clínicas.

T A B L A 2 6

	Albúmina	Glob. α_1	Glob. α_2	Glob. β	Glob. γ
% T	75,5	92	87	87	82,5
D.O. \times 10	1,22	0,37	0,61	0,61	0,84
% Proteínas	<u>33,42</u>	<u>10,13</u>	<u>16,71</u>	<u>16,71</u>	<u>23,01</u>
Base triángulos o anchura bandas (mm)	19	10	12	13,5	20,5
Alturas (cm) $\left(\frac{\text{D.O.} \times 1000}{\text{base}}\right)$	6,42	3,7	5,1	4,5	4,1

En la Tabla 26 se dan, a modo de ejemplo, los resultados que se han obtenido por este procedimiento y que corresponden al electroforegra-

ma de un suero de diagnóstico clínico desconocido realizado en las siguientes condiciones: tampón de veronal de pH 8,6, 250 V y 4^h 5^m (evaporación parcialmente inhibida) y tinción con azul de bromofenol; la lectura fotocolorimétrica se realizó con un filtro de longitud de onda media de 605 m μ . Junto a los valores obtenidos se dan en la Tabla los datos necesarios para la construcción del diagrama convencional correspondiente (fig. 33).

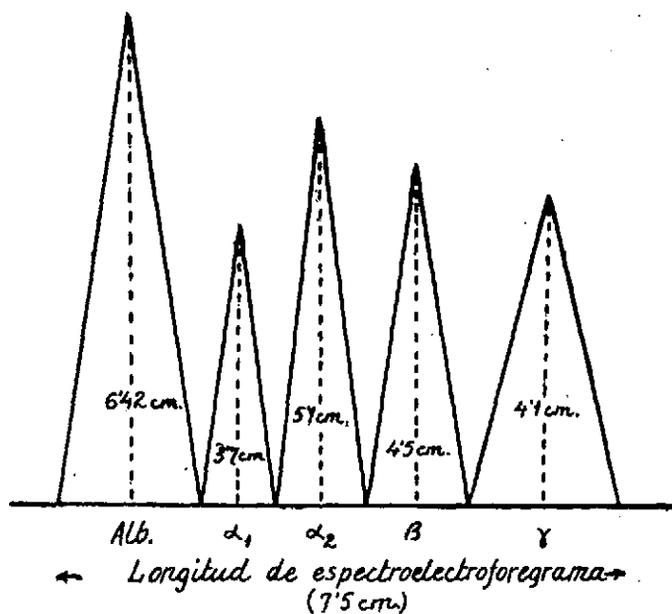


Fig. 33.—Diagrama convencional de seroproteínas, correspondiente a los valores de la Tabla 26

FACTORES DE CORRECCIÓN

En cuanto a la proporcionalidad entre la cantidad de colorante fijado y la de proteína, en el caso de la valoración de éstas, se ha de tener en cuenta que la primera es función del número de grupo básicos reactivos de las proteínas, habiendo demostrado algunos autores que los colorantes, en general, se fijan selectivamente sobre la albúmina con más intensidad que sobre las globulinas, por lo que, para la valoración exacta de éstas, será preciso multiplicar los valores de densidad óptica correspondientes a las mismas por un factor de corrección, al que unos autores dan el valor de 1,4, otros el de 1,6 y aun hay otros que señalan un factor distinto para cada fracción seroproteínica; así, se han dado los siguientes valores para los factores de corrección: albúmina, 1; globulina α_1 , 2,36; globulina α_2 , 2,09; globulina β , 2,20; globulina γ , 1,3.

CREMER, TISELIUS, KUNKEL y SCHNEIDER, por comparación de los resultados obtenidos en la electroforesis sobre papel y tinción con azul de bromofenol, con los que se obtienen por electroforesis libre, proponen un factor de corrección para las globulinas que varía desde 1,3 a 1,6. En 1951, KUNKEL y TISELIUS (210) estudian este problema, poniendo en el papel cantidades distintas de albúmina y globulina, observando que, en efecto, la primera presenta una capacidad algo mayor que la globulina para la fijación del azul de bromofenol por unidad de proteína, calculada por determinación de nitrógeno. Asimismo, deducen que el factor debe ser inferior a 1,6 aunque este valor ha sido aceptado por muchos autores. Otros investigadores, como GRIFFITHS' (211) y LAURELL y otros (212) deducen, sin embargo, de sus experimentos, que no hace falta ningún factor de corrección para este colorante.

Experimentalmente, aunque a base de las cifras teóricas relativas a los grupos básicos de las seroproteínas, se ha estudiado la cantidad de colorante que fija la albúmina en relación con las globulinas, encontrando que, aquélla, retiene 1,46 veces más colorante que el mismo peso de globulina gamma. OOSTERHUIS (213) refiere que, por lectura tras elución, la desviación media, respecto a ese valor 1,46, es de un 2,7 %, mientras que por el método de lectura directa, la encuentra del 4,1 %.

Si se utiliza el colorante negro de anilina, parece ser que sólo las globulinas β requieren un coeficiente de 1,25.

El azocarmín no necesita, según TURBA, factor de corrección, opinión que no sustentan otros autores, aunque tampoco están de acuerdo sobre cuál debe ser el valor del factor de corrección para este colorante.

No obstante, pensamos que, si se estableciese como criterio fijo y único el de comparación de los valores de un suero anormal, frente a los de uno normal, obtenidos ambos en igualdad de condiciones (por ejemplo realizando una electroforesis simultánea de los dos, colocados sobre pistas paralelas de una misma tira de papel) podría resultar innecesario el uso de los factores de corrección, siempre que no se tratase de sueros cuyos componentes íntimos hubieran sufrido alteración en sí, como resultado de determinados procesos patológicos.

EXPRESIÓN DE RESULTADOS CUANTITATIVOS

Como vemos, por cualquiera de estos métodos, obtenemos valores porcentuales o relativos de las distintas fracciones proteínicas de un suero.

(210) KUNKEL, H. G. y TISELIUS, A., *J. Gen. Physiol.*, 35, 89 (1951).

(211) GRIFFITHS, L. L., *J. Lab. Clin. Med.*, 41, 18 (1953).

(212) LAURELL, C. B., LAURELL, S. y SKOOG, N., *Clin. Chem.*, 2, 99 (1956).

(213) OOSTERHUIS, H. K., *J. Lab. Clin. Med.*, 44, 280 (1954).

Ahora bien, si por cualquier procedimiento conocemos la proteinemia total del suero, podremos pasar fácilmente a valores absolutos. Personalmente, en los casos en que hemos determinado la proteinemia total, lo hemos realizado partiendo de la dosificación del N mediante Kjeldahl, para lo que hemos utilizado una técnica algo modificada, en cuanto a ciertos detalles experimentales; dicha técnica queda descrita con un ejemplo real, en el Apéndice Experimental que figura al final de este trabajo.

Para fines clínicos, en especial, será desde luego más conveniente expresar los resultados en valores absolutos que en tantos por ciento, pues pudiera darse el caso de que aumentasen por igual los valores de todas las proteínas, y así, aun existiendo en este caso, por ejemplo, una hiperproteinemia real, podría pasar inadvertida en la expresión porcentual de la fórmula proteica. Según GRASS (214) los valores absolutos deben darse en gramos por mil, y no por cien, ya que ésa es la manera en que se expresan todas las magnitudes físicoquímicas, como molaridad, normalidad, etc.

B) Métodos discontinuos con fines preparativos

Nos referimos a un procedimiento utilizado por nosotros a semejanza del de FLOOD, HIRST y JONES (215) que se usa en cromatografía. Se trata simplemente de realizar la electroforesis en tiras de papel de gran anchura, a veces superior a la longitud, introduciendo sus extremos en las vasijas electródicas y realizando toda la operación a la manera usual. Terminada la electroforesis se cortan tres tiras longitudinales estrechas, dos próximas a los bordes y una central, que son las únicas que se someten a desecación y se revelan, con el objeto de que sirvan posteriormente para localizar las zonas o bandas correspondientes a cada fracción separada. El papel se corta de forma que en cada banda quede una sola fracción, aun cuando haya que despreciar las zonas intermedias en que pudiera haber mezcla, puesto que las líneas de separación no siempre son perfectamente definidas, sobre todo si el tiempo de recorrido no ha sido lo suficientemente largo, o el potencial lo suficientemente elevado.

Bastará ahora eluir cada una de las zonas de papel cortadas, lo cual puede hacerse con cualquier eluyente adecuado, habiéndonos ido muy bien, en el caso de las proteínas, el uso de suero fisiológico; para otros casos hemos utilizado agua o un disolvente orgánico. Los eluidos se pueden concentrar hasta el grado que se desee y con las precauciones que correspondan a cada caso; en general, se requiere hacer la concentración

(214) GRASS, J., *Proteínas plasmáticas*, Ed. JIMS, Barcelona, 1956, pág. VIII.

(215) FLOOD, A. E., HIRST, E. L. y JONES, J. K. N., *J. Chem. Soc.*, 1679 (1948).

a presión reducida y, en muchos casos, se necesita, además inyectar por el capilar gases inertes.

Podemos indicar que para proteínas, aminoácidos y azúcares, hemos conseguido aislar especies muy puras frente a varios criterios (cromatográfico, electroforético, puntos de fusión, etc.), con un buen rendimiento, aunque, naturalmente, en escala micro o semimicro.

IX

ELECTROFORESIS EN PAPEL: METODOS CONTINUOS

A) Métodos continuos con fines preparativos

GENERALIDADES Y TÉCNICAS MÁS CARACTERIZADAS

Estos métodos constituyen la llamada, por antonomasia, electroforesis continua, nombre que, en general, alude a la manera continua de suministrarse, en ella, la solución de la mezcla de sustancias a separar.

Existen en la bibliografía diversos intentos de separaciones proteínicas con fines preparativos, dentro del campo de la electroforesis libre. Entre ellos podemos citar los de MACHEBOEUF (216), HAHN y TISELIUS (217), SVENSSON (218) y otros, en ninguno de los cuales fueron satisfactorios los resultados prácticos que se obtuvieron. Más tarde, HAUGAARD y KRONER (219) utilizan el principio de la electroforesis continua en un medio anticonvección en una forma elemental (cromatografía de partición con voltaje aplicado), y es algo más adelante cuando GRASSMANN y HANNIG (220) por un lado, y SVENSSON y BRATTSTEN (221) por otro, publican casi simultánea, pero independientemente, unos trabajos en los cuales se cita el uso de columnas rellenas de diversos polvos inertes, que actúan

(216) MACHEBOEUF, M., *C. R. Soc. Biol.*, 135, 1241 (1941).

(217) HAHN, L. y TISELIUS, A., *Biochem. Z.*, 314, 336 (1943).

(218) SVENSSON, H., *Arkiv. Kemi. Mineral., Geol.*, B 15, N.º 19, 1 (1942) [*C. A.*, 37, 4274^b (1943)].

(219) HAUGAARD, G. y KRONER, T. D., U. S. Patent N.º 2, 555, 487, 27 Feb. 1948; *J. Amer. Chem. Soc.*, 70, 2135 (1948).

(220) GRASSMANN, W. y HANNIG, K., *Angew. Chem.*, 62, 170 (1950).

(221) SVENSSON, H. y BRATTSTEN, I., *Arkiv. Kemi.*, 1, 401 (1949).

como medios anticonvección en la electroforesis continua (*). Esta disposición, debido principalmente a la dificultad de obtener rellenos de polvo de porosidad uniforme, fué pronto sustituida, por GRASSMANN y HANNIG (220) y otros, por aquella otra en la que se utilizaban, como medio anticonvección, hojas o cortinas de papel de filtro. Algo después, DURRUM (222) adopta, sobre las mismas bases, una disposición diferente, siendo estas dos, la de GRASSMANN y HANNIG y la de DURRUM, las técnicas más caracterizadas de electroforesis preparativa en papel, seguidas, en sus líneas fundamentales, por los demás investigadores que han utilizado este nuevo método continuo de separación y obtención de sustancias en el que se combina el efecto de electromigración de las partículas con el de un flujo líquido descendente. Todos los métodos electroforéticos continuos tienen de común la superposición, al flujo descendente de electrolito, de un campo eléctrico que forma con aquél un cierto ángulo, lo cual se lleva a cabo, de ordinario, haciendo correr el tampón en sentido descendente, a través del medio anticonvección, por efecto de las fuerzas de gravedad y capilaridad, principalmente.

En la técnica de GRASSMANN y HANNIG, el papel de filtro extragrueso se corta en forma cuadrada y se dispone, en sentido vertical, en una cámara; los electrodos, de platino, se aplican a lo largo de ambos lados del papel, de modo que sujetan a éste lateralmente; el campo eléctrico creado forma así un ángulo recto con la dirección del flujo líquido descendente. Según esto, y puesto que el suministro de problema se efectúa en un punto de la zona superior del papel, las partículas eléctricamente neutras serán arrastradas hacia abajo por el flujo líquido, mientras que las partículas cargadas se desplazarán oblicuamente con una velocidad proporcional a su movilidad y a un ángulo, α , determinado por la fórmula:

$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{\text{velocidad de migración electroforética}}{\text{velocidad de flujo}} = \frac{v_e}{v_s}$$

En el dispositivo de DURRUM la hoja de papel se suspende libremente, introduciéndose las dos esquinas o extremos laterales inferiores en dos vasijas con solución tampón, en las cuales se encuentran los electrodos.

Según lo expuesto es lógico pensar, como comprobaremos después experimentalmente, que el campo eléctrico creado en la hoja de papel, tendrá características distintas en los dos sistemas descritos. Por lo demás, la disposición es análoga en ambos; en los dos, el borde horizontal superior

(*) Pueden indicarse, como un antecedente en el uso de medios anticonvección, los trabajos de PHILPOT [PHILPOT, J. St. L., *Trans. Faraday Soc.*, 36, 39 (1940)] en los que utiliza un gradiente de densidades para tal fin.

(222) DURRUM, E. L., *J. Amer. Chem. Soc.*, 73, 4875 (1951).

de la hoja de papel se introduce en un depósito con solución tampón, el cual, en nuestro caso, es una cubeta alargada de sección aproximadamente semicircular, en la que debe mantenerse un nivel constante de líquido, con objeto de que la solución fluya uniformemente. Esto, como veremos después, tiene gran importancia, así como el que la velocidad de suministro de la mezcla de sustancias a separar, que nosotros efectuamos en la parte alta de la hoja de papel por medio de una fina lengüeta de papel de filtro adherida a otra más ancha de celuloide, sea constante. El líquido fluye, pues, desde arriba, al ser continuamente sifonado por el papel y, como indicamos, desciende a través del mismo, por efecto de fuerzas de gravitación y de capilaridad, arrastrando consigo la mezcla de sustancias a separar. De esta forma, la solución problema sigue, en principio, una trayectoria transversal (perpendicular u oblicua, según se trate de las condiciones de GRASSMANN y HANNIG o de las de DURRUM, respectivamente) a las líneas de fuerza del campo eléctrico creado en el papel al hacer pasar él por la corriente eléctrica; de esta manera, las moléculas, de acuerdo con la carga que adquieren en el sistema tampón utilizado, se desviarán, unas hacia el ánodo, otras hacia el cátodo, y otras, las no cargadas, no sufrirán, en teoría, desviación alguna. Se separan así las distintas sustancias, siguiendo trayectorias divergentes que terminan en puntos distintos del borde inferior de la hoja de papel, el cual está recortado en una serie de picos por donde gotea el tampón con las sustancias ya separadas, que se recogen en una serie de tubitos de ensayo dispuestos al efecto. El sistema así formado va introducido en una cámara húmeda, que nosotros, antes de empezar la electroforesis, saturamos de vapor por «atomización» o pulverización del mismo tampón utilizado. Además, hemos logrado dar a la cámara las dimensiones mínimas (más fácil saturación y menos evaporación posterior) ajustándonos también a las características, ya tratadas al hablar de la evaporación en la electroforesis analítica, que se refieren a aumentar la superficie de paredes paralelas a la cortina de papel y disminuir las correspondientes a las perpendiculares. De este modo, pensamos que la evaporación ocurrirá por igual desde toda la superficie del papel hacia la pared paralela, más fría, al mismo tiempo que será menor en el otro sentido; de no ocurrir así, aun cuando sus efectos sobre los resultados no tuvieran el mismo carácter que en la electroforesis analítica (recuérdese en aquella, a título de ejemplo, la deformación de bandas por efectos de borde), sí que podría dar lugar, no obstante, a un gradiente de concentración que llevaría consigo una mayor velocidad de flujo descendente, lo cual, como veremos, no interesa, en absoluto, si queremos lograr la máxima separación de fracciones.

ALGUNAS DE SUS VENTAJAS FRENTE A LA ELECTROFORESIS DISCONTINUA

Una ventaja fundamental del método de electroforesis continua en papel, frente al discontinuo, típicamente analítico, aparte de la especificidad de objeto, radica en los medios de la adsorción. En la electroforesis analítica la migración de las partículas se ve retrasada por la adsorción, según estudiamos anteriormente, perjudicándose la separación y delimitación de unas sustancias por el rastro de otras. En la adsorción reversible se establece un equilibrio dinámico entre las partículas que se adhieren a la superficie y las que están en solución. En la electroforesis continua, las partículas recién adsorbidas no son transportadas ni por el flujo líquido ni por efecto electroforético propiamente dicho, es decir que tanto la velocidad de migración electroforética (v_e) como la velocidad de flujo (v_s) son reducidas por el mismo factor, permaneciendo, por lo tanto, invariable el ángulo de desviación (α) (223). De aquí que esta adsorción no influya en la dirección de desplazamiento, sino solamente en la velocidad. Ahora bien, si tuviese lugar una adsorción muy considerable, también en ese método se originaría una disminución en la nitidez de la separación, e incluso, si dicha adsorción llegase a ser prácticamente irreversible, entonces, la sustancia ni siquiera se movería del lugar de suministro (224).

CONDICIONES PRÁCTICAS DE REALIZACIÓN

Como datos curiosos que nos dan una idea de la realización práctica de la electroforesis preparativa encontramos en la bibliografía que, por ejemplo, en el caso de las proteínas de 2 cc de suero sanguíneo, se requiere para su separación unas 36 horas; la corriente empleada, para una superficie de separación del papel de 23 x 20 cm, es de unos 100 a 300 voltios, y, como máximo, de 20 mA. Con una fuerza iónica del tampón de veronal/veronal sódico (pH 8,6) de μ 0,066, se puede trabajar con una intensidad de campo eléctrico de 8 vol./cm. Modificando de manera apropiada el pH del tampón y la relación entre las concentraciones del mismo y de la mezcla de sustancias a separar, se pueden establecer las condiciones óptimas para cada caso (225).

Es muy importante, para la correcta separación de las sustancias, mantener un estado estacionario o uniforme, a lo largo de todo el experimento, tanto en lo que se refiere al deslizamiento del líquido con la sustancia a separar, como a la intensidad del campo eléctrico, cuya constancia, na-

(223) WEBER, R., *Helv. Chim. Acta.*, 36, 425 (1952).

(224) GRASSMANN, W., *Ciba Symp.* 1956, pág. 12.

(225) WUNDERLY, CH., *La electroforesis en papel.* (Trad. J. Gras), Ed. Científico-Médica, Barcelona, 1956 pág. 30.



turalmente, debe ser una de las condiciones más exigidas; igualmente se requiere la constancia y uniformidad de temperatura.

Nuestros primeros trabajos en este campo se han dirigido al estudio de las condiciones óptimas de realización. Empleando la disposición de DURRUM, con una hoja de papel apaisada, de unos $43 \times 23,5$ cm, y tampón de veronal de pH 8,6 y $\mu = 0,066$, la diferencia de potencial que encontramos óptima oscila alrededor de los 760 vol, lo que da una intensidad de corriente de 30 - 40 mA; estos dos valores, inicial y final, de intensidad de corriente, nos indican un aumento gradual que se corresponde con el período de imbibición creciente del papel por la solución tampón; ahora bien, después de alcanzar el valor máximo, la intensidad de corriente disminuye hasta llegar a otro valor que se mantiene constante hasta el final del experimento; si variamos el potencial, ya sea para aumentarlo o para disminuirlo, el fenómeno ocurre igual, pero siempre el miliamperaje final, invariable, es menor que el obtenido en las primeras condiciones. Para este fenómeno sólo encontramos posible una explicación, y es que el calentamiento producido por esas intensidades de corriente elevadas tiene como consecuencia la evaporación de disolvente, e incluso, a veces, el arrastre o la sublimación de parte del electrolito más volátil, con lo cual aumenta la resistencia del papel y, consiguientemente, disminuye la intensidad de corriente que por él pasa, disminuyendo con esto, también, el calentamiento y la evaporación; pero como quiera que el líquido tampón desciende continuamente desde la cubeta superior, al aumentar la evaporación tendrá lugar una mayor succión del mismo, llegando a establecerse un equilibrio que mantiene constante la intensidad de corriente a potenciales distintos.

En ocasiones en que el potencial fué muy alto tuvo lugar un depósito de electrolito sólido, debido a la gran evaporación por excesivo calentamiento, lo que, como es natural, entorpecía grandemente el proceso, anulando por completo las ventajas de un aumento de potencial. Es decir, que, puesto que el proceso viene regido por la diferencia de potencial, o mejor, por la intensidad de campo, no influyendo realmente el miliamperaje si no es para incrementar el desarrollo de calor, es preferible trabajar a intensidades de corriente pequeñas, lo que conseguimos, sin disminuir el potencial, diluyendo la solución tampón para disminuir de esta forma su intensidad iónica.

ESTUDIO DEL PROCESO

Siendo el fin perseguido en la electroforesis continua preparativa la obtención, por separado, de las distintas sustancias que forman una mez-

cla, se comprende fácilmente que nuestro objetivo inmediato sea buscar las condiciones óptimas, de mayor separación entre las diferentes fracciones que constituyen la citada mezcla. Para llegar a esto, el procedimiento que creemos más lógico y seguro es el de empezar por el conocimiento íntimo del proceso y de los factores que en él intervienen.

Es sabido que la sustancia problema llega de manera continua a la hoja de papel, que recorrería en el sentido del campo gravitatorio de no existir otros factores, como, por ejemplo, el campo eléctrico, que actúa sobre las partículas con carga eléctrica, mientras que las eléctricamente neutras siguen un curso prácticamente vertical, del mismo sentido que el flujo descendente. Pero, ante la superposición de un campo eléctrico transversal o aproximadamente transversal (perpendicular u oblicuo, según se trate del sistema de GRASSMANN y HANNIG o del de DURRUM, como dijimos), las partículas electroforizables siguen el curso determinado por la resultante de las acciones debidas a los potenciales, eléctrico y de descenso, que sobre ellas actúan. Durante el descenso, dichas partículas, como en el caso de la electroforesis discontinua, se desvían hacia el ánodo o hacia el cátodo, según el signo de su carga, a la vez que descienden hasta llegar a los picos colectores del borde inferior. Queda claro, por lo tanto, el gran interés que en esta desviación tiene la relación entre la movilidad electroforética de las partículas y la rapidez de deslizamiento del medio de transporte (de aquí también la importancia del deslizamiento laminar uniforme de dicho medio durante todo el experimento). Es decir que los iones, o las partículas cargadas en general, se mueven en virtud de la resultante de las dos fuerzas que actúan sobre ellas: la componente de campo eléctrico y la componente vertical, componente esta última que, en definitiva, se debe a las fuerzas de gravitación (líquido deslizante y partículas) y de capilaridad.

a) *Condiciones de DURRUM*

1) *Distribución de potenciales*

Creemos, pues, que el camino para introducir modificaciones en la técnica, con vistas a conseguir ventajas en la separación de sustancias electroforéticamente distintas, debe arrancar del conocimiento de aquellos factores fundamentales que en ella intervienen. Es por esto, por lo que hemos emprendido un estudio de las características del campo eléctrico creado en la hoja de papel, que hemos llevado a cabo estudiando experimentalmente la distribución de potenciales en distintos puntos de dicha hoja. Para realizar este estudio cuadrículamos el papel de 3 en 3, de 2 en

2 y de 1 en 1 cm, según los casos, con objeto de medir los potenciales en los puntos determinados por las intersecciones de las líneas trazadas por ellos (en algunos casos se han efectuado las medidas de diferencia de potencial entre 440 puntos). Las medidas, que se han realizado con un voltímetro a válvula (*), se han tomado entre puntos simétricos respecto al eje vertical de la hoja de papel; de esta manera, se comprueba que, en el dispositivo de DURRUM, los potenciales disminuyen hacia el centro, es decir, según se aproximan entre sí los dos puntos entre los que se está efectuando la medida, y hacia arriba; el potencial es por lo tanto máximo, como era de esperar, entre los puntos de las zonas electrónicas; hacia arriba y hacia el centro, el campo se uniformiza, pero siempre disminuyendo en ambos sentidos, sobre todo hacia arriba. Esto quizás pudiera explicarnos el trayecto vertical que en las zonas más altas siguen las partículas sin apenas separarse entre sí las que constituyen las distintas fracciones, puesto que, allí, las líneas equipotenciales, de las que luego hablaremos, son casi absolutamente abiertas. Esto mismo tiene importancia, y lo hemos utilizado con resultados satisfactorios, para localizar la posición del punto donde debe efectuarse el suministro de problema, al objeto de prescindir de un recorrido inefectivo.

La representación gráfica la hemos hecho llevando sobre papel milimetrado, dispuesto a modo de reproducción de la propia hoja de papel del experimento, los valores de los potenciales de los distintos puntos (véase Apéndice Experimental), poniendo, en cada uno, el potencial medido entre él y su simétrico respecto al eje que dijimos. Uniendo entre sí los puntos del mismo potencial, obtenemos una serie de curvas de la forma que aparece en la figura 34.

Estas curvas, puesto que unen puntos de igual potencial, las llamamos «líneas equipotenciales» y, por analogía con las superficies equipotenciales o superficiales de nivel, serán normales a las líneas de fuerza del campo eléctrico creado en la hoja de papel. En efecto, como quiera que la componente vertical es de menor cuantía que la componente eléctrica, las trayectorias de las partículas resultan prácticamente perpendiculares, en todos sus puntos, a estas líneas equipotenciales, correspondiéndose, en principio, con las líneas de fuerza del campo, tal como las hemos dibujado en la figura 34; es decir, que, como dijimos más arriba, las partículas, en su desplazamiento, siguen aproximadamente las líneas de fuerza del campo eléctrico creado en el papel (**).

(*) *Avometer*, Modelo 012, fabricado por Radio Kits Inc.

(**) En realidad, las trayectorias son algo más cerradas debido a que el vector eléctrico ha de componerse con el vector de descenso, el cual depende, a su vez, de varios factores: gravitación, capilaridad del soporte, suministro de tampón, temperatura, etc.

En la parte superior del papel, como ya indicamos, los potenciales se uniformizan, de tal manera, que las líneas equipotenciales resultantes tienen un radio de curvatura tan enorme que la trayectoria de las partículas en esta zona del papel es vertical.

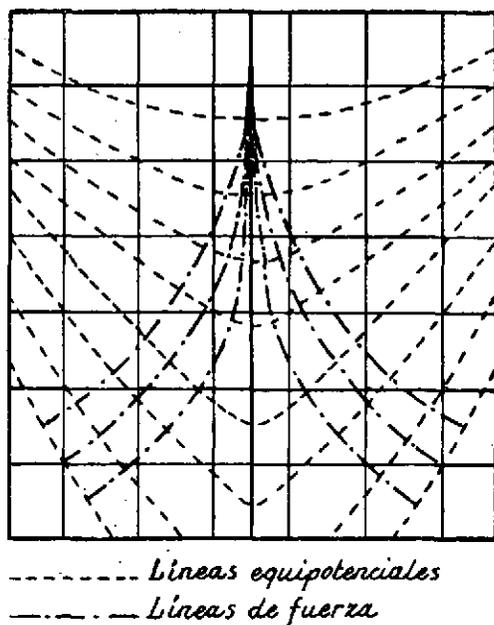


Fig. 34.—Distribución de potenciales sobre el papel, en las condiciones de DURRUM.

Este sería, pues un camino teórico-experimental que nos llevaría a establecer, en cada caso, las condiciones óptimas de dimensiones del papel, puntos de aplicación de la diferencia de potencial, etc., etc. Todo consistiría en lograr unas líneas equipotenciales lo más cerradas posible; de esta manera, la separación empezaría en seguida. Esto es lo que hemos perseguido en toda una serie nutridísima de experimentos, en unos de los cuales, conservando análoga disposición, hemos variado solamente las dimensiones del papel y el valor de los potenciales aplicados. En estos ensayos encontramos, que, en efecto, existen para cada caso unas dimensiones, no sólo óptimas, sino además límites, de la anchura del papel, e igualmente, comprobamos el efecto ventajoso de acortar éste, con la consiguiente economía del mismo, así como de tampón, y, sobre todo, de tiempo.

Todo este estudio, y los análogos que realizamos después para otras condiciones, los llevamos a cabo cuando ya el campo se había hecho uni-

forme y el miliamperaje (ya hablamos antes de sus variaciones) permanecía constante.

2) *Ensayos prácticos de separación*

Estos primeros experimentos, realizados con el objeto principal de estudiar la técnica y condiciones de separación continua, se llevaron a cabo con soluciones de mezclas de aminoácidos (tampón de ftalato, de pH 5,9) y con sueros sanguíneos, concretando el estudio, en este último caso, a la separación de proteínas (tampón de veronal, de pH 8,6). El revelado se hizo en la forma usual, descrita para la electroforesis discontinua, y el secado previo al revelado lo hicimos dejando en seco, por sifonación, la cubeta de suministro de tampón, y procediendo entonces a hacer el secado del papel, en la propia cámara electroforética, mediante rayos infrarrojos.

Separación de aminoácidos

En los primeros ensayos efectuados con aminoácidos, con un dispositivo fundamentalmente análogo al de DURRUM, obtuvimos ya una separación satisfactoria de los mismos, sobre todo cuando la solución problema estaba formada solamente por un aminoácido de cada uno de los tres tipos, ácido, básico o neutro. Así, podemos citar, por ejemplo, la separación de una solución de clorhidrato de arginina (básico), metionina (neutro) y ácido aspártico. En ella, como en todas las demás de aminoácidos que hemos realizado, aparece, el de carácter básico, desplazado hacia el electrodo negativo, el ácido hacia el positivo y el neutro desciende prácticamente sin desviación, es decir, que estando el suministro de la muestra problema en el centro de la parte superior del papel, la solución tampón que contiene a este aminoácido gotea por un pico central. En este caso concreto, en un papel de 43 cm de ancho por 23,5 cm de largo (medido desde la base de los triángulos que forman los picos, y no desde el vértice, hasta la línea por donde se dobla el papel en la parte superior para introducirlo en la cubeta superior de tampón), con una diferencia de potencial de unos 760 voltios y con 30 a 45 mA, durante 3 horas, se obtiene una separación que corresponde a una distancia de 6,5 cm del punto por donde gotea la arginina a aquel por donde aparece la metionina, y de 8 cm desde este último al correspondiente al ácido aspártico.

En otros casos en que la mezcla de aminoácidos estaba constituida por más de uno de cada tipo, siguió siendo clara la separación entre los de carácter distinto; la separación de los de igual carácter fué bastante sa-

tisfactoria, en algunos casos, para los componentes de los grupos ácidos y básicos, pero no así para los neutros que siguieron formando un grupo único.

Los nuevos ensayos de aislamiento de aminoácidos se realizaron en condiciones encontradas tanteando las relaciones entre los pH de los tampones utilizados y los puntos isoeléctricos de los distintos aminoácidos, consiguiendo, en algunos casos, resultados completamente satisfactorios. La disposición experimental es análoga a la descrita para los casos anteriores.

Con tampón de acetato de pH 3,8 [44 cc de ác. acético 0,2 M (11,55 cc/l) + 6 cc de acetato sódico 0,2 M (16,4 gr AcONa anhidro ó 27,2 gr de AcONa · 3H₂O/l) en un volumen de 100 cc] se consiguió separar claramente, de una mezcla de aminoácidos de carácter ácido (aspártico + glutámico), básico (lisina + arginina + histidina) y neutro (glicocola + alanina + valina + serina + prolina + oxiprolina), tres grupos correspondientes a cada uno de estos caracteres, lográndose una separación entre los dos componentes ácidos más satisfactoria aún que la lograda en el caso anterior; dicha separación está favorecida tanto por el menor peso molecular del aspártico como por el punto isoeléctrico, más bajo también, de este aminoácido (pI asp.: 2,77; pI glut.: 3,22) (fig. 35).

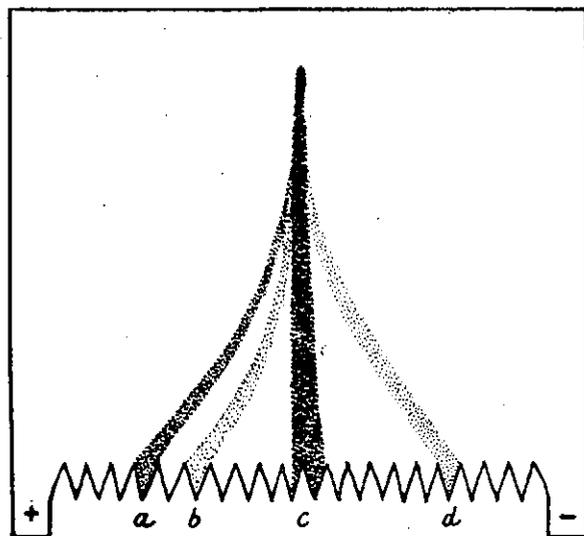
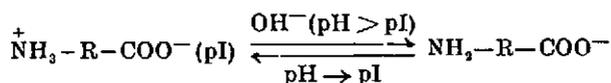


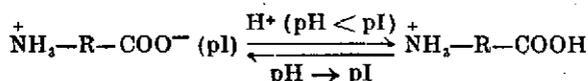
Fig. 35.—Separación continua de aminoácidos (pH, 3,8, disposición de DURRUMI. a: ác. aspártico; b: ác. glutámico; c: glicocola + alanina + valina + serina + prolina + oxiprolina; d: arginina + histidina.

Dicha separación fué todavía superada utilizando tampón de ftalato ácido de potasio, de pH 5,9, más alcalino que el anterior tampón frente

a los pI propios del aspártico y glutámico. De una manera general puede indicarse que, para pH superiores al pI, el equilibrio doble ión \rightleftharpoons ión sencillo se desplaza de izquierda a derecha al aumentar el pH, mientras que el desplazamiento cambia de sentido al tender a igualarse pH y pI:



Con este segundo tampón conseguimos la separación de los aminoácidos básicos entre sí, todos desplazados hacia el cátodo, como corresponde a este valor de pH, pero con mayor velocidad electroforética la arginina que la lisina y ésta que la histidina, de acuerdo también con sus puntos isoelectrónicos respectivos. La trayectoria de los aminoácidos neutros aparece, al revelar con ninhidrina, intensamente coloreada y desplazada ligeramente hacia el cátodo; esto ocurre así, ya que, según explicamos en capítulos anteriores, a valores de pH por debajo de los puntos isoelectrónicos, que es lo que ocurre en el caso en cuestión, queda favorecida la forma catiónica de los mismos. Cabría la objeción de que, a un pH 5,9, tan próximo a los pI de los aminoácidos, la trayectoria debía ser sensiblemente vertical. En la práctica, sin embargo, está comprobada una pequeña desviación hacia la zona catódica, lo que podemos explicar por un fenómeno de electroósmosis, análogo al estudiado en la electroforesis discontinua y que actúa sobre la sustancia, en cada punto del papel, mientras permanece en él. Si el pH del tampón (el del primer caso, por ejemplo: 3,9) es mucho más ácido que el correspondiente al punto isoelectrónico, entonces, la desviación es más apreciable como hemos visto, explicándose esto perfectamente por la estructura catión que adquiere el aminoácido; la presencia de esta estructura queda favorecida por concentraciones crecientes de iones hidrógeno:



La separación de los aminoácidos neutros, entre sí, se consigue mejor, en general, con tampones de pH bajos, llegando a los mejores resultados utilizando ácido acético 1 N de pH 2,4 (226), aunque todavía con él la separación entre algunos de tales aminoácidos neutros es muy confusa, apareciendo por ejemplo unidos la valina y serina, y casi unidos, aunque puede apreciarse ya una pequeña separación entre ambos, la glicocola y la

(226) GRASSMANN, W. y HANNIG, K., *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, 292, 48 (1953).

alanina; la prolina y oxiprolina muestran una separación aproximadamente igual. La separación es ya algo más marcada entre los tres grupos de dos aminoácidos que se han indicado.

Como era de esperar, para este valor de pH tan por debajo de los puntos isoeléctricos de estos aminoácidos, se comportan todos claramente como cationes, desplazándose hacia la zona electródica negativa los aminoácidos neutros normales, con tanta mayor intensidad cuanto menor es el peso molecular, es decir, cuanto mayor es lo que pudiéramos llamar carga específica o densidad de carga, que, en estas condiciones relativamente forzadas de pH, en las que el carácter cualitativo eléctrico (relación de pH/pI) podríamos decir que se iguala para todos, es la que en realidad gobierna la separación, con predominio sobre los pI. No obstante, es curioso observar que cuando en la molécula del aminoácido existen otros grupos funcionales distintos de los específicos amino y carboxilo, no se cumple esta regla. Así, por ejemplo, nos encontramos que la serina (oxi-alanina y treonina (oxi- α -amino-butírico), que según aquello debían aparecer más desplazadas hacia el cátodo que la leucina por ejemplo (por ser menores sus pesos moleculares y poseer el mismo número de grupos amino y carboxilo), y, por la misma razón, también la serina más desplazada que la valina, no aparecen así, lo cual puede ser debido a la presencia de los grupos OH, alcohólicos o fenólicos, en la molécula de tales aminoácidos, con lo que se atenúa el carácter catiónico de los mismos, disminuyendo el punto isoeléctrico y haciendo que su alejamiento de la zona positiva sea más débil; también puede explicarse, igualmente, por el hecho de ser menor su velocidad de migración a causa de la fuerza de hidratación de dichos grupos. Así, en la hoja de papel revelada con ninhidrina, se puede observar claramente cómo la serina, u oxialanina, tiene menor velocidad de desplazamiento aniónico, es más lenta, que la alanina, e igualmente la treonina (oxiaminobutírico) que la valina (amino glutárico), a pesar de la pequeña diferencia de peso molecular entre ellos. Fenómeno análogo ocurre con la prolina y oxiprolina, ambos iminoácidos heterocíclicos, para los que la velocidad electroforética es menor que la de los aminoácidos propiamente dichos, de igual o mayor peso molecular; esto podríamos explicarlo como debido, precisamente, al grupo imino de sus moléculas, grupo menos básico que el amino (mayor punto isoeléctrico) y que, por lo tanto, se carga menos positivamente, con lo cual el desplazamiento de la molécula tiene un carácter más aniónico.

En general, a pH altos, ya en la zona alcalina (tampón de veronal, pH 8,6), la separación de los aminoácidos neutros resultó poco satisfactoria.

Finalmente, como un complemento a nuestros resultados, vamos a re-

sumir los encontrados por GRASSMANN y HANNIG (226) respecto a los aminoácidos básicos, concretamente, respecto a las bases exónicas: histidina, lisina y arginina; estos resultados ponen de manifiesto: 1.º) que para distintos valores de pH comprendidos entre 7,5 y 11, la histidina se comporta como anión y la arginina como catión; 2.º) que la lisina, a valores de pH superiores a 10,4, es aniónica, como la histidina, y por debajo de ese pH, catiónica, como la arginina, situándose claramente entre aquellos aminoácidos cerca del pH 10,4; 3.º) que a pH inferiores, los tres aminoácidos citados se comportan como cationes.

De estos últimos resultados podemos deducir: a) por lo primero, que el pI de la histidina será inferior a 7,5 y el de la arginina superior a 11; b) por lo segundo tendríamos que el pI de la histidina deberá ser menor que 10,4, el de la arginina mayor que 10,4 y el de la lisina igual a 10,4; los valores calculados, a partir de los pK ácidos y básicos correspondientes, son los que siguen: histidina, 7,59; arginina, 10,76; lisina, 9,74. Como puede observarse, el error para el pI de la histidina es prácticamente despreciable; el pI de la arginina, calculado por ambos procedimientos, es concordante, y el error de los valores encontrados para la arginina, en el primer caso, y para la lisina, interpretamos que pueden provenir, fácilmente, de fenómenos de desplazamiento electrosmótico, de difusión, etc.) por lo tercero, se confirma que los pI de estos tres aminoácidos básicos son superiores a 5,9.

Una anomalía aparente en la separación de aminoácidos

Aunque sólo sea de pasada, queremos hacer constar un fenómeno observado en algunos de los experimentos realizados con aminoácidos (tampón de ftalato ácido de K, pH 5,9) y que nos llamó la atención. Después de varios ensayos con aminoácidos, es decir, con mezclas de los mismos, de carácter ácido y básico principalmente, con resultados plenamente satisfactorios, obtuvimos con nuevas muestras (concretamente, se trataba de una mezcla de aspártico y arginina) una separación defectuosa, siendo curiosa la forma adoptada por las trayectorias, siempre igual: el aspártico aparecía como superponiéndose a la arginina, empezando a separarse después de haber recorrido ya un trayecto, más o menos largo, sobre el papel, separación que, además, no es brusca, sino que se verifica gradualmente, adquiriendo la forma aproximada que aparece en la figura 36.

Esto pensamos que podría ser debido a que, como hemos visto, en la zona más alta del papel el campo es prácticamente nulo y si la concentración de alguna de las sustancias electroforizables pasa de un cierto lími-

te, máximo para un conjunto dado de condiciones, especialmente para un valor de diferencia de potencial determinado, entonces, podemos considerar que la densidad de carga eléctrica efectiva de las partículas será muy pequeña, con lo cual el número de transporte tendrá un valor insuficiente para que la partícula emigre en el campo eléctrico, como era de esperar.

En efecto, si el suministro de problema se verifica más abajo, esa zona de emborronamiento disminuye, y si diluimos el problema y bajamos su nivel en el depósito de suministro, para que éste sea más lento, también empieza antes la separación.

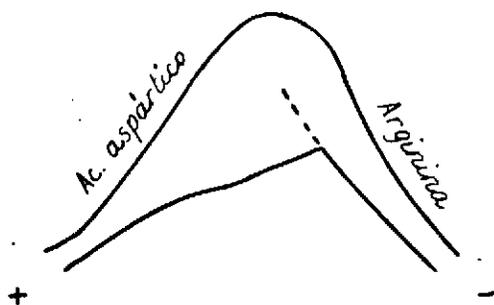


Fig. 36.—Separación anormal del aspártico y arginina.

Cambiando la polaridad de los electrodos el resultado es prácticamente el mismo, sólo que en sentido inverso.

Aumentando el potencial y manteniendo constantes los demás factores, de manera que el potencial en la zona alta fuese ya apreciable, se consiguió una perfecta separación, prácticamente desde el mismo punto de suministro.

Cuando aumentamos progresivamente la proporción de arginina en la disolución, llegó un momento en que apareció un fenómeno en todo análogo al anterior, pero de sentido inverso, quedando el emborronamiento por la zona de la arginina.

Separación de proteínas

En el caso de sueros sanguíneos (tampón de veronal/veronal sódico, pH 8,6) observamos también que, igual que en la electroforesis propiamente analítica, se separan en la continua distintas fracciones proteínicas, aunque no tan netamente diferenciadas como allí. Al igual que entonces, la trayectoria correspondiente a la albúmina diverge hacia el polo positivo y aparece mucho más intensamente coloreada que las restantes, entre las que se observa una, casi vertical, que podría corresponder a la globu-

lina beta, y otra, desviada hacia el polo negativo, que será la de la gamma-globulina. En tres experimentos preliminares con papeles de iguales dimensiones que las que dimos últimamente para los experimentos con aminoácidos ($43 \times 23,5$ cm), con una diferencia de potencial de 700 y 780 voltios y un paso de corriente de 15 a 20 mA, se obtienen unas separaciones, medidas en la base de los picos y entre las dos fracciones más extremas, de unos 5,6 y 6 cm, respectivamente.

Para comprobar la eficacia real de la separación de seroproteínas en la electroforesis continua, se seleccionaron aquellos tubos que correspondían a picos de goteo por los que, según acusaba la tinción de la hoja de papel, había tenido lugar salida de proteínas. El contenido de tales tubos se concentró a vacío, y muestras de los concentrados se sometieron a electroforesis discontinua analítica sobre pistas paralelas de tiras de papel que trabajaron en igualdad de condiciones, y en todas las cuales una de sus pistas estaba ocupada por una muestra del suero suministrado en la electroforesis continua. Las distintas fracciones proteínicas de cada una de estas pistas aparecieron correspondiéndose exactamente con la posición que ocupaban en el espectro electroforético del suero primitivo integral,

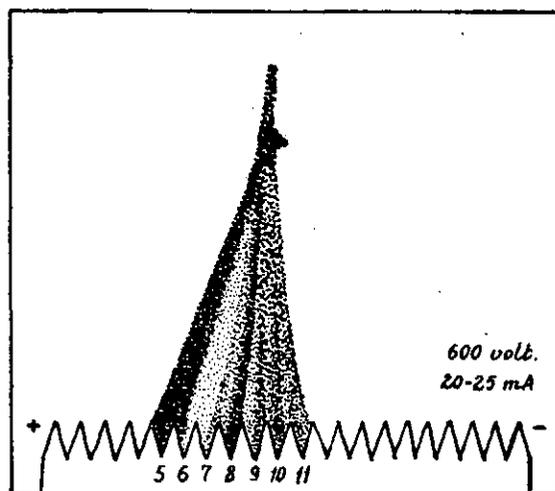


Fig. 37.—Separación continua de seroproteínas. Tinción con azul de bromofenol

fraccionado en la electroforesis continua. No obstante, la separación continua de las fracciones proteínicas intermedias (globulinas alfa y beta) se manifestó algo dudosa e incompleta, según puede comprobarse en la reproducción de la hoja de papel teñida con azul de bromofenol, que aparece en la figura 37, y en los proteinogramas parciales de control de la figura 38, obtenidos según el procedimiento seguido por GRASSMANN y

HANNIG (227), por fotometría directa de los correspondientes electroforegramas (realizados éstos con el mismo tampón de veronal, a 250 vol durante 4 horas, y teñidos con el mismo colorante). Tanto en la figura 37 como en los diagramas de la 38 indicamos, por medio de números, los picos de goteo y los tubos colectores correspondientes a las fracciones proteínicas separadas.

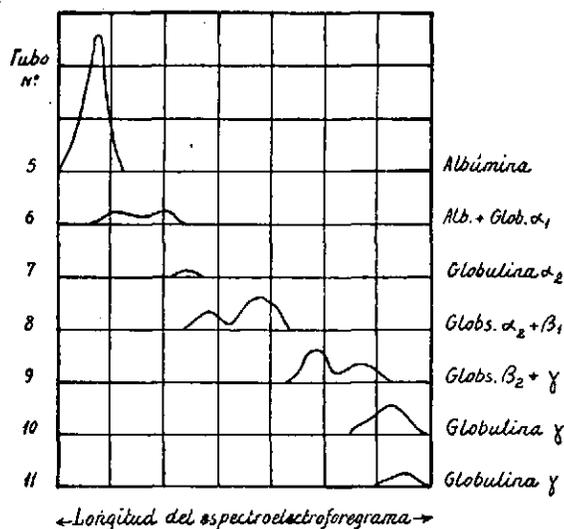


Fig. 38.—Diagramas de control de la separación continua de seroproteínas

3) Algunas consecuencias prácticas del potencial aplicado

Habiendo comprobado también en nuestros experimentos de electroforesis continua que la separación lograda es función directa del potencial aplicado, hemos llegado a trabajar, en algunos casos, hasta con 800 voltios. Por otra parte, partiendo de la hipótesis de que al disminuir la distancia entre los electrodos (en este caso, la anchura de la cortina de papel) la intensidad del campo eléctrico (vol/cm) sería mayor, siempre que el potencial interelectródico no disminuyera en la misma ni en mayor proporción, verificamos dos experimentos con papeles más estrechos, al objeto de comprobar si con esta disposición (las restantes condiciones fueron análogas a las anteriores) se conseguía una mayor separación de las seroproteínas; los resultados obtenidos fueron satisfactorios, lográndose una separación algo mayor cuyo aumento quedó comprobado también con aminoácidos.

(227) GRASSMANN, W. y HANNIG, K., *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, 292, 46 (1953).

Por otro lado, los fenómenos ocurridos en los ensayos con papeles estrechos nos dieron ocasión de comprobar que debe existir una distancia mínima, conveniente, entre los dos puntos en que se aplica la diferencia de potencial y de la cual no se debe bajar, ya que, si el campo creado en la hoja de papel es muy intenso, se produce un excesivo calentamiento, que da lugar, a su vez, a una excesiva evaporación de agua del tampón. En dos o tres experimentos, se manifestó el resultado de este fenómeno al cristalizar sustancias en algunos puntos de la zona inferior del papel, donde, como hemos visto, los potenciales son máximos para la disposición adoptada, e igualmente lo son el calentamiento y la evaporación. Fundándonos en esto, hicimos un nuevo ensayo tratando de evitar un recorrido innecesario de las proteínas en el papel, con el consiguiente ahorro de tiempo, para lo cual redujimos la longitud de aquél a 15 cm, poniendo los electrodos a la altura necesaria. En efecto, se obtuvo una separación algo mayor que en los otros casos con papeles más largos.

b) *Modificaciones de la técnica de DURRUM*

Otros de nuestros experimentos, realizados con el doble fin, teórico y práctico, que caracteriza esta Memoria, tuvieron por objeto modificar la disposición adoptada, para así influir directamente sobre las características del campo eléctrico creado en el papel. En este sentido, hemos adoptado, entre otras, disposiciones basadas en las sugeridas por DI CASTRO y SAN MARCO (228). En una de ellas, añadimos a las tomas electródicas inferiores, del sistema de DURRUM, otra pareja de dichas tomas a la altura donde se verificaba el suministro de problema. La distribución de potenciales, determinada por el sistema que explicamos en un apartado anterior, pone de relieve un campo más uniforme que en los casos anteriores; sin embargo, todavía se observa una manifiesta disminución, hacia arriba, del valor de los potenciales, aunque los mínimos no se encuentran completamente en la parte más alta, sino hacia la mitad (fig. 39).

En otros ensayos realizados con tres parejas de electrodos, repartidos a distancias iguales entre sí, a lo largo de los bordes laterales del papel, se sigue observando una pequeña caída de potencial hacia arriba, pero, en este caso, es gradual y no pasa por mínimo alguno en la zona central, puesto que es en dicha zona en donde se encuentra la tercera pareja de electrodos.

Esta disminución del potencial medido en la zona alta, aunque allí exista una pareja de electrodos, podemos explicarla como debida a la ley de OHM, que exige que al disminuir la resistencia en esa zona en la que

(228) DI CASTRO, G. y SAN MARCO, M., *J. Chem. Soc.*, 4157 (1954); DI CASTRO, G. *Giorn. biochim.*, 25, 464 (1955).

el grado de imbibición en líquido tampón es bastante considerable, manteniéndose el campo constante, disminuya también el potencial.

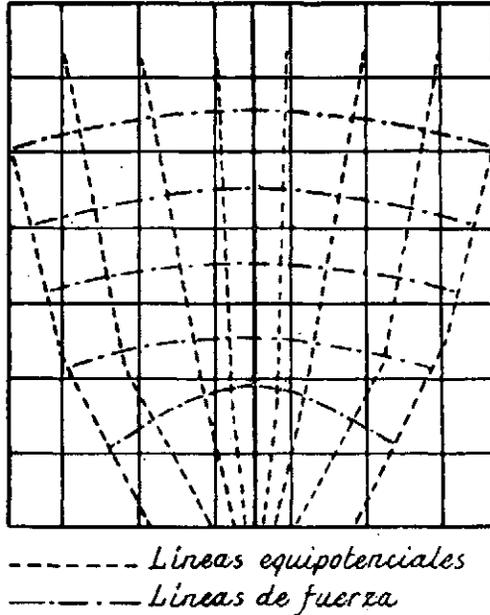


Fig. 39.—Distribución de potenciales en el papel (doble pareja de electrodos)

Otra disposición con la que conseguimos un campo bastante uniforme pese a utilizar una sola pareja de electrodos, consiste en situar éstos hacia la mitad de los bordes laterales, dando al papel la forma que se esquematiza en la fig. 40, en la que puede observarse que no se utilizan pa-

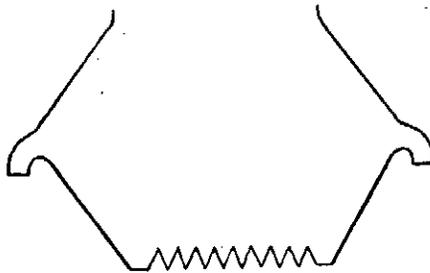


Fig. 40.—Disposición de electrodos contrales.

peles rectangulares, sino doblemente trapezoidales, con lo cual la distancia transversal entre bordes disminuye progresivamente al alejarse de la línea propiamente interelectródica, compensándose así, por el acerca-

miento, las caídas de potencial. En este caso, el potencial efectivo en la hoja de papel es muy pequeño, es decir, que tiene lugar una considerable caída de potencial, con relación al que existe en los puntos electródicos, y para lograr que este potencial efectivo en toda la hoja sea el apropiado para una separación satisfactoria de sustancias habrá que recurrir, con frecuencia, a potenciales interelectródicos más elevados que los usuales; de todas formas, creemos que esta disposición experimental merece ser tenida en cuenta.

Omitimos la enumeración de otras modificaciones ensayadas por carecer en cierto modo de interés, ya que, generalmente, se experimenta en ellas una caída de potencial muy considerable, respecto al interelectródico.

e) *Condiciones de GRASSMANN y HANNIG*

Finalmente, a través de estas distintas modificaciones, llegamos a las condiciones de GRASSMANN y HANNIG, que, realmente, y salvados en la técnica los inconvenientes de cambios de pH a lo largo de las zonas de aplicación de los electrodos laterales, son las más ventajosas. pues, aunque en la práctica también se aprecia una caída de potencial hacia arriba ésta es muy pequeña, de manera que la distribución de potenciales nos

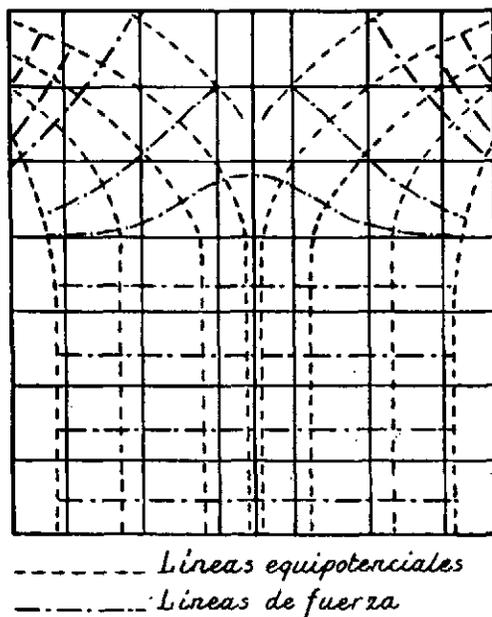


Fig. 41.—Distribución de potenciales. Condiciones de GRASSMANN y HANNIG

daría, corrigiendo un poco, un campo de la forma que se indica en el ábaco de la figura 41 en el que, como puede observarse, los potenciales en

la zona alta son también bastante elevados. En este caso, el potencial medido en el papel es más alto, con relación al de los bordes, que en los casos anteriores.

En el Apéndice Experimental, hemos seleccionado, a título de ejemplo, algunas de las tablas de potenciales que corresponden a los casos a que hemos hecho alusión; en todos ellos se ha utilizado la misma clase de papel, el mismo sistema de medición, idéntico tampón, en resumen, las mismas condiciones experimentales, salvo, naturalmente, aquellas cuya influencia sobre el proceso tratábamos de estudiar.

d) *Caidas de potencial independientes del soporte*

Hasta ahora hemos tratado de las caídas de potencial que se producen sobre el papel soporte; pero cabría hablar de otras caídas de potencial, ajenas al papel. Así, puede citarse, por ejemplo, el hecho observado por nosotros de que el voltaje de salida de la fuente manifiesta ya una primera disminución al medirlo entre los electrodos. Esta caída de potencial se incrementa grandemente cuando se utilizan, alrededor de los electrodos, envolturas permeables o semipermeables, del tipo de las que se emplean para impedir que los productos carbonosos de demolición física de los electrodos (se sobreentiende que nos referimos al uso de electrodos de carbón) enturbien el tampón y lleguen al papel. Como decimos, estas caídas alcanzan valores muy considerables, y por ejemplo, en unos experimentos realizados para la comprobación de este hecho, observamos las siguientes lecturas de potenciales (*):

- a) Diferencia de potencial a la salida de la fuente: 300 voltios.
- b) Diferencia de potencial entre el tampón de los departamentos anódico y catódico exterior a la envoltura: 120 voltios.
- c) Diferencia de potencial entre el departamento catódico y el subdepartamento (**) anódico: 215 voltios.
- d) Diferencia de potencial entre el subdepartamento catódico y el departamento anódico: 150 voltios.
- e) Diferencia de potencial entre los subdepartamentos catódico y anódico: 285 voltios.

De estas lecturas se desprende fácilmente que en la caída de potenciales interviene, de una manera especial, el subdepartamento anódico, lo que debe atribuirse a una obturación de los poros de la membrana por

(*) Estos experimentos fueron realizados utilizando envolturas de vidrio con fondo de plato poroso.

(**) Entendemos por subdepartamento electródico la porción de tampón que queda comprendida dentro de la envoltura de los electrodos.

una fina película, casi coloidal, procedente del depósito de partículas de carbón y de los aglomerantes que forman los electrodos.

e) *Discusión comparativa sobre las técnicas de DURRUM y de GRASSMANN.*

Respecto a los resultados prácticos obtenidos con las diferentes modificaciones técnicas estudiadas anteriormente, podemos afirmar que, para las mezclas de aminoácidos, cuya velocidad electroforética es generalmente muy grande, hemos obtenido resultados completamente satisfactorios utilizando la técnica de DURRUM. Ahora bien, en el caso de las proteínas del suero, de menor velocidad electroforética, y que por lo tanto se separan con menor facilidad, es más conveniente utilizar las condiciones de GRASSMANN y HANNIG, puesto que, al conservarse prácticamente constante el potencial transversal a lo largo del papel, el fenómeno será completamente análogo al de la electroforesis analítica; es decir, que en el sentido transversal, una vez fijado el potencial y la velocidad de flujo descendente, el factor que gobernará el proceso y del que, por lo tanto, dependerá la separación de las partículas, será el tiempo; por esto, las separaciones que se obtienen a diferentes alturas equivalen a haber cortado la operación al cabo de un cierto tiempo de haber comenzado. Es como si toda la cortina de papel fuese una tira analítica ancha, sólo que, aquí, al efecto propiamente electroforético se superpone el de arrastre por el líquido tampón descendente. Queda bien claro, por lo tanto, que, en las condiciones de GRASSMANN y HANNIG, el hecho de acortar el papel tendría un efecto negativo sobre el poder resolutivo del proceso, ya que equivaldría a disminuir el tiempo de electroforesis. Sólo si el recorrido fuese la excesivamente largo, podría perjudicar el efecto de calentamiento, al estar sometida las partículas durante largo tiempo a una excesiva intensidad de corriente.

En la técnica de DURRUM la cuestión varía. Como hemos visto, el potencial, en ella, aumenta hacia abajo, siendo al principio muy pequeño en la zona alta, e igualmente es también pequeña la separación de sustancias en dicha zona. En esta disposición los factores que varían son dos; tiempo y potencial, y este último es mucho menos favorable que en la técnica de GRASSMANN, porque, cuando llega la partícula a la zona inferior, aun suponiendo que el potencial allí fuese el mismo que el existente bajo las condiciones de GRASSMANN y HANNIG, es menos efectivo, ya que el esfuerzo se realiza sobre partículas que están mucho menos separadas, debido a los menores potenciales precedentes. Se necesitaría, pues, trabajar con potenciales mucho mayores en esta técnica que en la de GRASS-

MANN y HANNIG, con los consiguientes peligros e inconvenientes, ya considerados.

Estas consecuencias podemos representarlas, un tanto gráficamente, teniendo en cuenta que el camino real seguido por las partículas es el determinado por las resultantes particulares, en cada punto del papel, de las acciones que actúan sobre dichas partículas en tales puntos.

Estas acciones serían, por un lado, la ejercida por lo que podríamos llamar «componente de campo eléctrico», v_e , que actuaría en la dirección y sentido de las líneas de fuerza del campo eléctrico existente en el papel, las cuales marcan el camino que seguirían las partículas si se movieran exclusivamente por efecto de este campo; es decir, que, en dicho caso, el significado de v_e estaría íntimamente ligado al de velocidad de migración electroforética. Por otro lado, actúa la «componente de descenso vertical», v_d , debida principalmente, como dijimos, a fuerzas de gravitación y de capilaridad, y, componiendo ambas, obtenemos la resultante, R , que da el camino real seguido por las partículas en cada punto (fig. 42). La trayectoria final viene dada por la totalidad de estas resultantes. El ángulo que forma R con v_d es el ángulo de desviación que nos indica la separación obtenida y que, lógicamente, depende de las direcciones e intensidades de v_e y v_d . Pero, conservándose v constante en dirección e intensidad, independientemente de que trabajemos en las condiciones de DURRUM o en las de GRASSMANN y HANNIG, la separación o α dependerá exclusivamente de v_e .

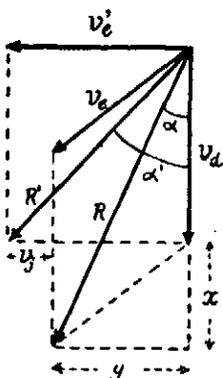


Fig. 42.— v_e , v_d , R , α , condiciones de DURRUM; v'_e , v'_d , R , α , condiciones de GRASSMANN y HANNIG v_j = ventaja de separación

Como vemos, la desviación es máxima cuando la componente de campo es perpendicular a v_d . condición característica de la técnica de GRASSMANN.

Podría pensarse que lo que se pierde en separación en cada punto,

utilizando las condiciones de DURRUM, se compensa fácilmente por la mayor rapidez con que llegan las partículas a la zona inferior, de potenciales mayores, pero esto no es cierto, ya que, según todas las medidas de potenciales que hemos efectuado en distintas condiciones, éstos, aun en la disposición de DURRUM, aumentan mucho más rápidamente hacia los lados que hacia abajo, y, por lo tanto, las ventajas siguen estando a favor de las condiciones de GRASSMANN.

Desde este punto de vista, de comparación con la técnica de DURRUM, no representaría frente a ella ningún perjuicio, en cuanto a la resolución obtenida, el acortar, en la de GRASSMANN y HANNIG, la longitud de la hoja de papel del experimento (no así, según vimos, cuando se trata de comparar entre sí condiciones distintas, dentro todas de la técnica de GRASSMANN).

La separación obtenida, como también se indicó, puede venir dada, en las condiciones de GRASSMANN y HANNIG, por la tangente del ángulo que forma la trayectoria de las partículas con la vertical; según la figura 42, podemos escribir:

$$\operatorname{tg} \alpha' = \frac{v'_e}{v_d} = \frac{y + v_l}{v_d}$$

Análogamente, podríamos escribir para el caso de DURRUM:

$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{y}{v_d + x}$$

Comparando ambas expresiones observamos que la tangente es mucho mayor para α' que para α .

Vemos, por lo tanto, que cuando sólo varía la componente de campo eléctrico la separación es tanto más efectiva cuanto mayor es el ángulo que forma esta componente con la vertical [(a) fig. 43] y cuanto mayor

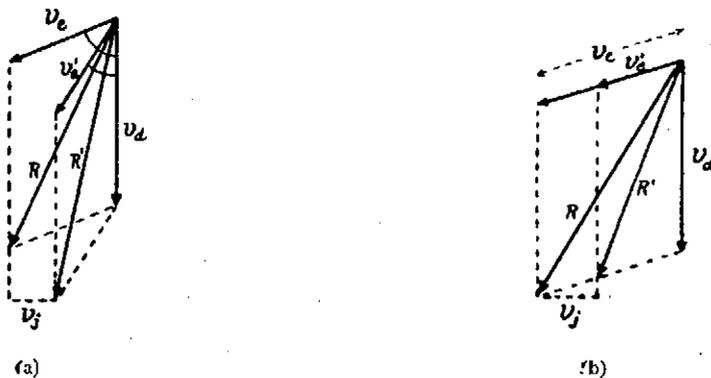


Fig. 43.—Componente eléctrica y su ángulo con la vertical

es la intensidad de v_e , o sea, cuanto más elevado es el potencial eléctrico, o más exactamente, la intensidad de campo [(b) fig. 43].

No obstante, en la práctica, hay que tener en cuenta que, puesto que el calentamiento está en relación directa con el paso de corriente, cuando se trate de separar sustancias lábiles (por ejemplo, proteínas), será necesario emplear corrientes y potenciales no muy altos, aun con algún sacrificio de la separación.

Los efectos de calentamiento son particularmente perjudiciales cuando los componentes del sistema electrolito utilizado no son volátiles, ya que, entonces, trabajando con corrientes excesivamente altas, puede ocurrir que la evaporación de agua sea tan rápida que la velocidad del flujo líquido que desciende no sea lo suficientemente elevada para poder arrastrar continuamente dichos componentes del papel, evitando el depósito, incluso de sólidos, que a veces puede ocurrir (229). La aparición de estos fenómenos de «eflorescencia» puede tener lugar, o bien por un defecto de suministro de tampón, o bien por efecto de localizaciones de calor; o lo que es más frecuente, por una combinación de ambos efectos. Estas eflorescencias, de cuya aparición ya hemos hablado antes, y que fueron provocadas por nosotros usando en algunos ensayos veronal/veronal sódico, como tampón (pH 8,6), y, las condiciones de DURRUM, como técnica, se localizan, especialmente, en las zonas del papel próximas a los electrodos, lo que está justificado por el desarrollo de calor más intenso que tiene lugar en estas zonas de potenciales e intensidades mayores y en las que el suministro se encuentra incrementado por el tampón electrolítico, contribuyendo al acúmulo de sales. En algunos casos en que la desecación fué muy marcada, la resistencia de esta zona alcanzó un valor tan elevado que la temperatura llegó a ser superior a la de inflamación del papel, que se incendió en esta región.

Si la naturaleza de las sustancias problema lo permiten la corriente óptima a emplear será la máxima que no origine aquel depósito sólido de electrolito. Si los electrolitos empleados fuesen volátiles sería posible utilizar corrientes más altas.

En varios experimentos de electroforesis discontinua tratamos de reproducir las condiciones de DURRUM y las de GRASSMANN y HANNIG, sometiendo a electroforesis sucesivas, sobre papel Archés de iguales dimensiones, dos muestras de suero, ambas durante el mismo tiempo, pero de manera que, para una, el potencial fuese el mismo durante todo el experimento (300 voltios; condiciones de GRASSMANN y HANNIG), mientras que para la otra se inició la electroforesis a un potencial muy bajo que

(229) DURRUM, E. L., *J. Amer. Chem. Soc.*, 73, 4875 (1951).



fuiamos elevando gradualmente, a intervalos iguales de tiempo, hasta llegar a los 300 voltios; de acuerdo con la forma en que habíamos observado que aumentaban los potenciales, hacia la zona electródica inferior del papel, en la técnica de DURRUM. Como esperábamos, el espectro que obtuvimos en el primer caso, reproducción de las condiciones de GRASSMANN, era de mayor longitud que el obtenido en el segundo, que reproducía las de DURRUM.

Para la comprobación práctica de los resultados y conclusiones que se deducen de estos estudios comparativos entre las condiciones de GRASSMANN y las de DURRUM, nos hemos valido de nuevo, principalmente, de mezclas de aminoácidos, que, revelados con ninhidrina, dan unas trayectorias bien definidas. El control de su separación lo efectuamos por cromatografía en papel sobre las disoluciones recogidas en los distintos tubitos (*).

f) Estudio particular de la componente de descenso

El último factor, cuya influencia sobre la separación de las partículas vamos a estudiar, es la componente de descenso, v_d , que, según vimos, influye negativamente sobre dicha separación (fig. 44), por lo que será conveniente disminuir su magnitud, en beneficio de la resolución.

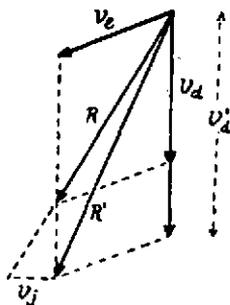


Fig. 44.—Influencia de la componente de descenso

Esta componente, equiparable a la velocidad de flujo descendente, puede modificarse de varias maneras, entre las que, para disminuirla, hemos ensayado las siguientes:

(*) El disolvente empleado para el desarrollo cromatográfico fué el constituido por Butanol: Ac. acético: H_2O (4 : 1 : 5).

a) Actuando sobre el factor de capilaridad, por medio del uso de papeles menos porosos o más compactos. En este sentido, comparamos los papeles Whatman núms. 1, 3 y 4, seleccionando el primero.

b) Bajando el nivel de líquido tampón en el depósito superior.

c) Dentelleando el borde de papel que se introduce en dicho depósito, con lo cual se consigue una velocidad de flujo descendente menor que la máxima para un papel dado.

d) Por aumento de la viscosidad del tampón, lo cual se consigue agregando al mismo una sustancia inerte, con lo que, además de reducir la velocidad de flujo descendente, aumentamos el poder anticonvección de la hoja de papel y disminuimos la presión de vapor del líquido, disminuyendo, consiguientemente, la evaporación. En las separaciones de proteínas se ha utilizado el propilen-glicol y la glicerina.

e) Por calefacción, más bien moderada, que disminuye también la velocidad de flujo descendente del tampón, independientemente del efecto que pueda tener sobre el material a separar.

f) Por último, hemos comprobado la variación de v_d al modificar el ángulo de inclinación de la hoja de papel (las componentes de capilaridad, etc., permanecen invariables). El problema es sencillamente el de un plano inclinado; es decir, que se trata de descomponer v_d en dos componentes, una normal al plano del papel, y cuyo efecto será anulado por la reacción de éste, y otra, paralela al mismo, que será la que actuará sobre el descenso de las partículas y que, naturalmente, será menor que v_d . Como fácilmente se ve (fig. 45) la relación que liga estos dos factores es la siguiente:

$$v'_d = v_d \operatorname{sen} \beta = v_d \cos \alpha$$

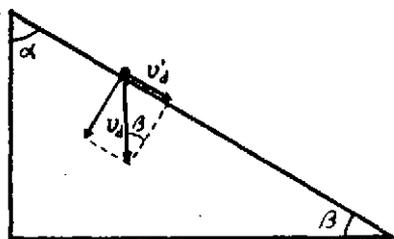


Fig. 45.—Efecto de plano inclinado

Entre 0 y 90° , al aumentar α , o sea, la inclinación de la hoja de papel, disminuye $\cos \alpha$ y con él v'_d que es la componente de descenso en este caso.

Naturalmente, puesto que el fin de este método electroforético es re-

coger las distintas fracciones separadas, no nos conduciría a nada útil el llegar al valor $\alpha = 90^\circ$, o sea, a la posición horizontal del papel, pero siempre podremos alcanzar un valor óptimo del mismo.

La realización práctica de esta idea la hemos llevado a cabo manteniendo el papel tensado en una cámara húmeda, de una tercera dimensión muy pequeña, a la que podíamos dar todas las inclinaciones deseadas, por medio de un sencillo dispositivo en el que dicha cámara húmeda iba montada sobre dos pivotes.

Los resultados obtenidos en cuanto al beneficio de resolución, aunque positivos, son poco apreciables en el caso de la técnica de DURRUM, debido, probablemente, a que al lentificar el descenso hacemos que las partículas permanezcan más tiempo en la zona de potenciales más bajos, con lo cual contrarrestamos las ventajas con los inconvenientes. Para cada caso habría que buscar un conjunto de condiciones, que nosotros hemos encontrado para unos cuantos de ellos, y en cuyo conjunto las condiciones favorables aventajen a las desfavorables. Esto no es nada fácil de conseguir y, por lo mismo, cuando se usa la técnica de DURRUM, la modificación de que hablamos no constituye simplificación alguna. Por el contrario, con la disposición de GRASSMANN y HANNIG, son claramente visibles las ventajas de esta modificación, que aparecen bien manifiestas en el caso de los aminoácidos.

Comprobando el efecto del ángulo con papeles de distinta porosidad, observamos que llega un momento en el que el aumento de velocidad, provocado por la mayor porosidad del papel, se compensa, para cada clase del mismo, por un determinado ángulo de inclinación. Luego, para nuestros propósitos, las condiciones más favorables serán papel poco poroso y ángulo de inclinación grande.

g) Algunos dispositivos prácticos

La utilización de la electroforesis continua preparativa con fines semi-industriales está empezando a extenderse, pero todavía se encuentra en etapa experimental. La previsión de estas aplicaciones industriales, indujeron probablemente a HAUGAARD y KRONER a patentar el procedimiento general (230), cuando apenas se iniciaba su conocimiento. Esto ha hecho que en E.E. UU. los dos tipos de aparatos electroforéticos continuos más conocidos, aun para aplicaciones en escala de laboratorio (el de la *Spinco Division*, de la casa Beckman, y el de la *Micro-Chemical Specialties Company*, de Berkeley) hayan tenido que ser autorizados por dicha patente.

(230) HAUGAARD, G. y KRONER, T. D., U. S. Patent N.º 2, 555, 487, 27 Febrero (1948).

En Europa el modelo más conocido es el *Elphor*, basado en el diseño de GRASSMANN.

Nosotros hemos construido varios modelos en los que, por su mayor comodidad, hemos tenido que adoptar el sistema de DURRUM; no obstante, al montado últimamente, le hemos dotado de unas ranuras laterales que permiten utilizar varias vasijas electródicas, correspondiéndose con el tampón y suministro del mismo, a la manera preconizada por DI CASTRO y SAN MARCO, disposición a la que ya nos hemos referido al estudiar la distribución de potenciales en función de la situación de las tomas de tampón y corriente.

También hemos confeccionado aparatos de cuatro tamaños, en los que se aprovecha el efecto de plano inclinado, que hemos considerado anteriormente, y cuya construcción se ha simplificado al máximo. En definitiva, bastan dos láminas de vidrio ordinario y unas varillas, también de vidrio, que cierran lateralmente la cámara húmeda así formada, y entre las que se tensa el papel. Por lo demás, sólo se necesitan dos pares de tablillas (que pueden sustituirse por dos flejes metálicos) con unos tornillos de palometa para presionar; el par superior de estas tablillas mordaza, dotado en sus extremos de dos simples pivotes, actúa de eje para dar al conjunto la inclinación deseada. En este sistema sencillo, se hace innecesaria la cámara húmeda estática y de grandes dimensiones: su reducido tamaño comunica al sistema muchas de las ventajas que vimos en su día para las cámaras pequeñas en electroforesis analítica. A voluntad puede provocarse el cierre, prácticamente hermético, de los bordes horizontales, superior e inferior, o por el contrario, cuando así conviene, dejarlos abiertos para facilitar la ventilación de la cámara, ya que, en definitiva, estas aberturas son pequeñas frente a la enorme superficie de papel protegida por efecto de pantalla.

Este sistema de cámara nos permite sustituir la hoja o cortina de papel por un número más o menos grande de hojas, en forma de paquete o pila (*), que multiplica la cuantía de producto a fraccionar. De la misma manera, este grupo de hojas puede ser sustituido por una masa de material poroso e inerte que actúe de soporte para el fraccionamiento electroforético. La realización práctica de esta idea la hemos llevado a cabo dotando a una cámara, del tipo de las que hemos tratado, de una base acanalada de celuloide, plexiglás u otro material (en nuestro caso utilizamos el celuloide) con sus valles perforados, o mejor, hendidos, cada uno de los cuales constituye una arista de goteo, equivalente a los picos de las cortinas de papel, y debajo de las cuales se sitúan los colectores adecuados (re-

(*) Respecto a este punto, ya hicimos alusión en nuestro trabajo de Licenciatura (Universidad de Murcia, septiembre, 1956).

sulta muy cómodo utilizar, como tales colectores, cubetas de forma paralelepípedica).

La cámara se llenó, en nuestros experimentos, con celulosa en polvo (de calidad «para cromatografía» y procedencia alemana), pero, realmente, puede utilizarse cualquier otro soporte inerte (lana de vidrio, «kieselgur», sílice, etc.). El suministro de tampón se hace simplemente por sifonación, a través de una mecha continua de algodón hidrófilo que vierte el líquido constantemente sobre una compresa, también de algodón, en contacto uniforme con la celulosa, y que se encuentra inundada de solución tampón a nivel constante, con lo cual se logra un flujo regular de aquél hacia la zona de goteo. La introducción de la mezcla a separar en el sistema se verifica mediante un tubito abierto por sus dos extremos y con una hendidura longitudinal, por la que fluye, lenta y continuamente, el problema, suministrado mediante una mecha embutida en dicho tubo y cuyos extremos se introducen, a su vez, en dos recipientes de reserva iguales y con la misma cantidad de problema. El tubito de suministro atraviesa de parte a parte la celulosa y las paredes de la cámara (incluido el papel, cuyo objeto explicaremos después y que estará dotado de una perforación «ad hoc», al igual que las láminas de vidrio). La hendidura del tubito debe quedar situada hacia abajo.

Para establecer el contacto más regular posible entre los departamentos electródicos y la masa de celulosa se sitúan, en los bordes de la cámara, otras dos compresas de algodón, que se hallan empapadas en el tampón algo más intensamente que el conjunto celulósico; de dichas compresas salen cuatro mechas de algodón, que sumergimos en las vasijas con tampón en las que se introducen los electrodos, dificultándose así, en parte, la incorporación de productos de electrolisis a la gruesa cortina celulósica.

Para facilitar la localización final de las fracciones separadas, al efectuar el empaquetamiento celulósico de la cámara, colocamos un papel de filtro Whatman n.º 3 adherido a una de las láminas de vidrio de dicha cámara y en contacto íntimo también con la celulosa. La única precaución que ha de tenerse en cuenta es que se logre un empaquetamiento uniforme y que se eviten las burbujas de aire entre el papel testigo y la pared de vidrio. Acabada la operación se procede a revelar solamente el papel, en el cual las trayectorias de los diversos componentes de la mezcla fraccionada se corresponden prácticamente con las seguidas por los mismos en la celulosa; de esta manera quedan localizados con precisión los colectores en que se encuentra cada fracción. Para comprobar esta correspondencia hicimos varios ensayos en cámaras de pequeñas dimensiones en las que, adoptada la disposición que se indica, revelamos por sepa-

rado la masa celulósica «in situ», después de separar la lámina de vidrio a la que iba adherido el papel, que se reveló en análogas condiciones, quedando comprobada la coincidencia.

Este procedimiento puede tener una gran importancia industrial, en un futuro próximo, puesto que, en principio, no existe limitación de tamaño en lo que a la tercera dimensión, fondo o grosor de la masa soporte se refiere, con tal de mantener uniforme el campo transversal.

B) Métodos continuos con fines analíticos

Aun cuando, al menos desde un punto de vista cuantitativo, no ofrezca interés práctico inmediato la electroforesis continua con fin analítico, no deja, sin embargo, de presentar cierto interés como consecuencia de algunas de las ventajas que, como vamos a ver, ofrecen estas técnicas.

La electroforesis continua, en efecto, aun utilizada con un fin analítico (puede bastar el revelado del borde inferior de la hoja de papel), presenta ventajas sobre la discontinua o típicamente analítica, ya que siempre que se trabaje con un potencial constante el camino recorrido por cada fracción proteínica (o por cualquier sustancia, en general) es recorrido únicamente por esa fracción, de manera que no pueden darse interferencias analíticas.

Estas interferencias, aunque en principio tampoco debían darse en la electroforesis discontinua, el hecho es que siempre queda en el soporte, en general, algún rastro de las sustancias que por él pasaron, puesto que la adsorción no puede evitarse de forma absoluta, y como quiera que las fracciones de mayor movilidad pasan por el mismo camino que han de recorrer parcialmente las menos móviles, la interferencia es posible; un caso típico lo hemos visto al hablar del rastro o adsorción de albúmina, como una de las causas fundamentales de la absorción fondo de luminosidad que, según dijimos, determinaba la necesidad de introducir correcciones en la lectura de fracciones proteínicas, así como el trazado de una línea base de corrección.

Otro caso típico e interesante de estas ventajas se refleja, por ejemplo, en la siguiente aplicación clínica, debida a GIROUD y GANZIN (231), los cuales obtuvieron un serodiagnóstico positivo de rickettsiosis solamente cuando aislaron las gamma-globulinas, mientras que, anteriormente, el suero total no reaccionaba, a pesar de la presencia de anticuerpos; es decir, que el anticuerpo fué desenmascarado por medio de la electroforesis en papel, al quedar anuladas, en la técnica seguida de electroforesis continua las interacciones de cada una de las sustancias con las demás.

(231) GIROUD, P., LE GAC, P., GANZIN, M. y GAILLARD, J. A., *Bull. Soc. Path. Exot.*, 45, 306 (1952).



X

POSIBILIDAD DE UNA TECNICA ELECTROFORETICA CON CORRIENTE ALTERNA SUPERPUESTA A LA CONTINUA

En este capítulo, nos limitaremos solamente a informar, o, más bien, a hacer un adelanto, sobre unos trabajos que tenemos en marcha y que podrán alcanzar un considerable importancia si los resultados definitivos confirman lo previsto. De momento, los resultados iniciales son sumamente alentadores.

ALGUNAS CONSIDERACIONES INICIALES SOBRE EL PROBLEMA

Para nuestro trabajo, partimos del supuesto de que una corriente alterna, actuando superpuesta en un circuito electroforético normal, si bien no debe producir, «per se», migración neta alguna de las partículas electroforizables (iones y moléculas o agregados moleculares con carga) sí que producirá, al menor, una especie de vibración de las mismas, con lo que éstas quedarán como sueltas y en unas condiciones óptimas para la migración electroforética, propiamente dicha, provocada por la corriente continua base.

El que la corriente alterna no produce desplazamiento de las partículas quedó comprobado en tres experimentos de 1, 2 y 3 horas, respectivamente, de paso de corriente alterna, después de las cuales las muestras de proteínas, depositadas en zonas del papel próximas a los extremos sumergidos en el tampón electrolítico, sufrían exactamente el mismo desplazamiento que en tres ensayos paralelos, de la misma duración y restantes condiciones, pero sin paso de corriente, ni alterna ni continua. El despla-

zamiento manifestado en ambos casos se debe a efectos de capilaridad. Las muestras depositadas, en otros experimentos, en el centro del papel (lugar donde se compensan las corrientes de capilaridad) no sufrieron desplazamiento alguno.

El problema, en principio, consiste simplemente en averiguar qué potencial y qué frecuencia de alterna dan mayor efectividad para cada caso, lo que dependerá del tipo de las partículas y, muy especialmente, de sus características estéricas (forma, volumen y peso moleculares, grado de asociación, etc.). Es posible que más adelante podamos deducir relaciones de dependencia entre algunos de estos factores y las características que debe reunir esta corriente alterna superpuesta. Por el momento, hemos de conformarnos con una búsqueda empírica de tales condiciones.

CIRCUITO Y DISPOSICIONES DE TANTEO. ADOPCIÓN DE UN CIRCUITO PROVISIONAL

En este sentido, se han realizado numerosas pruebas, especialmente con proteínas y aminoácidos, para las cuales hemos hecho diversas adaptaciones provisionales de nuestro propio equipo de electroforesis ordinaria (*), habiendo llegado a un circuito bastante satisfactorio, que ha servido de base para nuestros primeros experimentos en firme.

Iniciamos nuestros trabajos con una serie de circuitos y disposiciones de tanteo:

- a) Diseño electroforético normal, en serie con un circuito que estabiliza unos 6 voltios de alterna y permite su superposición.
- b) Disposición anterior, intercalando además un condensador de gran capacidad entre el polo positivo de la cuba electroforética y la fuente.
- c) Aplicación directa, en los electrodos de la célula electroforética, de una tensión de alterna en derivación.
- d) Idem. por intermedio de dos condensadores de $0,05 \mu\text{F}$ (potenciales de alterna aplicados: de 10 a 40 voltios, de 5 en 5, por medio de un divisor de tensiones de tipo potenciométrico).
- e) Idem. con dos condensadores de $0,1 \mu\text{F}$, aplicando también potenciales crecientes de 5 en 5 voltios, dentro de una gama algo más amplia.
- f) Puesta en serie de una inductancia de 0,2-1 henrios, para evitar la filtración de alterna hacia los aparatos de medida de la fuente.

(*) Técnica de DURRUM, con el papel en V invertida; dispositivo de cámara húmeda pequeña y evaporación parcialmente inhibida, etc.

Después de estos ensayos iniciales se adopta un circuito provisional, del cual acompañamos un esquema simplificado (fig. 46).

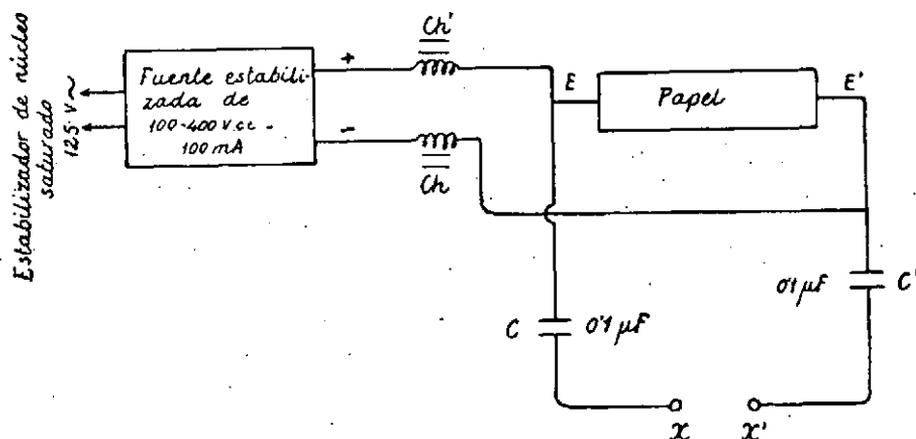


Fig. 46.—Esquema del circuito provisional adoptado para la superposición de corriente alterna

En el mismo, la tensión alterna superpuesta, de valor y frecuencia variables, proviene de un generador convencional de baja frecuencia, al que se ha adaptado un transformador-elevador de tensión, que permite, unido al circuito atenuador del propio generador de B. F., obtener tensiones sinusoidales de 5 a 300 voltios.

Las diferentes tensiones de alterna se midieron con un voltímetro a válvula, intercalado en los puntos X-X', en donde, a su vez, quedaba conectado el generador de B. F.

Los condensadores de C y C', de 0,1 μ F, tienen por objeto bloquear la tensión de continua que pudiera llegar al generador de B. F. y, al mismo tiempo, no modificar la resistencia de carga a la corriente continua entre los electrodos E y E'.

A su vez, se han intercalado unos «choques» o inductancias, Ch y Ch', para impedir el paso de corriente alterna a la fuente estabilizada de continua.

Se han realizado numerosos ensayos con diferentes tensiones y frecuencias, comprendidas éstas entre los 5 y 100 ciclos/segundo. Los resultados, aunque no podemos considerarlos todavía definitivos, son, a nuestro modo de ver, bastante esperanzadores, toda vez que los desplazamientos de las seroproteínas en los casos en que ha actuado un potencial de alterna (de 40 a 75 voltios) superpuesto al fundamental de continua (de 200 a 350 voltios) son desde un 6 a un 16 % mayores que los correspondientes a experimentos realizados en igualdad de condiciones, pero sin actuación de alterna. Esto no parece ser puramente casual, ya que las mayores

diferencias de desplazamiento encontradas en los electroforegramas corrientes, para unas mismas condiciones, corresponden a menos de un 3 %.

INTENTO DE ACTIVACIÓN DE PARTÍCULAS, PREVIO AL PASO DE CORRIENTE CONTINUA

Hemos estudiado también la aportación que a la marcha general de los procesos supone el mantener *inicialmente* una tensión de alterna, antes de comenzar el proceso de corriente continua, con objeto de observar el efecto que llamamos «de vibrado» de las grandes moléculas. Los resultados de esta acción aislada de alterna, previa al paso de continua, o de continua y alterna simultánea, son, al parecer, nulos o, al menos, poco ostensibles. Por lo tanto, esta nulidad de acción de la corriente alterna en el desplazamiento de partículas, que tomamos anteriormente como supuesto inicial, sigue confirmándose en estos nuevos experimentos, en los que pretendíamos observar si la corriente alterna actuaba al menos como preparadora para el proceso electroforético posterior. En consecuencia, hemos de admitir que las mejoras que se observan en los electroforegramas obtenidos por uso de la superposición de una corriente alterna a la continua base, es fruto de una acción sinérgica de las tensiones de una y otra, algo así como si el «vibrado» o «activación» de las partículas electroforéticas, durase tiempos tan cortos que sólo la actuación simultánea de la tensión de continua, realmente transportadora, hiciese esto posible.

CONSIDERACIONES SOBRE LOS EXPERIMENTOS DE MACH Y GEFFERT CON CORRIENTES PULSANTES

Podemos hacer constar que, revisada la bibliografía, no hemos encontrado referencia alguna sobre el uso de corriente alterna en los procesos electroforéticos, si bien creemos oportuno informar, igualmente, sobre una cuestión suscitada por DURRUM en una de las discusiones del Symposium de Londres sobre electroforesis (1956) (232), conocida recientemente por nosotros, y en la que se habla de algunas experiencias de MACH y GEFFERT (233) con corriente continua pulsante de alta frecuencia (80 kilociclos), condiciones que, realmente, nada tienen que ver con las de nuestro caso de superposición de alterna de B.F. manteniendo en su integridad la continua fundamental, pero que referimos aquí, para descartar la posible similitud de efectos en que a primera vista pudieran pensarse.

(232) DURRUM, E. L., *Ciba Symp.* 1956, pág. 119.

(233) MACH, W. y GEFFERT, R., *Arzneimittelforschung*, 3, 534 (1953).



Por nuestra parte, también tenemos en estudio, y ya hemos realizado algunos ensayos, sobre la utilización de corrientes pulsantes de onda cuadrada y diente de sierra (fig. 47), con posibilidad de variar los espacios de tensión cero, pero manteniendo siempre el criterio de no prescindir de la corriente continua base. Este tipo de corrientes nos permitiría utilizar grandes voltajes con manifiesta disminución de efectos térmicos, con tal de incrementar adecuadamente los tiempos de tensión cero. Nuestro criterio exige, además, que dichas corrientes sean de B. F., ya que estimamos que el período crítico de resonancia de las partículas electroforéticas, como tales, no hay que buscarlo precisamente en las altas frecuencias.

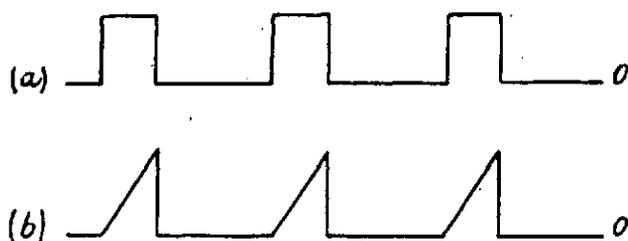


Fig. 47.—Corrientes pulsantes de onda cuadrada (a) y diente de sierra (b)

En el caso de los experimentos de MACH y GEFFERT, realizados a altos potenciales y altas frecuencias de corriente pulsante, cabe pensar, que las ventajas propugnadas por los autores no pueden derivar de la segunda condición, ya que estas frecuencias tan elevadas provocarían, en definitiva, la misma respuesta de las partículas que si actuaran sobre ellas corrientes continuas puras. En cambio, en cuanto a voltaje, pensamos que, al ser éste pulsante y con un tiempo de potencial cero diez veces superior al tiempo de actuación, es fácil que, en efecto, se logren mejoras sobre lo que se conseguiría con un potencial constante diez veces inferior, aun cuando la mayoría de los autores no hayan podido reproducir los experimentos. Es posible que este fallo se deba fundamentalmente a la aplicación de altos potenciales sin respetar debidamente los tiempos de tensión cero, o bien, al uso de elevadas intensidades de corriente, olvidando, en ambos casos, los efectos retardantes secundarios a que puede dar lugar el calor desarrollado.

PLAN DE TRABAJO PARA EL DESARROLLO DE NUESTRA TÉCNICA

Volvemos a destacar que esta línea de trabajo con corrientes pulsantes entra también en nuestros planes de trabajo, pero dándole enfoque desde otros puntos de vista, como son: a) el de aplicación simultánea de

estas corrientes pulsantes a otras corrientes base; b) el que ellas constituyan la corriente base y en superposición una alterna; c) el que sean base y, en superposición, otra pulsante de distinta frecuencia o voltaje; d) el estudio de su acción exclusiva, pero siempre dentro del orden de las bajas frecuencias, aunque tengamos que trabajar con tiempos menores de tensión cero.

No obstante lo expuesto, por faltarnos una sistemática completa de todos los ensayos y por no tener el suficiente número de experimentos, no sentamos criterios definitivos que pudieran más tarde ser modificados por una labor posterior.

APENDICE EXPERIMENTAL

Como ya se justificó en la Introducción a esta Memoria, resulta poco conveniente, según nuestro criterio, el hacer en este caso una separación material y taxativa entre lo que pudiera llamarse parte teórica y parte experimental. Por ello, se han tratado simultáneamente ambos aspectos. No obstante, en este Apéndice, se recogen algunos datos que, con carácter complementario, añaden ciertos detalles sobre las técnicas y condiciones experimentales adoptadas, así como sobre la marcha seguida en la interpretación de los resultados. Llamamos la atención sobre este último punto, ya que, con frecuencia, en las publicaciones que tratan de esta materia, se prescinde de estas explicaciones, con las consiguientes dudas para el lector.

NOTA GENERAL SOBRE LOS EXPERIMENTOS REALIZADOS

Se han realizado aproximadamente 700 electroforegramas con diversos fines. Entre aquellos electroforegramas se han seleccionado unos 150, a muchos de los cuales se ha ido haciendo referencia en la parte general, en la que frecuentemente se han reunido en tablas para explicar algunos de los diversos fenómenos y factores estudiados; en otros casos, las referencias se hacen a parejas o grupos reducidos de experimentos. A continuación referimos, en forma ordenada, los principales puntos experimentales tratados en esta Memoria:

- 1) Sobre la determinación del factor de corrección $1/I'$ para el cálculo de movilidades reales en el papel. (Véase Tabla 2).
- 2) Determinación de las movilidades reales de las distintas fracciones

proteínicas del suero humano en la electroforesis sobre papel. (Véase Tabla 3).

3) Sobre la heterogeneidad de la albúmina desnaturalizada y manifestación del fenómeno en la electroforesis sobre papel.

4) Obtención y comparación del proteinograma y lipoproteinograma humanos.

5) Sobre la influencia de la porosidad del papel en la migración electroforética de partículas. (Véase Tablas 4 y 5).

6) Sobre la metilación del papel electroforético y determinación posterior de metoxilo en el mismo.

7) Comprobación de la eficacia electroforética de la metilación del papel.

8) Sobre las causas del aumento de conductividad del papel, observado durante el proceso electroforético. (Véase Tabla 6).

9) Conductividad, grado de humedad del papel y porosidad. (Véase Tablas 7 y 9).

10) Anchura del papel e intensidad de corriente. (Véase Tablas 10 y 11).

11) Medidas de la intensidad del campo creado sobre el papel. (Véase Tabla 12).

12) Sobre la longitud del papel y el suministro de tampón. (Véase Tablas 14, 15 y 16).

13) Sobre el potencial y tiempo como factores preponderantes en el proceso electroforético. Diagramas longitud de espectro-tiempo y longitud de espectro-potencial. (Véase Figs. 4-5 y 6-7).

14) Efecto de temperatura. Diagramas longitud de espectro-tiempo, a distintas temperaturas. (Véase Fig. 8).

15) Sobre el efecto de la composición química y del pH del sistema tampón, en la separación electroforética de seroproteínas. (Véase Tablas 18 y 19).

16) Relaciones experimentales pH/pI, para el caso de diferentes aminoácidos con tampón de ftalato ácido de potasio/hidróxido sódico, de pH 5,9.

17) Sobre las causas y efectos de la electroósmosis en la electroforesis en papel. (Véase Tabla 20).

18) Comprobación experimental de las corrientes electroosmótica y de evaporación.

19) Sobre la distribución de solutos y grado de humedad en el papel.

20) Sobre las corrientes de evaporación: comprobación con azúcares, aminoácidos y proteínas.

21) Concurrencia de factores en la producción de corrientes líquidas.

22) Sobre la distribución de tampón en el papel, a partir de medidas de conductividad. Sus relaciones con la evaporación.

23) Sobre la distribución de agua a lo largo de la tira de papel. Determinación de sus variaciones absolutas con el reactivo KARL FISCHER.

24) Medidas sobre los efectos de electroósmosis y evaporación combinados. Factor electroosmótico.

25) Comparación de los resultados obtenidos con diversos indicadores electroosmóticos. Utilidad de la maltosa, inulina y almidón. (Véase Tabla 22).

26) Medidas para el estudio del flujo transversal de líquido en la tira de papel.

27) Sobre el efecto de borde. Intento de corrección en diversas técnicas.

28) Aditivos no polares al tampón y evaporación.

29) Dispositivo y técnica adoptados para la electroforesis discontinua.

30) Influencia del secado previo en la tinción de seroproteínas con azul de bromofenol.

31) Técnica utilizada para la tinción de proteínas con azul de bromofenol.

32) Comprobación de la influencia del pH y de la concentración salina del baño de tinción de azul de bromofenol sobre los resultados cuantitativos de la electroforesis de seroproteínas.

33) Comprobación de los efectos del calentamiento desigual y diferencias de rugosidad en las dos caras del papel, sobre la tinción de proteínas.

34) Sobre la retención del colorante por las proteínas.

35) Sobre las técnicas de revelado de aminoácidos, grasas y lipoides, glucoproteínas y azúcares.

36) Estudio de posibles transparentantes de electroforegramas en la fotometría directa de los mismos.

37) Ejemplo práctico de obtención de un electroforegrama y de su correspondiente proteinograma densitométrico directo. Valoración de éste último.

38) Sobre la técnica de fotometría tras elución.

39) Comprobación experimental de la ley de BEER sobre eluidos de proteínas teñidas con azul de bromofenol. Determinación de los límites máximo y mínimo de muestra de suero aconsejables.

40) Método propuesto para la representación gráfica, mediante proteinogramas convencionales, de los resultados cuantitativos obtenidos por elución. Un ejemplo práctico.

- 41) Determinación de la proteinemia total de un suero por dosificación del N según KJELDAHL.
- 42) Sobre la disposición y condiciones adoptadas en la electroforesis continua preparativa.
- 43) Estudio experimental de la distribución de potenciales, para dispositivos diversos de electroforesis continua. Representación gráfica de resultados.
- 44) Ensayos prácticos de separación de aminoácidos y de seroproteínas.
- 45) Sobre las caídas de potencial independientes del soporte.
- 46) Sobre los ensayos de modificación de la componente de descenso.
- 47) Propuesta de algunos dispositivos de electroforesis continua, para separación de materiales, desde pequeña a gran escala.
- 48) Ensayos de superposición de corriente alterna, a la continua fundamental, en los procesos electroforéticos.

Los grupos de experimentos en que se basa cada una de estas cuestiones han sido descrito, en general con suficiente detalle, a todo lo largo de la primera parte; no obstante, consideramos conveniente ampliar los que corresponden a los apartados 1), 2), 3), 4), 6), 7), 13), 14), 22), 23), 25), 32), 37), 39), 41), 43), ya sea para fijar mejor las condiciones de trabajo utilizadas, ya para explicar la marcha y criterio seguidos en la interpretación de resultados.

1) *Determinación del factor de corrección l/l' para el cálculo de movilidades reales en el papel*

El factor de corrección se ha calculado tomando como base la movilidad de la albúmina de suero humano en la electroforesis libre (valor adoptado para la misma: $6,43 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ seg}^{-1} \text{ vol}^{-1}$) así como su desplazamiento aparente en el papel. La técnica electroforética utilizada ha sido la de papel en forma de V invertida (técnica de DURRUM) y evaporación parcialmente inhibida.

Sobre 4 electroforegramas (experimentos núms. 2, 4, 6 y 7) de seroproteínas, tomados al azar entre una serie de 10 realizados con este fin, con tampón de veronal de pH 8,6 (*) y papel Archés n.º 301 (dimensiones:

(*) La composición de este tampón es la siguiente: 1,84 g de veronal (ácido dietil barbitúrico) + 10,30 g de veronal sódico (dietil barbiturato sódico) disueltos en un volumen total de 1 litro, a lo que corresponden, respectivamente, las concentraciones 0,01 M y 0,05 M. Conocidas las molaridades, y considerando además que el veronal sólo disocia un H^+ y que su sal sódica es monosustituida, podremos calcular fácilmente la fuerza iónica de esta disolución, valiéndonos de la fórmula (V-5) que para este caso concreto daría el siguiente valor:

$$\mu = \frac{1}{2} (0,01 \times 1^2 + 0,01 \times 1^2 + 0,05 \times 1^2 + 0,05 \times 1^2) = 0,06$$

6 × 25 cm; diferencia de potencial: 300 voltios; tiempo: 3 horas), y sobre otros cuatro realizados con Whatman n.º 1 (dimensiones: 4 × 27 cm) diferencial de potencial: 300 voltios; tiempo: 3 horas), seleccionados de la misma manera entre el mismo número de experimentos, se procedió al cálculo de factores de corrección para estas dos clases de papel, y al de las movilidades reales de la seroalbúmina humana.

Factor de corrección: A partir de la fórmula (III-7), se deduce la siguiente, que nos ha de servir para el cálculo directo del factor :

$$\frac{1}{1'} = \frac{d \ s' \ k}{u \ t \ I}$$

y sustituyendo en la misma los valores experimentales medidos sobre los electrofoigramas referidos, que se recogen en la Tabla I, se obtienen los resultados que figuran en ella.

T A B L A I

Clase de papel	d (*) cm	s' (**) cm ²	k.10 ⁴ (***) Ω ⁻¹ cm ⁻¹	u.10 ³ cm ² / /seg. vol.	t seg.	I.10 ³ Amp/ cm	1/1'	1/1' medio
Archés 301	7,00	0,14	8,11	6,43	10800	1,26	0,91	} 0,92 ± 0,02
«	7,20	0,14	8,11	6,43	10800	1,26	0,93	
«	6,90	0,14	8,11	6,43	10800	1,26	0,90	
«	7,00	0,14	8,11	6,43	10800	1,25	0,92	
Whatman n.º 1	5,00	0,103	8,11	6,43	10800	0,73	0,82	} 0,83 ± 0,03
«	5,05	0,103	8,11	6,43	10800	0,75	0,81	
«	5,00	0,103	8,11	6,43	10800	0,70	0,86	
«	5,05	0,103	8,11	6,43	10800	0,73	0,83	

(*) El valor *d* representa la distancia aparente recorrida por la albúmina en el papel, una vez hecha la corrección electroosmótica por adición del valor del desplazamiento catódico observado para el dextrano, que se depositó en una pista paralela a la del suero.

(**) El valor de la sección transversal útil *s'* se determinó, en ambos casos, dividiendo la diferencia entre el peso de la tira de papel, recién terminada la electroforesis, y el peso de la misma antes de mojarla en el tampón (peso de tampón embebido) por la densidad de éste (1,003) y por la longitud de cada una de las tiras en cuestión. De esta manera, el valor de *s'* obtenido representa un valor medio, en estas condiciones, de las diversas secciones transversales a lo largo de la tira de papel.

(***) *k* se ha calculado a partir de la resistencia medida con el puente de conductividad Philips GM 4249/01 y célula de inmersión GM 4221. Multiplicando esta resistencia por la constante de calibrado de la célula (1,37) obtenemos la resistencia específica, cuyo valor inverso es la conductividad específica *k*, que figura en la tabla.

Movilidad aparente: Teniendo en cuenta que el cálculo de la movilidad aparente en el papel ha de ser previo al cálculo de la movilidad real (movilidad real igual a movilidad aparente dividida por el cuadrado del



factor de corrección) determinamos aquélla por medio de la fórmula (II-4):

$$u_a = \frac{d l}{t V}$$

Recogemos a continuación (Tabla II) los valores experimentales de las magnitudes que intervienen en el segundo miembro, así como el valor de u_a calculado para cada caso, y, por último, los valores medios de esta magnitud, tanto para el papel Archés 301 como para el Whatman n.º 1.

TABLA II

Clase de papel	d(*) cm	l(**) cm	t seg.	V (***) vol	$u_a \cdot 10^5$ cm ² / seg. vol	u_a media $\cdot 10^5$ cm ² / seg. vol
Archés n.º 3	7,00	23,0	10800	290	5,14	} 5,16 ± 0,13
»	7,20	23,0	10800	290	5,29	
»	6,90	23,0	10800	290	5,07	
»	7,00	23,0	10800	290	5,14	
Whatman n.º 1	5,00	25,5	10800	280	4,22	} 4,24 ± 0,02
»	5,05	25,5	10800	280	4,26	
»	5,00	25,5	10800	280	4,22	
»	5,05	25,5	10800	280	4,26	

Movilidad real o corregida: El cálculo de la movilidad real o corregida, u_c , conociendo la aparente, u_a , y el factor de corrección, l/V , consiste en la aplicación directa de la fórmula siguiente, cuya deducción vimos en el capítulo tercero:

$$u_c = \frac{u_a}{\left(\frac{l}{V}\right)^2}$$

En la Tabla III se resumen los resultados finales del cálculo.

(*) d tiene, en este caso, el mismo significado, y, naturalmente, el mismo valor que el dado anteriormente para cada electroforegrama

(**) El valor asignado a l se refiere a la longitud libre, aparente, del papel, es decir, a la porción no sumergida que queda entre las líneas de contacto del papel con el tampón de los depósitos electródicos (distancia interelectródica).

(***) El valor de V representa, en cada caso, la diferencia de potencial medida directamente entre las dos zonas más extremas que emergen del papel, es decir, entre los puntos más distantes que determinan l . En estas medidas se observa una pequeña caída de potencial con respecto a la lectura hecha directamente sobre los electrodos.

TABLA III

Clase de papel	$1/l^1$	$(1/l)^2$	$u_c \cdot 10^5 (*)$	u_c media $\cdot 10^5$
Archés n.º 301	0,91	0,8281	6,23	} $6,17 \pm 0,10$
»	0,93	0,8649	6,12	
»	0,90	0,8100	6,26	
»	0,92	0,8464	6,07	
Whatman n.º 1	0,82	0,6724	6,27	} $6,16 \pm 0,45$
»	0,81	0,6561	6,49	
»	0,86	0,7396	5,71	
»	0,83	0,6889	6,18	

(*) Los valores de las movilidades vienen expresados, como en el caso anterior, en $\text{cm}^2/\text{seg. vol.}$

2) *Determinación de las movilidades reales de la distintas fracciones proteínicas del suero humano, en la electroforesis sobre papel.*

Para la determinación, sobre papel, de las movilidades de las diversas fracciones proteínicas de un suero se siguió el mismo procedimiento utilizado en el caso anterior para la movilidad de la albúmina, si bien para la determinación del factor, se tomó, en este caso, el valor $5,94 \cdot 10^{-6}$ como movilidad tipo de esta fracción (en lugar del $6,43 \cdot 10^{-5}$ utilizado anteriormente), la razón de habernos basado en este valor, encontrado por DOLE en la electroforesis libre, se debe a que tal valor se corresponde con los de las restantes fracciones proteínicas encontrados por este autor siguiendo el mismo procedimiento, valores que tomamos como de referencia para la comprobación de los obtenidos por nosotros en la electroforesis sobre papel. Por esto, el valor del factor de corrección diferirá ligeramente del que se calculó en el caso anterior, para la misma clase de papel. (Archés n.º 301).

Las determinaciones se hicieron sobre 3 electroforegramas distintos, de papel Archés 301 (6×25 cm; 300 voltios; 3 horas) en los que se logró la perfecta separación de cinco fracciones proteínicas del suero humano: albúmina y globulinas α_1 , α_2 y β , por un lado, todas desplazadas hacia el ánodo, y la γ -globulina, por otro, desplazada hacia el cátodo. El sistema tampón y las restantes condiciones de los experimentos fueron los mismos de las determinaciones anteriores. Las advertencias y explicaciones que se han hecho en aquel lugar, sobre las distintas magnitudes que intervienen en el cálculo, siguen teniendo validez en este caso.

Cálculo del factor de corrección: El factor de corrección, como se ha indicado, se calculó, al igual que en el caso anterior, a partir de los datos que suministra el desplazamiento aparente de la albúmina en el papel y su movilidad en la electroforesis libre. El mismo valor se habría obtenido, no obstante, si la determinación se hubiese hecho con cualquier otra fracción proteínica. En la Tabla IV se recogen los datos y resultados de la determinación.

TABLA IV

d cm	s' cm ²	k.14 ⁴ Ω ⁻¹ cm ⁻¹	u.10 ⁵ cm ² / seg.vol	t seg.	I.10 ³ Amp/cm	1/l'	1/l' medio
7,00	0,14	8,11	5,94	10800	1,26	0,98	} 0,98 ± 0,00
7,05	0,14	8,11	5,94	10800	1,27	0,98	
7,00	0,14	8,11	5,94	10800	1,27	0,98	

Movilidad real o corregida: Conocido el factor de corrección (0,98) el cálculo de la movilidad es también idéntico al del caso anterior para la albúmina. En la Tabla V se esquematiza dicho cálculo.

TABLA V

Fración electroforé- tica	d cm	l cm	t seg	V vol	u _a .10 ⁵	u _c .10 ⁵ cm ² /seg.vol	u _c media.10 ⁵
Albúmina	7,00	23	10800	290	5,14	5,35	} 5,36±0,03
•	7,05	23	10800	290	5,18	5,39	
•	7,00	23	10800	290	5,14	5,35	
Glob. α ₁	5,73	23	10800	290	4,21	4,38	} 4,39±0,02
•	5,77	23	10800	290	4,24	4,41	
•	5,74	23	10800	290	4,22	4,39	
Glob. α ₂	3,60	23	10800	290	2,64	2,75	} 2,76±0,03
•	3,65	23	10800	290	2,68	2,79	
•	3,60	23	10800	290	2,64	2,75	
Glob. β	3,00	23	10800	290	2,20	2,29	} 2,33±0,04
•	3,10	23	10800	290	2,28	2,37	
•	3,05	23	10800	290	2,24	2,33	
Glob. γ (*)	0,75	23	10800	290	0,55	0,57	} 0,57±0,01
•	0,75	23	10800	290	0,55	0,57	
•	0,73	23	10800	290	0,54	0,54	

(*) La corrección de la electroósmosis para la γ-globulina se hizo restando al desplazamiento electroosmótico aparente del dextrano, el desplazamiento también aparente observado para dicha globulina.

3) *Heterogeneidad de la albúmina desnaturalizada*

La albúmina del experimento correspondía a la fracción de una mezcla de tres sueros humanos, normales, separada personalmente por medio de la técnica de electroforesis continua. El contenido del tubito en el que se recogió la albúmina junto con el tampón (4 cc) se encontró a vacío, hasta un volumen aproximadamente mitad (1,8 cc), y del concentrado se separó una parte alícuota que se calentó en estufa a 85-90° C durante 10 minutos. Sobre una tira de papel Archés 301 (6 × 25 cm), en la que se había dibujado doble pista, se depositó, sobre una de ellas, una muestra del primitivo residuo del concentrado a vacío, y, sobre la otra, del obtenido después del calentamiento, sometiendo entonces la tira al proceso de electroforesis analítica.

El tampón utilizado, tanto en la electroforesis continua como en la posterior analítica, fué el de veronal/veronal sódico, de pH 8,6 y fuerza iónica 0,06. Las restantes condiciones de la electroforesis analítica fueron 300 voltios y 3 horas. El secado de la tira de papel se realizó, en estufa, a 105° C durante 5 minutos. Para la tinción se utilizó el azul de bromofenol (véase preparación y utilización).

Frente a la homogeneidad electroforética de la primera muestra de suero se demuestra la heterogeneidad de la segunda, consecuencia de su desnaturalización por el calor.

4) *Obtención y comparación del proteinograma y lipoproteinograma humanos.*

La comparación del lipoproteinograma de suero humano con el proteinograma, propiamente dicho, comprueba el carácter de lipoproteínas de las seroglobulinas alfa y beta.

Material de experimentación: suero humano ligeramente hiperbeta-globulinémico.

Soporte del medio: papel Archés 301, 6 × 27 cm, en el centro del cual se deposita, en forma de estría alargada transversalmente y lo más uniforme posible, una muestra de 0,02 cc de suero, con una micropipeta del tipo de las que utilizamos en las determinaciones en que interesa hallar valores absolutos.

Condiciones del experimento: 200 voltios, 3 horas, 4-5,3 mA.

Terminado el proceso electroforético, se secó la tira durante 10 minutos a 105° C y, entonces, cortamos dicha tira longitudinalmente por la mitad, revelando una de dichas mitades con azul de bromofenol, según nuestra técnica más usual de tinción de proteínas, ya descrita, y la otra

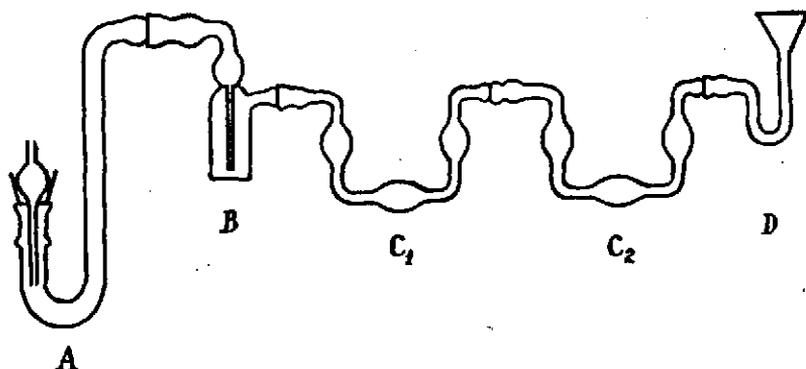
con Sudán III, preparado en la forma que indicamos también en la parte general para revelar lípidos. La obtención del proteíno y lipoproteinograma se hizo, finalmente, por lectura densitométrica directa, utilizando como transparentante la mezcla de aceite de parafina y α -bromo naftaleno a partes iguales. El resultado puede observarse en la parte primera de este trabajo. (Fig. 3)

6) *Metilación suave del papel.*

Se siguió una modificación del procedimiento debido a W. N. HAWORTH y otros, según la siguiente marcha: cinco tiras de papel Archés 301 (peso total = 9 g) se mantienen sumergidas en 600 cc de disolución de hidróxido sódico al 30 % durante 4 horas, después de las cuales se agregan 120 cc de dioxano, y manteniendo la mezcla a 40° C, se añaden otros 20 cc de sulfato de metilo en 10 porciones, de 20 en 20 minutos. Terminada esta operación se mantiene el conjunto una hora más a aquella temperatura, con agitación, y después se añade agua hirviendo, procurando que el total se mantenga a 95-100° C durante 30 minutos. Se separa el papel ya metilado, se lava con agua caliente y se deja secar.

Una nueva metilación de otras cinco tiras de papel se llevó a cabo mediante una marcha exactamente igual, pero utilizando tetrahidrofurano en lugar de dioxano. El resultado práctico es el mismo con uno y otro disolvente.

Determinación de metoxilo en el papel metilado: Se siguió una modificación del método de VIEBOCK, según A. SOLER y A. CARRASCO (véase parte general), cuyo dispositivo experimental se esquematiza en la figura adjunta.



En primer lugar, se carga el frasco lavador B con 3 cc de una suspensión en agua de unos 0,150 g de fósforo rojo, previamente purificado con

amoníaco (debe cuidarse que no penetre el líquido de B en el tubo de comunicación). En el colector C_1 se ponen 10 cc de disolución al 10 % de acetato sódico en ácido acético, se añaden de 10 a 12 gotas de bromo y, una vez que se ha mezclado bien, se pasa una tercera parte de este líquido de absorción al otro colector C_2 . Para evitar posibles derrames del líquido de los colectores, se enlaza el segundo a un tubo de seguridad D. Por otro lado se prepara un aparato de Kipp en el que, a partir de un mármol puro, se genera anhídrido carbónico que pasa a un frasco lavador lleno de disolución diluída de acetato de plomo y de aquí, mediante un tubo de goma con una pinza de tornillo de precisión, al tubo de digestión, A, del aparato de determinación de metoxilo. La corriente de CO_2 se mantiene durante toda la determinación. En esta parte del aparato últimamente citada, se introdujeron, en operaciones sucesivas, muestras de 0,0232 g, 0,0255 g y 0,0249 g de papel metilado, correspondientes a las tres determinaciones que se llevaron a cabo, añadiendo a cada una unos cristallitos de fenol, 0,5 cc de anhídrido acético (también puede utilizarse ácido acético glacial) y por último 0,2 g de fósforo rojo. Después de unir el tubo A, así dispuesto, al generador de carbónico, se vierten en él 2 cc de ácido iodhídrico (densidad = 1,7) recientemente destilado. Inmediatamente se une al resto del aparato. El ataque propiamente dicho se inicia por calentamiento de la porción inferior del correspondiente tubo de digestión, en un baño de *Rhodorsil* (una silicona comercial) mantenido a 140-150° C durante toda la operación (conviene controlar perfectamente este intervalo de temperatura, que es el más adecuado), evitando, al mismo tiempo, el calentamiento de la rama larga del tubo de digestión por medio de una placa de amianto con dos orificios por los que pasan las ramas del tubo; de esta manera, la citada rama larga permite el reflujo total de iodhídrico. También es fundamental conseguir la regularización de la corriente de carbónico (burbujeo lento y uniforme), aunque una vez que el iodhídrico ha comenzado a hervir se restablece por sí sola la velocidad de la corriente gaseosa. Al cabo de una hora de calentamiento, tiempo para el cual se tiene seguridad de que todo el ioduro de metilo formado ha sido arrastrado al colector C_1 , se desconecta el tubo en U, primero del colector, y después del aparato de Kipp. El contenido de los colectores se pasa, junto con las aguas de lavado de los mismos a un erlenmeyer de 250 cc en el que previamente se han disuelto 1,5 g de acetato sódico puro en un poco de agua. Cuando con las aguas de lavado se completaron unos 150 cc, se agregaron unas gotas de ácido fórmico, con lo que al agitar el erlenmeyer desapareció el color del bromo en exceso, debido a su reducción a bromhídrico. Después de añadir 1 g de ioduro potásico se valoró el iodo separado con disolución

0,1 N de tiosulfato sódico, de factor 1,052 en un caso y 0,9884 en los restantes, consumiéndose; para cada caso, las cantidades que, junto con los demás datos de las determinaciones, reunidos en la tabla VI, y que, conociendo la equivalencia disolución de tiosulfato/metoxilo (1 cc de disolución 0,1 N de tiosulfato equivale a 0,51706 mg de OCH_3) nos dan un contenido medio en OCH_3 del 0,316 %.

TABLA VI

Peso de muestra mg	$\text{S}_2\text{O}_3\text{Na}_2$ consumido cc	Factor del $\text{S}_2\text{O}_3\text{Na}_2$	% OCH_3
23,2	0,140	1.0520	0,328
25,5	0,150	0,9884	0,301
24,9	0,155	0,9884	0,318

7) Comprobación de la eficacia de la metilación del papel

Se compararon los resultados que proporcionan los eluidos del colorante fijado en la tinción, por las distintas fracciones proteínicas de un suero humano (eminentemente hipergammaglobulinémico), que se separaron en 3 electroforegramas realizados sobre papel Archés n.º 301 no metilado, con aquellos otros resultados que se obtuvieron a partir de otros 3 electroforegramas realizados en igualdad de condiciones, pero utilizando papel Archés 301 metilado (0,316 % de metoxilo) procedente de la operación anterior.

Los electroforegramas, tanto los de papel metilado como los de sin metilar, se realizaron con tampón de veronal/veronal sódico de pH 8,6; diferencia de potencial, 250 voltios; tiempo, 3 horas; dimensiones del papel, 4 × 27 cm. Tinción con azul de bromofenol. Elución del colorante fijado con solución de carbonato sódico al 5 % en metanol de 50°, durante 2 horas. Los eluidos de las distintas fracciones se valoran por fotolorimetría (*). Los resultados medios de los distintos valores porcentuales de las fracciones proteínicas, separadas sobre uno y otro papel, se dan en la Tabla VII.

De la comparación de estos resultados, concluimos, provisionalmente, que la influencia de la metilación, al menos en el grado por nosotros alcanzado, es prácticamente nula sobre los resultados, aunque también cabe deducir, de los mismos, y nos parece lo más probable, que la adsorción supuesta para un papel normal, a consecuencia de grupos activos, es des-

(*) Fotolorímetro de filtros Probuss-Arnou. Longitud de onda media utilizada, 605 m μ .

preciable, ya que comprobada en nuestro caso la realidad de la metilación, que habrá afectado fundamentalmente a los hipotéticos grupos carboxilo, aparte de a otros más inertes, no se aprecia, en cambio, un efecto medible.

TABLA VII

PAPEL	Valores porcentuales				
	Albúmina	Glob. α_1	Glob. α_2	Glob. β	Glob. γ
No metilado	44,8 \pm 0,05	3,22 \pm 0,03	8,03 \pm 0,06	10,27 \pm 0,03	33,50 \pm 0,04
Metilado	45,32 \pm 0,04	3,03 \pm 0,03	7,91 \pm 0,05	10,50 \pm 0,02	33,12 \pm 0,03

Si la metilación hubiese impedido una adsorción realmente existente, no hay duda de que los porcentajes de las fracciones proteínicas aparecerían incrementados en sentido decreciente, desde el que corresponde a la fracción más rápida (mayor movilidad electroforética) hasta la más lenta. Esta última y quizás alguna de las siguientes podrían mostrar valores incluso inferiores a los obtenidos con papel sin metilar, puesto que, en principio, los resultados, en este último caso, podrían venir falseados por la contribución a los mismos de aquellas porciones retenidas por adsorción.

13) *Diagramas longitud de espectro-tiempo y longitud de espectro-potencial.* (Véase Figs. 4-5 y 6-7)

Utilizando suero sanguíneo, tampón de veronal/veronal sódico de pH 8,6 y papel Archés 301, de dimensiones 6 x 27 cm y revelando el espectro proteínico con azul de bromofenol, se realizaron 7 series de 5 experimentos cada una, destinadas al estudio de los factores indicados. Los experimentos de cada serie se realizaron a un mismo potencial, pero a tiempos diferentes, con lo cual se obtienen valores distintos para la variable longitud de espectro. Como se aprecia en las Tablas VIII y IX, en las que se resumen los resultados de tales experimentos, se ha procurado que los de cada serie sean, en lo posible, correlacionables en el tiempo.

A partir de los datos y resultados de las Tablas VIII y IX se han podido construir las gráficas de las figuras 4 y 5 y 6 y 7, cuyo estudio se

TABLA VIII

Potencial volt.	Tiempo mín.	Long. espect. cm
100	60	0,8
»	120	1,6
»	180	2,5
»	250	3,5
»	300	4,2
200	60	1,9
»	120	3,9
»	180	5,55
»	235	6,4
»	300	6,7
300	60	2,5
»	120	5,0
»	190	5,8
»	240	5,9
»	300	5,9A
400	65	3,2
»	135	4,5
»	188	4,9
»	240	4,9
»	300	4,8

TABLA IX

Potencial volt	Tiempo mín.	Long. espect. cm
100	60	0,8
»	120	1,6
»	180	2,5
»	250	3,5
»	300	4,2
150	60	1,5
»	125	3,0
»	180	4,5
»	240	5,6
»	300	6,5
250	60	2,1
»	130	4,3
»	185	5,4
»	245	6,1
»	300	6,3
350	60	2,9
»	120	5,0
»	185	5,5
»	240	5,61
»	300	5,5

hizo en aquel lugar. Estas gráficas y las deducciones que de su oficio se desprenden, equivalen, como se comprende fácilmente, a las que se obtendrían considerando la intensidad de campo en vez del potencial, toda vez que la distancia interelectrónica es la misma en todos los casos.

14) *Efecto de temperatura. Diagramas longitud de espectro-tiempo, a distintas temperaturas.* (Véase Fig. 8).

Se construyeron a partir de los datos y resultados de 2 series de 5 experimentos cada una. Los experimentos se realizaron todos a 250 voltios, diferenciándose entre sí, los de cada serie, en el tiempo; los correspondientes a una de ellas se realizaron a 50° C y los de la otra a unos 25° C. La temperatura de 5° C en la cámara electroforética se consiguió por refrigeración líquida, haciendo uso de una especie de funda de doble pa-

red, construída en cinc, que se adaptaba perfectamente a la pequeña cámara húmeda de nuestro aparato; la refrigeración se logra con una mezcla de agua de hielo y agua corriente, cuya temperatura se controla a intervalos de 15 minutos. La temperatura de 25° C se consigue, de manera semejante, con agua a esta temperatura. Los demás detalles de técnica fueron los mismos que en el caso anterior (en ambos, la disposición del papel fué en forma de V invertida).

En la Tabla X se recogen los resultados correspondientes a las curvas de la figura 8.

TABLA X

Temperatura °C	Tiempo min	Long. espectro cm
25	60	2,2
»	120	4,2
»	180	5,35
»	240	6,2
»	300	6,3
5-6	60	1,1
»	126	2,3
»	180	3,2
»	240	4,3
»	300	5,0

22) Medidas de conductividad sobre el electroforegrama.

Sobre tiras de papel Whatman n.º 1, de 4 × 27 cm, se señalan, a lápiz, previamente al proceso electroforético, nueve bandas transversales sobre cada vertiente del papel (disposición en V invertida), de 0,5 cm de anchura cada una y con una separación entre sí de 1 cm. Después de 1^h 30^m, a 300 vol. se seca el papel a calor suave durante un tiempo muy prolongado (10 horas), para lograr uniformidad de desecación. Se procede a cortar las bandas y se someten a extracción con 20 cc de agua destilada cada una, durante 4 horas, en pesasustancias convenientemente tapados. A continuación se retiran todas las bandas de los correspondientes pesasustancias y se realizan las medidas de conductividad en cada uno de los eluidos (*). Los resultados que se obtienen, y cuya interpretación se ha hecho en el apartado correspondiente de la parte general de esta Memo-

(*) Las medidas de conductividad se efectuaron con el puente Philips GM 4249/01 y célula de inmersión GM 4221, ya citados.

ria. se reúnen en las Tablas XI y XII, para uno de los varios casos estudiados que es el que corresponde a las gráficas de variación de conductividad dadas en aquel lugar. (Fig. 17).

TABLA XI

Zona catódica Banda	$R \cdot 10^{-3}$ ohmios	$\rho \cdot 10^{-3}$ ohmios . cm	$k \cdot 10^5$ ohmios ⁻¹ cm ⁻¹
1	0,143	0,19191	5,10
2	0,148	0,20276	4,93
3	0,116	0,15892	6,29
4	0,105	0,14385	6,94
5	0,090	0,12330	8,11
6	0,083	0,11371	8,79
7	0,083	0,11371	8,79
8	0,079	0,10823	9,24
9	0,080	0,10960	9,12

TABLA XII

Zona anódica Banda	$R \cdot 10^{-3}$ ohmios	$\rho \cdot 10^{-3}$ ohmios . cm	$k \cdot 10^5$ ohmios ⁻¹ cm ⁻¹
1	0,170	0,23290	4,29
2	0,187	0,25619	3,90
3	0,156	0,21372	4,67
4	0,135	0,18495	5,41
5	0,122	0,16714	5,98
6	0,106	0,14522	6,89
7	0,105	0,14390	6,95
8	0,096	0,13152	7,60
9	0,092	0,12604	7,90

Nota 1: El orden seguido en la numeración de bandas está dado desde las más próximas a los extremos del papel hasta las de su centro.

Nota 2: Los valores de R (resistencia óhmica) son los leídos en la escala del puente de conductividades, para los cálculos de las bandas correspondientes, los que, multiplicados por la constante de calibrado de la célula, 1,37, nos dan, como dijimos, los valores de la resistencia específica ρ , cuyos inversos son las conductividades k .

23) Distribución de agua a lo largo de la tira de papel. Determinación de sus variaciones absolutas con el reactivo de Karl FISCHER.

En la parte general quedó explicado ya el método seguido para determinar la citada distribución de agua, por diferencia de pesada de bandas transversales en la tira de papel. Estimamos sin embargo oportuno am-

pliar aquí la técnica de determinación con uso del reactivo de Karl FISCHER, también utilizada por nosotros.

Realización del experimento electroforético y preparación de las tiras para la valoración de agua: Se adopta una forma idéntica a la descrita para valoraciones de fines análogos (véase, por ejemplo, la figura 16) utilizándose tiras de papel Whatman n.º 1 en las que, previamente, se han dibujado bandas transversales, de 0,5 cm de ancho, a lo largo del papel. Acabado el experimento se cortan inmediatamente dichas bandas y se introducen en los correspondientes matraces aforados de 10 cc, de cierre esmerilado perfecto, y se dejan en maceración con 9 cc de metanol anhidro durante 12 horas; posteriormente, se enrasa, hasta los 10 cc, con metanol agregado desde una microbureta, para así conocer, con fines correctivos, la cantidad total de metanol existente. Para completar el volumen hasta los 10 cc hubo que agregar, a cada matracito, el mismo volumen de metanol (0,9 cc), no apreciándose diferencias entre unas y otras muestras, por lo que, en principio, y dado el pequeñísimo valor atribuible al volumen propio de la banda de papel más el del agua aportada por la misma (menos de 0,15 cc) no se cometerá error apreciable suponiendo que el volumen total de metanol es de 9,9 cc y despreciando el volumen debido al papel, a efectos de cálculo. Según esto, 3 cc de metanol, en el extracto metanólico de agua, equivaldrían a 3,03 cc de dicho extracto, por lo que en las valoraciones operamos sobre muestras de este volumen, al objeto de usar el mismo factor sustractivo, para el metanol, que se usó en la standardización del reactivo.

Preparación del reactivo de Karl FISCHER: Para preparar el reactivo se siguió la siguiente marcha: 38,1 g (0,3 moles) de I_2 resublimado se ponen en un frasco Pirex de 0,5 l provisto de tapón de vidrio, y se agregan 120 cc (1,49 moles) de piridina químicamente pura, con menos de un 0,1 % de agua. La mezcla se agita durante diez minutos, al cabo de los cuales el I_2 queda completamente disuelto; entonces se agregan 300 cc de metanol sintético seco (preferiblemente con menos de un 0,05 % de agua). De esta manera preparamos 450 cc del reactivo madre, que puede mantenerse indefinidamente, en tanto no se le agregue el anhídrido sulfuroso, lo cual no debe hacerse hasta pasados varios días, por lo menos, cuatro o cinco. Para preparar el reactivo final se transfieren 150 cc de esta disolución al depósito (de un cuarto de litro a medio litro) de una bureta (microbureta, en nuestro caso) automática, manteniéndose en hielo dicho depósito con la disolución de I_2 , y agregando, a la vez, 6,75 cc (0,15 moles) de SO_2 líquido, obtenido por licuefacción en una mezcla frigorífica de SO_2 gaseoso, procurando evitar la absorción de humedad. El SO_2 líquido se añade rápida, pero cuidadosamente y con agitación, a la solu-

ción fría de I_2 . Se cierra la bureta, etc. y el contenido se deja que adquiriera de nuevo la temperatura ambiente, aflojando un poquito el tapón de la bureta para prevenir un exceso de presión. El reactivo no debe utilizarse hasta 1 ó 2 días después de su preparación. Este reactivo final es alrededor de unas dos veces más fuerte que el original de Karl FISCHER, pero, en esencia es el mismo.

Determinación del factor: Se preparó una disolución standard de agua en metanol (0,02 cc de agua, medidos con micropipeta contrastada, en 3 cc de metanol especialmente deshidratado para este fin, aunque este también se utilizó para la elución de las bandas de papel). Sobre ésta y otras cantidades iguales de solución standard se procedió a agregar el reactivo Karl FISCHER, desde la microbureta automática preparada al efecto. Como vasija de valoración resultaron más prácticas unos matrascos aforados de 10 cc, ya que su cuello elongado y boca estrecha provista de tapón esmerilado impiden, en lo posible, la adsorción de humedad mientras dura la valoración; se tiene igualmente la precaución de no utilizar la primera gota de reactivo que queda en el pico de la microbureta, en contacto con la atmósfera exterior, haciendo la lectura en el momento en que se separa dicha gota, en el cual comienza la valoración. Antes de realizada esta operación se hicieron otras dos valoraciones en blanco, con el mismo volumen de metanol (3 cc) así como otras dos a posteriori, para hacer la corrección por disolvente. Los resultados de las valoraciones en blanco y de los disolventes standard se recogen en la Tabla XIII.

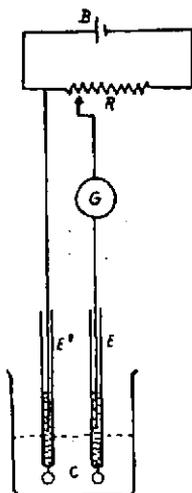
TABLA XIII

Vol. de metanol cc	Contenido en agua cc	Reactivo K. FISCHER consumido cc
3	0,00	0,40
3	0,00	0,40
3	0,00	0,41
3	0,00	0,39
3	0,02	5,42
3	0,02	5,40
3	0,02	5,40
3	0,02	5,39

De los valores que aparecen en la Tabla XIII se deduce que 3 cc de metanol consumen, como valor medio, 0,4 cc de reactivo Karl FISCHER, y que a 0,02 cc de agua corresponden 5 cc del mismo reactivo (diferencia entre el valor medio, 5,40 cc, del Karl FISCHER consumido por los 3 cc de metanol con los 0,02 de agua, y los 0,4 cc de reactivo consumidos por los

3 cc de metanol solo). En resumen, 1 cc de nuestro reactivo de Karl FISCHER equivale a 4 mg de agua.

Este resultado es idéntico al conseguido por determinación electrométrica del punto final. Tal determinación se realizó con un dispositivo que, en definitiva, es el que se esquematiza en la figura adjunta, recomendado por FOULK y BAWDEN [FOULK, C. W. y BAWDEN, A. T., *J. Amer. Chem. Soc.*, 48, 2045 (1926)] como el más adecuado para la técnica del llamado «punto muerto». En dicho esquema, B es una batería, R un reostato, G un galvanómetro, C la vasija de valoración, y E y E' los electrodos de platino.



Obtención de resultados: Sobre 3 muestras de 3,03 cc de cada uno de los extractos metanólicos correspondientes a cada banda de papel (5 en la zona anódica del mismo y 5 en la catódica) se hizo la valoración con el reactivo de Karl FISCHER, en forma análoga a como se había hecho anteriormente la standardización del reactivo, obteniéndose, para la zona anódica; los resultados que aparecen en la Tabla XIV, con determinación visual del punto final (*).

Para hallar los mg de agua equivalente, a partir de los volúmenes de reactivo consumido, descontamos a todos éstos los 0,4 cc que consumen los 3 cc de metanol, según determinamos anteriormente.

(*) Puesto que se trabajó con un reactivo recientemente preparado pudieron hacerse, con toda corrección, determinaciones visuales del punto final.

TABLA XIV

Problema Banda	Extracto usado cc	K FISCHER gastado cc	Agua equivalente mg	Valor medio mg
1. ^a	3,03	7,20	27,20	} 27,21 ± 0,07
»	3,03	7,22	27,28	
»	3,03	7,19	27,16	
2. ^a	3,03	6,92	26,08	} 26,05 ± 0,03
»	3,03	6,91	26,04	
»	3,03	6,91	26,04	
3. ^a	3,03	6,46	24,24	} 24,31 ± 0,09
»	3,03	6,50	24,50	
»	3,03	6,47	24,28	
4. ^a	3,03	6,16	23,04	} 22,99 ± 0,07
»	3,03	6,13	22,92	
»	3,03	6,15	23,00	
5. ^a	3,03	5,82	21,68	} 21,69 ± 0,07
»	3,03	5,81	21,64	
»	3,03	5,84	21,76	

Nota: Las bandas se han numerado en orden de proximidad al extremo anódico de la tira de papel, de manera que la 1 es la más próxima a dicho extremo y la 5 la más alejada de él o la más próxima al centro del papel.

Tomando los valores medios encontrados para los 3,03 cc del extracto metanólico, deducimos que las cantidades de agua, en cada una de las bandas del experimento (o lo que es igual, en los 10 cc del extracto) son las siguientes: 1.^a) 89,80 mg; 2.^a) 85,97 mg; 3.^a) 80,23 mg; 4.^a) 75,87 mg; 5.^a) 71,58 mgs; es decir, decrecientes hacia el centro longitudinal de la tira electroforética.

En la zona catódica, los resultados, obtenidos de forma completamente análoga a los anteriores y expresados desde el correspondiente a la banda más próxima al extremo catódico hasta el de la más alejada de él (la disposición de bandas es perfectamente simétrica respecto al eje transversal del papel) son los siguientes: 1c) 94,32 mg; 2c) 88,17 mg; 3c) 82,93 mg; 4c) 79,51 mg; 5c) 74,12 mg.

25) Comparación de los resultados obtenidos con diversos indicadores electrosmóticos. Utilidad de la maltosa, inulina y almidón.

Se trata primero de estudiar la influencia de las características estéricas de los indicadores electrosmóticos, sobre la posición final de equili-

brio alcanzada por los mismos. Los sometidos a ensayo fueron: dextrina, almidón, inulina, maltosa y glucosa. La disposición y el método experimental seguidos son completamente análogos a los utilizados en los experimentos para la glucosa, correspondientes al apartado 18. En este caso se interrumpe el proceso electroforético (275 vol) al cabo de 1, de 2 y de 3 horas, y por último, al cabo de 6 horas y de 6 horas 30 minutos, lo que nos permitió comprobar que la posición final de equilibrio era la misma para todas las sustancias utilizadas, habiéndose alcanzado dicha posición entre las 6 y las 6 horas y media, con una velocidad mayor para las de menor peso molecular como ponen de manifiesto los experimentos de 1, 2 y 3 horas. Se utilizó papel Archés 301 de dimensiones 6 × 27 cm y tampón de veronal de pH 8,6. Las muestras de las disoluciones de tales sustancias-indicadores se dispusieron en pistas paralelas de cuatro tiras de papel (sometidas a electroforesis en condiciones exactamente iguales) combinándolas de la siguiente manera: 1) dextrina, almidón, inulina; 2) dextrina, maltosa, glucosa; 3) almidón, maltosa, glucosa; 4) inulina, maltosa, glucosa. Los reveladores utilizados fueron: para el almidón y la dextrina, disolución de I_2 al 3 % en IK y alcohol, apareciendo manchas azuladas para el almidón y más bien rojizas para la dextrina; la inulina se reveló con una disolución ácida de resorcina en etanol (resorcina: etanol:CIH: :3:95:5, p/p), con la que rápida y claramente da coloración roja; para la maltosa y glucosa se utilizó el ya citado revelador de p-anisidina (12 g de p-anisidina + 2,32 cc de CIH de $d = 1,88 + 400$ cc de n-butanol; se añaden unos cristales de Cl_2Sn . En el momento de usarlo se diluye con n-butanol hasta el 1 % aproximadamente).

Para la segunda cuestión a detallar en este apartado, se realizaron los experimentos correspondientes, también en nuestro dispositivo habitual, aunque extremando las precauciones para inhibir la evaporación (cámara pequeña herméticamente cerrada y adición de un 15 % de glicerina al tampón) y sobre papel Archés 301 de 6 × 27 cm, dividido en dos pistas por una línea longitudinal trazada a lápiz. En una de estas pistas y en el lugar de origen se depositó una muestra de una disolución concentrada de maltosa y en la pista paralela y sobre la misma línea de origen, otra de suero. Terminada la electroforesis (300 voltios) a las 3 horas de haber comenzado, se corta el papel longitudinalmente y se separan ambas pistas. A continuación se procede al revelado, de la maltosa, con p-anisidina, y del suero con azul de bromofenol, pasando a hacer las medidas de los correspondientes desplazamientos, debidos, el primero a la corriente electrosmótica, como es sabido, y el segundo al efecto combinado de la electroósmosis y electroforesis, propiamente dicha, con el objeto de determinar las movibilidades aparente y real de las distintas fracciones sero-

proteínicas, corregidas en cuanto a efecto electroosmótico. Puesto que el cálculo de movilidades es idéntico para las diversas fracciones, recogemos en este Apéndice sólo los datos y resultados correspondientes a la subfracción globulínica α_1 , ya que dada la mayor nitidez de la banda correspondiente a dicha fracción en el espectro electroforético del suero utilizado en estos experimentos, los resultados han de ser más exactos.

La misma técnica se siguió para el cálculo de movilidades, utilizando como indicadores electroosmóticos almidón e inulina. En la Tabla XV re-

TABLA XV

Indicador electroosmótico	d cm	$u_a \cdot 10^5$	$u_c \cdot 10^5$	u_a medio 10^5 cm ² /seg. vol	u_c medio 10^5
Maltosa	6,20	4,55	4,74	4,55 ± 0,00	4,74 0,00
»	6,20	4,55	4,74		
Inulina	5,90	4,33	4,51	4,32 0,02	4,50 0,02
»	5,85	4,30	4,48		
Almidon	5,45	4,00	4,16	4,00 0,00	4,16 0,00
»	5,45	4,00	4,16		

cogemos los datos obtenidos para el desplazamiento, d , de la globulina α_1 corregido por el de los tres indicadores citados, y los valores de la movilidad electroforética, aparente y real, calculados a partir de estos datos.

32) *Comprobación de la influencia del pH y de la concentración salina del baño de tinción de azul de bromofenol, sobre los resultados cuantitativos de la electroforesis de seroproteínas.*

Si la posible disminución en la capacidad de fijación de colorante por las proteínas, en la tinción con disoluciones de éste ya usadas en tinciones anteriores, afectase por igual a todas las fracciones proteínicas de un suero (el mismo para todos los experimentos), el efecto a comprobar pasaría inadvertido comparando los valores porcentuales de tales fracciones en los distintos casos. Por ello, para realizar la comprobación que pretendemos, se tomaron, con una micropipeta, cantidades exactamente iguales de un mismo suero, que se sometieron a electroforesis en condiciones rigurosamente idénticas. Puesto que dicha comprobación la íbamos a realizar basándonos en los valores de transmisión de luz de los eluidos del colorante retenido por las proteínas, fué necesaria una comprobación pre-

via que consistió en medir las transmisiones de los eluidos de dos cantidades exactamente iguales de un mismo suero, depositadas sobre dos pistas paralelas de una tira de papel y teñidas a la vez, después de la electroforesis, en el mismo baño tintorial de azul de bromofenol. Las transmisiones leídas en el fotocolorímetro fueron las mismas para las fracciones correspondientes de ambas muestras; esto prueba la idoneidad del método a seguir en los experimentos fundamentales que realizamos a continuación.

Dichos experimentos consistieron en la obtención de 8 electroforegramas (papel Archés 301, 4 × 27 cm; tampón de veronal, pH 8,6; 250 V; 3^h; evaporación parcialmente inhibida) del mismo suero, tomado en cantidades idénticas (0,01 cc) que se sometieron a electroforesis en condiciones también iguales, con especial control del tiempo y de la temperatura de secado en todos los casos (95° C durante 10^m). La tinción de proteínas de los distintos electroforegramas se realizó con azul de bromofenol (40 cc de disolución de azul de bromofenol al 0,1 % en alcohol saturado de Cl₂Hg) que había sido utilizada en la tinción anterior a cada caso (menos para la primera operación en que se trataba del colorante no usado) y cuyo volumen se completa con disolución nueva. En páginas siguientes se recogen los resultados obtenidos en las lecturas fotocolorimétricas ($\lambda_{m\text{rdta}}$ utilizada en el fotocolorímetro de filtros, 695 m μ) de los eluidos (6 cc de eluyente en todos los casos) de las diferentes fracciones proteínicas de cada electroforegrama, indicándose, al mismo tiempo, los pH correspondientes a cada baño, cuyas medidas (*) se efectuaron inmediatamente después de realizada cada tinción, por lo cual pueden considerarse, con gran aproximación, como el pH al que se ha verificado la tinción. El pH medido en la disolución de colorante no usada es 2,33; el medido después de la primera tinción 2,33; después de la segunda 2,48, y así sucesivamente, en el orden en que se dan.

Como puede observarse, los resultados son prácticamente iguales para las cinco primeras tinciones, disminuyendo a partir de aquí la cantidad de colorante fijado, por las proteínas, según indican los valores de transmisión y de densidad óptica encontrados, lo que se observa más claramente en la albúmina, fracción muy netamente definida en el espectro proteínico obtenido. Los electroforegramas, después de teñidos y lavados con agua, fueron sometidos a lavados sucesivos con disoluciones de Cl₂Hg al 1 % en metanol y en etanol, respectivamente, y con metanol puro. La posibilidad de un efecto provocado por una alteración real del suero durante su conservación en las horas que separan los primeros y últimos ex-

(*) Los pH se determinaron en todos los casos con un medidor de pH Philips GM 4494/96, alimentado por redes de C. A.

perimentos, quedó descartada en la comparación de dos electroforegramas de proteínas, teñidos en igualdad de condiciones (secado previo idéntico; tiempo transcurrido entre el secado y la tinción, el mismo; igual cantidad de líquido colorante no usado e igual tiempo de tinción y lavados posteriores, etc.), pero uno correspondiente al suero reciente y el otro al estado en que se encontraba al terminar todos los experimentos. Los resultados, en ambos casos, fueron prácticamente idénticos.

RELACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

	% T	D.O. × 10	% P		% T	D.O. × 10	% P
pH=2,33				pH=2,48			
Alb	77,25	1,121	42,85		77,5	1,107	42,37
Glob. α_1	96,25	0,166	6,35		96,5	0,155	5,93
Glob. α_2	93,75	0,281	10,74		93,5	0,292	11,17
Glob. β	92,00	0,367	14,03		91,75	0,378	14,47
Glob. γ	85,5	0,681	26,03		85,5	0,681	26,06
pH=2,67				pH=2,83			
Alb.	77,5	1,107	42,97		77,25	1,121	43,25
Glob. α_1	96,5	0,155	6,02		96,26	0,168	6,68
Glob. α_2	93,5	0,292	11,34		93,75	0,281	10,84
Glob. β	92	0,367	14,25		92,25	0,354	13,66
Glob. γ	86	0,655	25,43		85,75	0,668	25,77
pH=3,12				pH=3,30			
Alb.	77,5	1,107	43,36		78,25	1,065	43,28
Glob. α_1	96,5	0,155	6,07		96,75	0,145	5,81
Glob. α_2	93,75	0,281	11,01		94	0,269	10,93
Glob. β	92	0,367	14,38		92,25	0,354	14,38
Glob. γ	86,25	0,643	25,18		86,5	0,630	25,60
pH=3,67				pH=3,91			
Alb.	80,25	0,956	42,64		81,5	0,889	43,77
Glob. α_1	97	0,132	5,89		97	0,132	6,50
Glob. α_2	94,5	0,246	10,97		95,25	0,212	10,44
Glob. β	93	0,315	14,05		93,5	0,292	14,38
Glob. γ	87,25	0,593	26,00		89	0,506	24,91
pH=4,22				pH=4,62			
Alb.	83	0,809	43,29		86	0,655	43,26
Glob. α_1	97,25	0,120	6,42		98	0,082	5,42
Glob. α_2	95,75	0,189	10,11		96,5	0,155	10,24
Glob. β	94	0,269	14,39		95,25	0,212	14,00
Glob. γ	89,5	0,482	25,79		91	0,410	27,08
pH=5,1							
Alb.	94	0,269	42,23				
Glob. α_1	99,25	0,033	5,18				
Glob. α_2	98,5	0,063	9,89				
Glob. β	97,75	0,095	14,91				
Glob. γ	96	0,177	27,79				

37) *Ejemplo práctico de obtención de un electroforegrama y de su correspondiente proteinograma densitométrico directo. Valoración de este último.*

Se obtuvo el electroforegrama de un suero humano de diagnóstico clínico desconocido, con nuestra técnica más usual de papel en V invertida, cámara húmeda pequeña y evaporación parcialmente inhibida. El papel utilizado fué el Archés 301 de 3×25 cm; diferencia de potencial: 300 voltios, e intensidad de corriente: 1,26 mA/cm; tiempo = 3 horas; tampón empleado: veronal/veronal sódico, pH 8,6. Tinción de proteínas con azul de bromofenol. Longitud de espectro obtenido: 6,6 cm. La lectura densitométrica directa del electroforegrama se realizó con filtro amarillo y a la manera que se describe en la parte general, empezando poco antes de la mancha correspondiente a la albúmina y siguiendo, de izquierda a derecha, hasta pasar la de la γ -globulina. Antes de entrar en la zona donde se encuentra la albúmina y después de pasar la correspondiente a la globulina gamma se obtuvo el valor máximo de % *T*, correspondiente al blanco del papel, valor que tomamos como punto de referencia, por lo cual la «*D* \times 10» correspondiente al mismo, se sustrae de todas las demás; los valores así obtenidos figuran en la Tabla XVI como «Dif.»; puesto que las densidades ópticas se toman en ordenadas (en abscisas los milímetros) esos dos valores, inicial y final, del electroforegrama tendrán de ordenada cero; en este caso concreto, para la representación gráfica, hemos tomado los valores de estas diferencias multiplicadas por 2, lo cual no modifica los valores porcentuales de las proteínas.

Con los valores de la primera y última columnas, se construyó la gráfica o proteinograma correspondiente (Fig. 29) y midiendo superficies y repartiendo proporcionalmente a ellas, según dijimos, se obtuvieron los siguientes valores para las distintas fracciones seroproteínicas:

Albúmina.	59,11 %
Globulina α_1	3,60 %
Globulina α_2	5,74 %
Globulina β_1	10,14 %
Globulina β_2	4,53 %
Globulina γ	16,88 %

A continuación damos la tabla de valores que ha servido de base al cálculo anterior.

TABLA XVI

Lectura directa del electroforegrama correspondiente a la fig. 29

mm.	% T	D x 10	Dif.	Dif. x 2
52	62	2,076	0,000	0,000
53	61	2,147	0,071	0,142
54	59	2,291	0,215	0,430
55	55,5	2,557	0,481	0,962
56	50	3,010	0,934	1,868
57	45	3,468	1,392	2,784
58	40	3,979	1,903	3,806
59	36,5	4,376	2,300	4,600
60	34	4,685	2,609	5,218
61	32	4,949	2,873	5,746
62	33	4,815	2,739	5,478
63	37,5	4,2585	2,1825	4,375
64	43,5	3,615	1,539	3,078
65	48,5	3,143	1,067	2,134
66	52	2,840	0,764	1,528
67	55	2,596	0,520	1,040
68	56,5	2,4795	0,4035	0,807
69	58	2,366	0,290	0,580
70	58,5	2,3285	0,2525	0,505
71	58,5	2,3285	0,2525	0,505
72	57	2,441	0,365	0,730
73	58	2,366	0,290	0,580
74	58,5	2,3285	0,2525	0,505
75	59	2,291	0,215	0,430
76	59	2,291	0,215	0,430
77	58,5	2,3285	0,2525	0,505
78	57,5	2,4035	0,3275	0,655
79	57,25	2,4223	0,3463	0,692
80	57,25	2,4223	0,3463	0,692
81	58	2,366	0,290	0,580
82	58	2,366	0,290	0,580
83	59	2,291	0,215	0,430
84	59	2,291	0,215	0,430
85	58	2,366	0,290	0,580
86	57	2,441	0,365	0,730
87	55,5	2,557	0,481	0,962
88	55,5	2,557	0,481	0,962
89	55,25	2,5765	0,500	1,000
90	56	2,518	0,442	0,884

mm	% T	D x 10	Dig.	Dif. x 2
91	57,5	2,4035	0,327	0,654
92	58	2,366	0,290	0,580
93	59	2,291	0,215	0,430
94	59	2,291	0,215	0,430
95	59,25	2,2363	0,160	0,320
96	60	2,218	0,142	0,284
97	58	2,366	0,290	0,580
98	57,5	2,4035	0,327	0,654
99	57	2,441	0,365	0,730
100	57,5	2,4035	0,327	0,654
101	57,5	2,4035	0,327	0,654
102	58	2,366	0,290	0,580
103	57,5	2,4035	0,327	0,654
104	55	2,596	0,520	1,040
105	52	2,840	0,764	1,528
106	53	2,757	0,681	1,362
107	54	2,676	0,600	1,200
108	54,5	2,636	0,560	1,120
109	55	2,596	0,520	1,040
110	56	2,518	0,442	0,884
111	56	2,518	0,442	0,884
112	57	2,441	0,365	0,730
113	57,5	2,4035	0,3275	0,655
114	58	2,366	0,290	0,580
115	60	2,218	0,262	0,424
116	60	2,218	0,262	0,424
117	61,5	2,1115	0,155	0,310
118	62	2,076	0,000	0,000

(6,6 cm)

39) *Comprobación experimental de la ley de BEER, sobre eluidos de proteínas teñidas con azul de bromofenol. Determinación de los límites máximo y mínimo de muestra de suero aconsejables.*

Comprobación de la ley de BEER: Sobre dos tiras de papel, una de Archés 301 y otra de Whatman 1, se depositaron sucesivamente, en diversos puntos de cada una de ellas, separados entre sí, como mínimo, por

3 cm, muestras de 0,002, 0,004, 0,006, 0,008, 0,010, 0,012 y 0,015 cc de un suero medio, obtenido a partir de otros 10 de composición aproximadamente normal (comprobación electroforética). A continuación, se humedecen dichas tiras en el tampón de veronal/veronal sódico de pH 8,6, se secan en estufa durante 10^m a 95° C y se tiñen con azul de bromofenol en la forma acostumbrada. Se recortan trozos iguales del papel, en cada uno de los cuales queda incluida la correspondiente zona teñida y cada uno de estos trozos, colocados en probetas graduadas provistas de tapón esmerilado, se eluyen con 5 cc de disolución de carbonato sódico al 5 % en metanol del 50 %, enrasando por último, a 6 cc, todos los eluidos. Haciendo uso de cubetas paralelepípedicas de cuarzo, de 1,5 cc, se determinaron las correspondientes densidades ópticas en un espectrofotómetro BECKMAN (Modelo B) utilizando luz monocromática de longitud de onda igual a 595 m μ . Los resultados obtenidos (sensibilidad utilizada = 3) tomando como disolución cero la de carbonato sódico en metanol, son los siguientes:

Papel Archés n.º 301		Papel Whatman n.º 1	
Suero total cc	Densidad óptica del eluido	Suero total cc	Densidad óptica del eluido
0,000	0,000	0,000	0,000
0,002	0,016	0,002	0,018
0,004	0,025	0,004	0,027
0,006	0,039	0,006	0,040
0,008	0,047	0,008	0,045
0,010	0,065	0,010	0,066
0,012	0,072	0,012	0,074
0,015	0,084	0,015	0,082

La concordancia de resultados en ambas clases de papel, pese a su distinto grosor y poder retentivo, nos pone de manifiesto que la disolución de carbonato en metanol tiene un eficaz poder eluyente para el colorante retenido por las proteínas. La gráfica que aparece en la parte general (Fig. 32) se refiere concretamente a los resultados sobre el papel Archés; la correspondiente al papel Whatman sería tan análoga a ésta que no hemos creído necesario su trazado.

Determinación de los límites máximo y mínimo de muestra de suero aconsejables: Debe destacarse que, en los experimentos reales, las muestras de suero que utilizamos están alrededor de los 0,01 cc, por lo que su contenido en cualquiera de las fracciones constituyentes es muy inferior

a este límite, el cual podría tomarse como límite superior en el que se cumple todavía, para nuestras condiciones, la ley de BEER. De la misma forma, las cantidades usadas en tales experimentos reales no suelen bajar de 0,009 cc, por lo que, según vamos a ver, la proporción de la fracción proteínica más pobre (ordinariamente la globulina α_1 , que supone un 1,4 % de la proteinemia total del suero en los casos de mayor pobreza) es superior al límite mínimo de nuestras fotolorimetrías de comprobación.

Cálculo del límite inferior: Aun cuando en nuestros experimentos se utilizó para la elución de colorante un volumen total de 6 cc de eluyente, éste podría haberse reducido, realmente, a 1,5 cc que era el que, en definitiva, se requería para el tamaño de nuestras cubetas, aun teniendo en cuenta el necesario para el lavado de las mismas, puesto que basta con que se llenen hasta los $\frac{2}{3}$ de sus alturas (1 cc). En estas circunstancias, por lo tanto, podrían utilizarse concentraciones iniciales de suero 4 veces menores ($6 : 1,5 = 4$) para obtener el mismo valor de densidad óptica que el obtenido por nosotros con 0,002 cc de suero. Por otro lado, con un espectrofotómetro de sensibilidad media pueden apreciarse con toda seguridad densidades ópticas del orden de 0,004; como con la concentración antes indicada de nuestro problema se obtienen densidades ópticas del orden de 0,016, se deduce de aquí que pueden utilizarse concentraciones iniciales otras 4 veces más diluídas todavía. De estos datos se desprende que podría tenerse una tinción y elución observable, de las proteínas de un suero (no desarrollado electroforéticamente), con $0,002 : 16 = 0,00012$ cc. Ahora bien, a partir de este dato puede deducirse, a su vez, que, cuando el suero se somete a electroforesis, si se desea medir por elución las fracciones proteicas y que no pase desapercibida ninguna de ellas que pueda encontrarse en pequeña proporción (caso más general de la globulina α_1 , como hemos dicho), se requerirá un mínimo de suero de $\frac{0,00012}{1,4} \times 100 = 0,0085$ cc, valor que consideramos como límite inferior. En la práctica es aconsejable sobrepasar algo este límite, aproximándonos al valor 0,01 cc.

41) *Determinación de la proteinemia total de un suero, por dosificación del N según KJELDAHL.*

0,2 cc de suero se tratan, en un matraz de digestión de semimicrokjeldahl, con 2 cc de SO_4H_2 concentrado reactivo (66° B) en presencia de 0,8 g de la mezcla catalizadora ($\text{SO}_4\text{Cu} + \text{Se}$, 25 : 10) y de 1,2 g de

SO_4K_2 (que permite elevar la temperatura de ebullición del SO_4H_2). Se calienta la mezcla en el matraz de digestión mediante un hornillo eléctrico, primero suavemente y con mayor intensidad después, hasta que quede un líquido transparente y límpido, lo que se consigue al cabo de 50 minutos. Posteriormente, se acopla el matraz de digestión a un generador de vapor de agua y al resto del aparato de destilación. Se inicia el arrastre con vapor, se adicionan 15 cc de disolución de NaOH al 40 % y se recoge el destilado sobre 10 cc de ácido bórico al 4 %, que contiene además un 0,5 % de la disolución del indicador (mezcla de disoluciones, al 0,2 % en alcohol, de rojo de metilo y de azul de metileno en la proporción 2 : 1). La operación de arrastre y destilación se mantiene durante 9 minutos, aunque probablemente, en los 3 primeros, ya se debe haber desplazado y recogido todo el NH_3 . Se realiza una valoración de la disolución de bórico + amoníaco con ClH 0,03572 N, consumiéndose 5,22 cc de este ClH en una primera determinación y 5,28 en otra posterior realizada sobre una muestra de la misma cuantía y del mismo suero. (Este volumen de ClH se entiende que es una vez descontado el consumido en un ensayo en blanco). Los resultados anteriores suponen una riqueza del suero, en N, de 13,061 y 13,210 g/100 cc de suero, respectivamente, lo que en valor medio es 13,135 g de N/100 cc de suero. Aceptando para el factor de conversión en proteínas el valor 6,25, dicho contenido en N equivale a un contenido proteínico de 82,094 g/l de suero.

43) *Estudio experimental de la distribución de potenciales en dispositivos diversos de electroforesis continua.*

Damos a continuación cinco series de valores que reproducen la distribución de potenciales encontrada en 5 de las distintas condiciones estudiadas y que creemos pueden considerarse como más representativas.

La diferencia de potencial que indicamos T-T corresponde al potencial medido entre las vasijas electródicas. Los valores que aparecen en cada columna son los medidos entre los puntos correspondientes a la división que se indica en cada una de dichas columnas y sus simétricos respecto al eje vertical de la hoja de papel. La numeración de las columnas se ha hecho desde las orillas del papel hacia el centro del mismo y la de las divisiones de tales columnas, de abajo arriba.

1) Condiciones de DURRUM. (Fig. 32).

T-T ... 245 voltios.

División	Fila 1. ^a	Fila 2. ^a	Fila 3. ^a	Fila 4. ^a	Fila 5. ^a
1	79 vol	54 vol	36 vol	22 vol	11 vol
2	68	50	35	21,5	10
3	58	44	31	19,5	9
4	44,25	36	27,4	17,3	8,4
5	36	30,1	24	15,5	7,7
6	30	25,7	20	14	7
7	25,6	22,5	17,5	12	5
8	21,5	18	13,6	8,5	3,2
9	16,25	14,25	10,3	6	2,75
10	12,6	10,5	8	5,2	2,5
11	9,1	8	6	4	2

2) Doble pareja de electrodos (DI CASTRO y SAN MARCO. Fig. 37).

T-T ... 240 voltios.

División	Fila 1. ^a	Fila 2. ^a	Fila 3. ^a	Fila 4. ^a	Fila 5. ^a
1	127 vol	97 vol	67 vol	43 vol	21,8 vol
2	116	92	66	41	21
3	101	82	60,5	39	20,6
4	88	74	57	36,5	19,5
5	78	67	51,5	34,2	18,5
6	72	61,5	48	32	17,75
7	68,2	58	45,5	30,5	16,6
8	66	56	43,5	30	16,75
9	66,2	55	43	29,25	15,75
10	68	54	42,5	29	14,75
11	68,5	54	42,5	28,1	13,05

3) Tres parejas de electrodos (la figura correspondiente es prácticamente idéntica a la anterior, por lo que hemos prescindido de su representación).

T-T ... 250 voltios.

División	Fila 1. ^a	Fila 2. ^a	Fila 3. ^a	Fila 4. ^a	Fila 5. ^a
1	125 vol	94 vol	64 vol	42 vol	18,5 vol
2	115	88	62	41	19,5
3	110	80	56	38	18,5
4	93	73	51,5	34	17,5
5	85	66,5	47,5	32	18
6	78	61	45	30,5	16,5
7	71	58	43	30	15,5
8	68	53,5	41,5	28,5	14,5
9	62	50	38	26	13
10	60	46	34	23,5	12
11	52	38	27,5	18,5	9,3

4) Electrodo único en disminución simétrica. (Fig. 38).

T-T ... 245 voltios.

División	Fila 1. ^a	Fila 2. ^a	Fila 3. ^a	Fila 4. ^a	Fila 5. ^a
1	40,5 vol	33,5 vol	25 vol	16,4 vol	8,2 vol
2	41	33	25	16,4	8
3	41	33	24,5	16,7	8,6
4	41,9	33,9	24,7	16,5	8,6
5	42,5	34	25	16,5	8,4
6	44	34	25,9	16,2	8,2
7	43	34	24,5	16	8,2
8	42	33	24	15,4	7,5
9	38	29,9	21,6	14	7
10	32	25	18	11,9	5
11	24,5	19,9	12	9,2	4,5

5) Condiciones de GRASSMANN y HANNIG. (Fig. 39).

T-T ... 165 voltios.

División	Fila 1. ^a	Fila 2. ^a	Fila 3. ^a	Fila 4. ^a	Fila 5. ^a
1	95 vol	56 vol	36 vol	24 vol	11 vol
2	80	56	36	24	11
3	78	56	36	24	11
4	82	56	36	24	11
5	77	56	36	24	11
6	96	54	35	22	11
7	90	50	33	20,5	10
8	68	45	32	20,5	10
9	73	44	31	19,5	10
10	75	43	30	19	10
11	66	43	29	18	10

CONCLUSIONES

1.^a Se hace un estudio histórico de la electroforesis soportada, refiriendo sus entronques con la cromatografía de partición y exponiendo, posteriormente, el estado de desarrollo actual de las técnicas electroforéticas, continuas y discontinuas, sobre papel, como caso más significativo. Respecto a los fundamentos teóricos y experimentales de la electroforesis en papel, se hace un estudio comparativo con la electroforesis libre.

2.^a Se describen los múltiples factores que gobiernan la migración electroforética, reuniéndolos en tres grupos principales: a) factores inherentes a la partícula electroforética en sí, b) factores que dependen del medio en cuyo seno se mueve la partícula, y c) características del campo eléctrico aplicado; se destaca la complejidad físico-química que esta multiplicidad de factores lleva consigo y la consecuente necesidad de seleccionar los que deben ser considerados.

3.^a Se hace un tratamiento matemático, tan elemental como ha sido posible, de la velocidad y movilidad electroforéticas, tomando como base la ecuación de LAMB. Se destacan las limitaciones que este tratamiento tiene, como consecuencia de la diferente importancia de los factores en la electroforesis soportada y en la libre, señalando, desde un punto de vista teórico, pero objetivo, cuáles son los de previsible significado en una y otra modalidad, juicio que se ha tomado como base para la realización de una gran parte de los experimentos recogidos en esta Memoria.

4.^a Después de un estudio teórico de los factores físicos y químicos dependientes de la naturaleza del papel, que influyen en la migración electroforética, cuando actúa aquél como soporte, se expone detalladamente el tratamiento matemático de KUNKEL y TISELIUS, sobre todo en

lo que respecta a la corrección de movilidades electroforéticas, en comparación con la electroforesis libre. Dichas correcciones dependen, especialmente, de la diferencia entre el recorrido real y el aparente de las partículas, para los que proponemos las denominaciones de «camino electroforético» y «camino geométrico», respectivamente, por analogía con los conceptos de camino óptico y camino geométrico, de la Física.

5.^a Se da cuenta de nuestras determinaciones experimentales de factores de corrección para los papeles Whatman n.º 1 y Archés n.º 301, datos que no aparecen en la bibliografía, pese a ser estos soportes los más ampliamente utilizados. Los valores obtenidos para tales factores ($0,83 \pm 0,03$ y $0,92 \pm 0,02$, respectivamente) prueban que, en dichos papeles, la movilidad aparente de las partículas se aproxima más a la real que en otros soportes cuyos factores de corrección encontramos en la bibliografía. Trabajando con distintos tampones, para el cálculo de los factores de corrección, se comprueba que dichos factores son independientes del tampón utilizado.

6.^a Utilizando los factores de corrección obtenidos anteriormente para los papeles citados se hizo el cálculo de las movilidades reales de las distintas fracciones proteínicas del suero humano, obteniendo resultados concordantes con los que obtienen otros autores a partir de datos logrados con soportes diferentes a los utilizados por nosotros, y aun con los obtenidos directamente en la electroforesis libre. Los resultados calculados por nosotros son: albúmina, 5,36; globulina α_1 , 4,39; globulina α_2 , 2,76; globulina β , 2,33; globulina γ , 0,57.

7.^a Relacionado con el estudio de la influencia de las características estéricas de las partículas electroforizables, sobre su migración en el papel, se da cuenta de nuestros experimentos paralelos comparativos, con albúmina desnaturizada y sin desnaturizar, interpretando el rastro continuo y extenso de la primera como consecuencia de una heterogeneidad, de tamaño y forma, producida en el proceso de desnaturización, lo cual se traduce, a su vez, en una heterogeneidad de la movilidad electroforética de la sustancia.

8.^a En relación con lo anterior, se destaca la improbable migración paralela de dos partículas estérica o constitucionalmente distintas y, a la inversa, la probable homogeneidad de las que emigran a la vez. Se da como ejemplo de aparente disparidad con este criterio, el caso de la migración electroforética de las fracciones alfa y beta-globulínicas del suero

humano (reveladas con azul de bromofenol) y el de las lipídicas del mismo suero (reveladas con Sudán III) para descartar finalmente tal disparidad, por tratarse de una sustancia única (lipo-proteína) con diferentes características funcionales.

9.^a Respecto a la porosidad del soporte, se realiza un estudio comparativo de los papeles Whatman núms. 1 y 4 y Archés 301, en cuanto al efecto retardante de cada uno sobre la migración electroforética. El espectro electroforético obtenido con el primero es, por término medio, un 10,59 y un 32,85 % menor que los obtenidos con papeles Watman n.º 4 y Archés 301, respectivamente. En contra de lo esperado, y a la vista de los resultados obtenidos, se concluye que los mejores papeles para electroforesis no son los menos porosos; se da una explicación de las posibles causas encontradas para el fenómeno.

10.^a Se hace un estudio crítico de la adsorción física y química de las sustancias sobre el papel, dando cuenta de los experimentos efectuados para evitar la última, por metilación suave de aquél. Para estos experimentos se utilizan seproproteínas, estudiándose los efectos de adsorción y disminución de ésta, por medidas fotolorimétricas del colorante eluido de las proteínas teñidas. De los resultados anteriores y comprobada la metilación efectiva del papel (OCH_3 en el papel metilado: 0,316 %; OCH_3 en el ensayo en blanco: 0,039 %), se concluye que la adsorción, por parte de los grupos metilables (a los que se atribuye generalmente la adsorción química del papel), es prácticamente despreciable, para las proteínas, cuando se trabaja a pH superiores a sus pI.

11.^a Se recoge el estudio experimental efectuado sobre la influencia de las intensidades de campo y de corriente, de la conductividad, temperatura y tiempo, sobre la movilidad electroforética. Se da cuenta de la variación de la conductividad durante el proceso, interpretando el fenómeno como debido a una imbibición progresiva del soporte en el tampón. Se destaca la menor importancia del factor temperatura en la electroforesis soportada que en la libre, aun cuando se admite la posibilidad de gradientes de temperatura, longitudinales o transversales, cuyos efectos tienen mayor importancia. Se describen los dispositivos adoptados para disminuir tales efectos.

12.^a Se hacen unas consideraciones teórico-experimentales sobre el efecto combinado de los factores diferencia de potencial, intensidad de corriente y tiempo, así como sobre el desarrollo de calor en el proceso dis-

continuo, destacando las condiciones habituales de trabajo seleccionadas, entre las que se encuentran intensidades de campo hasta de 16 vol/cm que no han hecho necesario, sin embargo, el uso de fluidos ni de otros medios de refrigeración. Se hacen unas consideraciones de conjunto de todos los factores citados en las conclusiones 11.^a y 12.^a y se resalta el poco interés que, en la mayoría de los casos, tiene la fijación de varios de ellos, ya que, en realidad, son interdependientes y, a su vez, consecuencia de circunstancias no fijables.

13.^a Se da cuenta, asimismo, de la influencia de la anchura del papel sobre la intensidad de corriente, y de sus efectos sobre la migración electroforética, ilustrándose con datos experimentales. Se señala la intensidad de campo como el factor que rige principalmente el proceso electroforético. Se trata igualmente de la influencia de la longitud de la tira de papel, tanto sobre la intensidad de campo como sobre el poder de imbibición por el tampón. Se trata de los factores intensidad de campo y tiempo como preponderantes en el gobierno del proceso electroforético, e, igualmente, de la influencia de la temperatura, aportándose, para todos los casos, varias series de diagramas experimentales muy demostrativos.

14.^a Además de tratar otros puntos más generales, pero relacionados con el que vamos a destacar, se realiza una discusión teórico-experimental, detallada, de la influencia de la relación pH del medio/pI de la partícula emigrante, en el caso de anfólitos, sobre los resultados obtenidos en la migración electroforética. Asimismo, se comprueba la acción conjunta de la fuerza electroosmótica y de la tensión electronegativa (relación pH/pI, antes indicada) para el caso de aminoácidos diversos, en diferentes tampones. Se concluye que, para lograr buenas separaciones relativas, deben utilizarse sistemas tampón, cuyos pH queden en zonas lo más distanciadas posible de los pI correspondientes a las distintas sustancias de la mezcla a fraccionar.

15.^a Se destaca la importancia de la composición química del tampón utilizado, refiriendo el hecho observado con carácter general, para el caso de las seroproteínas, de que la subfracción globulínica α_1 no se manifiesta con el tampón de borato de pH 8,6, mientras que aparecen claramente desdobladas, con el mismo, las β_1 y β_2 -globulinas, lo que no siempre se consigue con el tampón de veronal de los mismos pH, conductividad y fuerza iónica. Igualmente, se comprueba la influencia directa del pH del tampón sobre la migración electroforética de seroproteínas, deduciendo

que, a menor pH (proteínas menos negativamente cargadas), tiene lugar una mayor adsorción de aquéllas sobre el papel. La comprobación se efectúa con tampones de fosfato dipotásico y fosfato monosódico, de pH 7,7 y 7,4, respectivamente, y con tampón de veronal de pH 8,6, observándose claras diferencias, incluso cuantitativas, deducidas de los proteinogramas obtenidos con uno y otros tampones.

16.^a Se estudian los factores electroósmosis, evaporación y capilaridad, como principales determinantes de corrientes líquidas en el papel. Respecto a las corrientes de evaporación, se concluye, en definitiva, que son consecuencia de una serie de factores concurrentes, pero, sobre todo, resultado de la competición entre gravedad y capilaridad. Se da cuenta del estudio experimental realizado para determinar las características de tales corrientes, por métodos diversos de valoración de agua y de tampón, sobre el papel soporte.

17.^a Se da cuenta igualmente de las medidas efectuadas para determinar el efecto combinado de la electroósmosis y evaporación y de cómo ello nos ha permitido calcular un término para el que proponemos el nombre de «factor incrementante de desplazamiento electroosmótico» o de «factor electroosmótico», simplemente. Se aportan unas gráficas originales, muy demostrativas del fenómeno. Se estudian luego los efectos combinados de evaporación y difusión, haciendo una breve crítica del tratamiento de De WAEL sobre esta cuestión. Se estudia otro efecto superponible a los anteriores, el llamado «efecto de sifón», y se demuestra experimentalmente la existencia de flujos transversales de líquido, en la tira de papel, y efectos de borde, así como los efectos de distorsión que éstos pueden provocar sobre las sustancias a separar, exponiendo los resultados de nuestros experimentos con algunas sustancias y procedimientos inhibidores de evaporación.

18.^a En experimentos combinados con dextrina, almidón, inulina, maltosa y glucosa, se demuestra la influencia de las características estéricas del indicador electroosmótico sobre su velocidad de migración, aun cuando no sobre su posición final de equilibrio, lo que debe tenerse en cuenta para la determinación de movilidades absolutas de partículas, según se demuestra con seroproteínas, con las que, utilizando distintos indicadores, se obtuvieron valores diferentes para sus movilidades electroforéticas.

19.^a Se describe con todo detalle y se justifica la elección del artificio experimental y de la técnica operatoria adoptados, a la vista de la influencia de los diversos factores que intervienen en el proceso. Sobre el caso particular del revelado de proteínas con azul de bromofenol, se hace un estudio experimental amplio sobre los diversos factores que determinan la eficacia y anomalías de la tinción (pH, concentración salina, calentamiento desigual del electroforegrama, diferencias de rugosidad del papel, etc.). Al tratar de la fotometría directa del electroforegrama revelado, se da cuenta del estudio comparativo realizado con diversos transparentantes, destacando los más convenientes. Se propone un nuevo método de trazado de diagramas, a partir de las lecturas fotocolorimétricas tras elución.

20.^a Generalizando el procedimiento de separación cromatográfica de FLOOD, HIRST y JONES, se propone una técnica electroforética discontinua, para su utilización con fines preparativos. En el campo de la electroforesis preparativa continua, se discuten y comparan, desde un punto de vista eminentemente experimental, las condiciones de trabajo de DURRUM y de GRASSMANN y HANNIG, así como las de otras modificaciones originales adoptadas. Con resultados muy significativos, recogidos gráficamente, se estudia la distribución de potenciales en la cortina de papel, para cada una de las técnicas seguidas. Se interpretan distintos fenómenos relacionados con los factores de clara influencia en el proceso electroforético continuo. En el estudio realizado sobre la componente de descenso, en relación con la de campo eléctrico, se destacan las ventajas de un mayor ángulo de inclinación (una de las modificaciones introducidas) en la disposición de GRASSMAN y HANNIG.

21.^a Se da cuenta de diferentes dispositivos de electroforesis continua montados por nosotros, sobre la base de un estudio experimental previo. Uno de los más característicos consiste en un marco que tensa el papel, dispuesto de tal manera que el conjunto puede adoptar distintas inclinaciones, con lo cual se gobierna la componente de descenso. Se describe la confección, mediante un artificio análogo al anterior, de un dispositivo de electroforesis continua de fondo (sobre celulosa u otros soportes inertes) con el que pueden lograrse separaciones en escala semiindustrial y aun industrial.

22.^a Se ofrece un adelanto sobre una técnica electroforética original, basada en la superposición de una corriente alterna a la continua base. Se da cuenta de una serie de circuitos de tanteo y se explica y esquematiza el provisionalmente adoptado. Se refieren los intentos experimentales

de activación de partículas, mediante la actuación de la corriente alterna. previa al paso de la continua, y, de pasada, se discuten, desde un punto de vista crítico, los experimentos de algunos autores con corrientes pulsantes, para destacar que nada tienen que ver, ni por su forma ni sobre todo por su naturaleza, con los nuestros de alterna.

El trabajo experimental se realizó en los laboratorios de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Murcia.

SECCION BIBLIOGRAFICA

Finar, I. L.—QUIMICA ORGANICA.—Dos volúmenes (I: «Principios fundamentales, y II: «Estereoquímica y química de los productos naturales»). Editorial Alhambra, S. A. Madrid, 1960. Volumen 1.º, 932 págs.; volumen 2.º, 771 págs.

Al año de publicarse el volumen II de la traducción al español de la obra «Química Orgánica» de I. L. Finar, aparece el volumen I, con lo que se completa la edición española de este valioso tratado. Hemos preferido esperar esta aparición para enjuiciar el libro a la vista de su contenido completo.

La obra del profesor Finar, ya conocida por sus ediciones inglesas, ha sido frecuentemente usada para consulta y enseñanza, avalada por el hecho de ser texto de Química Orgánica en los grados General y Especial de la Universidad de Londres.

Podríamos decir que toda la experiencia del profesor Finar, adquirida en muchos años de enseñar Química Orgánica, ha sido vertida en la presente obra, que consigue poner al alcance del estudiante uno de los textos de la asignatura más completos y de visión más al día en los conocimientos de la Química Orgánica. Ya en el prólogo de la primera edición inglesa, aparecida en 1950, aseguraba el autor su convicción de que el mejor método pedagógico de la Química es, primero, el estudio de las teorías electrónicas y, posteriormente, la aplicación de estos principios en todo momento con lo que se logra dar a esta ciencia cierta cohesión y amenidad apreciadas rápidamente por el estudiante que encuentra facilitado su estudio.

Tal vez en esta creencia del profesor Finar, puesta en práctica en este libro, esté el mayor acierto de la obra. Una simple visión de conjunto es suficiente para valorar su diferencia respecto a otros muchos textos anteriores con una sistemática trasnochada que aburre al estudiante al no aclararle de una manera convincente los conceptos básicos en que se apoyan los hechos químicos que intenta aprender. De ahí, que siempre se haya considerado a la Química Orgánica como un conjunto de hechos sin conexión alguna que la experiencia ha ido acumulando; pero los últimos años han sido decisivos en la evolución de esta ciencia al llegar a explicar, de manera eficiente, todos aquellos hechos con la



ayuda de las teorías electrónicas que se venían desarrollando. Estas ideas no han escapado a la intuición del autor y, puestas al servicio de su dilatada experiencia docente, han contribuido a que su obra sea un éxito en las Universidades inglesas.

Puede pensarse que la edición española, ahora terminada de publicar, ha de tener la misma favorable acogida, porque lo que acabamos de apuntar más arriba no quiere decir que se hayan descuidado en esta obra los aspectos prácticos de la Química Orgánica, pues tanto los métodos preparativos como las propiedades y reacciones de las funciones y compuestos orgánicos, son tratados con todo detalle e incluso con mayor extensión que en los textos clásicos.

El volumen I, dedicado al estudio de los principios fundamentales, se inicia con una introducción histórica y el desarrollo de los conceptos básicos de la asignatura. Una breve introducción al análisis orgánico antecede la exposición de los conceptos electrónicos fundamentales en el estudio de las moléculas; su extensión es suficiente para dar ideas precisas sobre el fundamento de los procesos químicos que luego, en el trascurso del libro, sirven de complemento y aclaración de los hechos que se tratan.

Los hidrocarburos saturados y no saturados se exponen después, como iniciación al estudio de las funciones, junto con un estudio detallado de la química del petróleo y del gas natural. A continuación trata los derivados halogenados de los hidrocarburos alifáticos, los alcoholes, éteres, aldehidos y cetonas, los ácidos grasos y sus funciones derivadas. La parte dedicada a los ácidos cetónicos incluye el estudio de la tautomería, desarrollada a través de las teorías más modernas. Estudia después los polioles, enoles y compuestos carbonílicos y carboxílicos no saturados y en capítulos posteriores los compuestos alifáticos con nitrógeno, azufre, fósforo, arsénico, silicio y los compuestos órgano-metálicos.

Complementa esta primera parte del volumen primero el estudio de los ácidos dicarboxílicos saturados y no saturados e hidroxiaácidos, incluyendo también una breve introducción a la estereoquímica y a los hidratos de carbono.

La segunda parte, dedicada a los compuestos alicíclicos, desarrolla de un modo bastante extenso y completo las teorías sobre la formación, tensiones y conformación estérica de los anillos carbonados.

La parte tercera contiene el estudio de los compuestos aromáticos y se refiere a los hidrocarburos bencénicos, sus derivados halogenados, nitrados, aminas aromáticas, sales de diazonio, ácidos sulfónicos, fenoles, alcoholes, aldehidos, cetonas, quinonas y ácidos aromáticos. El capítulo sobre hidrocarburos derivados del benceno desarrolla los conceptos fundamentales sobre la constitución y estructura de los anillos aromáticos y estudia minuciosamente el sistema resonante del benceno. Las ideas actuales sobre la sustitución en el grupo bencénico y el mecanismo de la sustitución aromática están tratadas con una extensión poco corriente en libros, como éste, dedicados a fines didácticos.

Dedica la cuarta parte del volumen I a los compuestos heterocíclicos; el estudio de los colorantes incluye la relación entre el color y la constitución química así como su nomenclatura y un estudio detallado de los tipos más importantes.

Completa el volumen un apéndice con las reglas básicas de nomenclatura para los compuestos orgánicos. En otro apéndice se enumeran las publicaciones sobre química orgánica y algunas indicaciones sobre la manera de consultar la bibliografía y el uso del «Beilstein».



Cada capítulo, al final, inserta extensas citas bibliográficas seleccionadas de gran ayuda al estudiante que quiera alcanzar un conocimiento más completo de las materias expuestas. También cuenta cada capítulo con un cuestionario de preguntas, de mucha utilidad para repasar el contenido del texto, preguntas completadas al final de la obra con otras 50 seleccionadas de entre las propuestas por las comisiones de exámenes de la Universidad de Londres y el *Royal Institute of Chemistry*.

El volumen segundo, dedicado a la estereoquímica y a los productos naturales, se inicia con un capítulo que incluye el estudio de las relaciones entre las propiedades físicas y la constitución química, y comenta la utilidad del conocimiento exacto de algunas constantes y propiedades químicas en la investigación química orgánica. A continuación da cabida en 5 capítulos, al estudio de la estereoisomería en los que trata con un acierto poco común las ideas y métodos fundamentales de esta parte de la Química Orgánica. El estudio de los racémicos, la inversión de Walden, síntesis asimétrica, la isomería geométrica, la estereoisomería de los compuesto cíclicos, la atropoisomería y la estereoquímica de los alenos y espiranos se incluyen en esta parte, así como la estereoquímica del nitrógeno, fósforo y compuestos de otros elementos.

Inicia el estudio de las sustancias naturales con los hidratos de carbono y sigue con los terpenos y carotenos. A continuación, detalla los hidrocarburos aromáticos policíclicos, los esteroides y los azoles y azinas. Sigue con los aminoácidos, proteínas y enzimas, alcaloides, antocianinas, purinas y vitaminas. Finalmente introduce un capítulo sobre quimioterapia y cierra el volumen con el estudio de la hemoglobina, la clorofila y las ftalocianinas.

Del mismo modo que en el volumen primero, se incluye al final de cada capítulo una serie de citas bibliográficas de gran utilidad.

En conjunto, la obra constituye, como ya hemos dicho, un inmejorable tratado de Química Orgánica de gran utilidad tanto en el aula como en el laboratorio para libro de consulta, ya que los estudios monográficos incluidos en él, especialmente en el segundo volumen, son muy completos y detallados.

En resumen, una obra que se lee con placer y que viene a llenar el vacío provocado por la falta de un texto que abarcara la Química Orgánica completa y la desarrollara con una visión tan al día como en el presente caso.

Muy cuidada la traducción que, bajo la dirección del profesor Pérez A. Osorio, han realizado los doctores Fariña Pérez y Alberola Figueroa. Esmerada la impresión con el gusto habitual de Editorial Alhambra, S. A., aunque resulta extraño que los dos tomos se hayan encuadernado con distinto formato.

F. Cebrián

