

REVISTA  
DEL  
INSTITUTO BACTERIOLÓGICO  
DEL  
DEPARTAMENTO NACIONAL DE HIGIENE

Proteínas y Ácidos

Por FERNANDO MODERN

Completando el trabajo anterior, realizado con el Profesor Pauli en Viena, y ya publicado en el *Biochemische Zeitschrift* y Asociación Química Argentina (1), presento este estudio, que completa el anterior, agregando nuevas deducciones y nuevos experimentos.

En la primera parte de este trabajo, tratamos la teoría del punto isoeléctrico, haciendo resaltar los hechos que a nuestro parecer aclaran en gran parte y la completan.

En la segunda parte estudiamos las combinaciones de las proteínas con los ácidos en concentraciones elevadas, aplicando el método de Pauli, y la nueva teoría de la disociación. Hemos seguido en esta parte el mismo método que el que emplea este autor, obteniendo resultados que están en todo de acuerdo con los suyos.

Es de gran importancia el estudio del comportamiento de las proteínas en presencia de los ácidos, porque permite adelantar el estudio de la constitución y estructura de estas proteínas.

Desde los estudios y trabajos fundamentales de E. Fischer, demostrando que las proteínas estaban formadas por cadenas de aminoácidos y de los publicados por Stiasny, Bergmann, Herzog, Troensegaard y Abderhalden poco se había adelantado en el conocimiento de estas sustancias. También se estudia la estructura de las proteínas (1), por vía enzimática, purificando estos catalizadores por adsorción ( $\text{Al}(\text{OH})_3$ , carbón animal, etc.). Más tarde Sørensen, Loeb y Pauli

y sus colaboradores, estudian las proteínas desde un punto de vista distinto aplicando métodos físico-químicos y coloidales con los resultados favorables que todos conocemos.

De acuerdo con las ideas de Paul <sup>(2)</sup> podemos dividir a las proteínas en dos grandes grupos.

a) Las estables en la zona isoelectrica y b) las inestables.

Entre las inestables podemos mencionar a la caseína, euglobulina, fibrina, etc., coloides liófilos que se pueden obtener en cualquier grado de dispersión y su concentración.

Las albúminas (sero, ovo) la glutina y la hemoglobina podemos citarlas como ejemplos de coloides estables en la zona isoelectrica.

Estas sustancias las podemos obtener hoy día, al estado puro, empleando ya sea el método de Sørensen, o bien el método de Pauli.

El método de Sørensen consiste en obtener la proteína al estado cristalizado, pudiéndose recrystalizar varias veces. El de Pauli, consiste en electrodiálisis (E. D.) la proteína eliminando todos los electrolitos.

Este último método es indiscutiblemente superior al primero, pues permite obtener una proteína libre en absoluto de sales y de una conductibilidad casi igual a la del agua destilada.

También se pueden combinar éstos dos métodos obteniéndose, por ejemplo, una albúmina por cristalización, eliminándole luego los vestigios de sales ( $SO_4$   $Am_2$ ) por E. D. En proteínas obtenidas por estos métodos se han hecho determinaciones de pesos moleculares. The Svedberg <sup>(3)</sup> obtiene para la hemoglobina un valor igual a 67.700, y para la ovoalbúmina un valor igual a 35.000.

Svedberg emplea para estas determinaciones el método ideado por él, de ultracentrifugación. S. P. L. Sørensen encuentra, para su ovoalbúmina cristalizada el mismo valor empleando el método de la presión osmótica. Lecomte de Noüy empleando el método de torsión para medidas de tensión superficial, encuentra para la ovoalbúmina sin purificar un peso molecular de 23,750, y para las globulinas 27.000.

Nosotros <sup>(5)</sup> hemos hallado para la glutina electrodiálisis un valor igual a 39.700.

Loeb <sup>(6)</sup> tiene un método propio para purificar las proteínas y consiste sencillamente en llevarlas al punto isoelectrico. El grado de purificación es menor que el obtenido por los procedimientos anteriores.

Loeb ha basado su método en la observación de Sørensen, de que en el punto isoelectrico las proteínas no se combinan ni con los ácidos ni con las bases, ni con las sales. Como veremos más adelante, esto no es del todo exacto.

Por la enorme constancia del comportamiento químico o físico-químico de las soluciones proteicas obtenidas por el método de Pauli, podemos admitir que contienen una proteína de constitución y concentración definidas.

El estudio del comportamiento de las proteínas con los ácidos lo podemos dividir en dos partes.

1) El comportamiento de las proteínas con los ácidos, en la zona isoeléctrica.

2) El comportamiento de las proteínas con los ácidos estando estos en concentraciones elevadas. (0,01 *n* — 0,05 *n* HCl).

La primera parte, que realizamos en Viena, ya fué objeto de una publicación y sólo aquí haremos algunas consideraciones importantes que nos faltaban, agregando nuevas deducciones basadas en los experimentos que efectuamos y que el profesor Pauli presentó en el congreso de Dusseldorf el año pasado. (2)

La 2.ª parte, aún no publicada, trata del comportamiento de la ovoalbúmina con el ácido clorhídrico en concentraciones elevadas. (0,01 — 0,05 *n*).

## PRIMERA PARTE

### ZONA ISOELÉCTRICA

Las nuevas investigaciones tienen en cuenta el carácter anfótilico de las proteínas debido a los amino-ácidos que las constituyen.

Admitamos, como la generalidad de los autores, que la molécula de albúmina está constituida por un núcleo R, al que se hallan fijado grupos ácidos y amidógenos. Representaremos la molécula neutra por la fórmula simbólica  $\text{NH}_3 \text{OH} - \text{R} - \text{COO H}$  en el que se destaca bien su carácter anfótilico. Su disociación electrolítica se realizará en las dos formas posibles:



y si representamos por  $\text{A}^-$  al ión proteico negativo  $\text{NH}_3 \text{OH} - \text{R} - \text{COO}^-$  y por  $\text{A}^+$  al ión proteico positivo  $\text{NH}_3^+ - \text{R} - \text{COO H}$  las moléculas neutras serían  $\text{A}^- \text{H}$  o  $\text{A}^+ \text{OH}$  y podríamos representar su disociación con el esquema simplificado:



Las concentraciones de  $A^-$  y  $A^+$  dependerán de los valores de  $C_{H^+}$  y  $C_{OH^-}$  en forma tal, que para grandes valores de  $C_{H^+}$  predominará el ión proteico negativo y para grandes valores de  $C_{OH^-}$  predominará el ión proteico positivo.

Hemos trabajado con soluciones ácidas de proteína a saber: de ovalabúmina al 1,57 % con un  $C_H = 1,67 \cdot 10^{-5} n$ , de seroalbúmina al 1 % con un  $C_H = 3,30 \cdot 10^{-6} n$  y de glutina al 1,2 % con un  $C_H = 7,88 \cdot 10^{-6} n$ .

En estas soluciones proteicas  $A^- > A^+$  como lo hemos establecido experimentalmente por electroforesis (hay anaforesis, es decir migración de la proteína hacia el ánodo) lo que significa que sus concentraciones en iones  $H$  tienen valores mayores que los correspondientes a sus puntos isoelectricos.

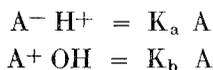
El exceso de  $A^-$  se puede calcular, midiendo con el potenciómetro, el  $C_H$  de la solución, pues el ion  $H^+$  equilibra en su carga al ion  $A^-$ .

La determinación de la actividad del  $H^+$  se hace fácilmente en estas soluciones proteicas por el método potenciométrico.

La determinación de ion  $H$  nos da la diferencia entre  $A^-$  y  $A^+$ .

Pauli calculando la concentración de los albuminiones negativos, le asigna a una solución de ovoalbúmina un valor de  $3 \cdot 10^{-4} n$  y teniendo en cuenta la concentración proteica total se deduce que 1/24 de las partículas proteicas llevarán carga negativa. Se pregunta: Suponiendo que los albuminiones sean monovalentes: ¿En qué forma se encuentra el resto de la proteína?

Se puede contestar a esta pregunta estudiando el comportamiento de estas sustancias en la zona isoelectrica. Según la teoría de L. Michaelis que hemos expuesto en el trabajo anterior, el autor supone que en toda solución proteica además de los iones  $A^+$  y  $A^-$  existe una forma neutra  $A$ . Los iones albumínicos se comportan como ácidos o bases débiles con sus constantes de disociación respectivas  $K_a$  y  $K_b$  de manera que:



En el punto isoelectrico ( $\gamma$ )  $A^- - A^+ = 0$ , y según la fórmula conocida de Michaelis, el  $C_H$  en dicho punto ( $\gamma$ ) está dado por la ecuación:

$$(\gamma) = \sqrt{\frac{K_a K_w}{K_b}}$$

siendo  $K_w$  la constante de disociación del  $H_2O$ .

Esta teoría se basa en ciertas afirmaciones que no se mencionan en general. Se consideran por ejemplo que sólo hay una sola clase de iones proteicos positivos  $A^+$  y negativos  $A^-$ ; que todo aumento en

los  $H^+$  antes del ( $\gamma$ ) actúa disminuyendo la disociación de la proteína, hasta obtener  $A^+ = A^-$ . En efecto, al agregar un ácido fuerte muy disociado como el  $H^+ Cl^-$  sobre otro muy débil como la proteína  $A^- H^+$ , (muy poco disociado) disminuye aun más la disociación de ésta, transformándose parte de  $A^-$  en moléculas neutras  $A$ . Es decir que  $A^-$  disminuye hasta igualar a  $A^+$ . Michaelis dice: Cuando introducimos un anfolito en una solución de un determinado  $CH$ , se comportará como base si  $CH > \gamma$ , como ácido si  $CH < \gamma$  y si  $CH = \gamma$  no influye sobre el  $CH$  del líquido.

Con respecto a esto Sörensen ha hecho determinaciones prolijas. Agregaba cantidades crecientes de ácido, en distintas concentraciones proteicas, y observaba que el punto isoeléctrico era el mismo para las distintas concentraciones de proteína.

Los investigadores del Instituto de Físico-Química de la Universidad de Viena (<sup>9</sup>) fueron los primeros en estudiar las distintas propiedades de las proteínas ionizadas, comparándolas con las neutras.

Hallaron que las proteínas ionizadas tienen viscosidad mayor y menor precipitabilidad por el alcohol.

Pauli y Samec (<sup>10</sup>) empleando mezclas puffer y concentraciones crecientes de proteínas (0,2 % a 1 %) llega a la conclusión de que no interesa conocer la concentración proteica siempre que el ( $\gamma$ ) se determine con mezclas puffer.

Luego los postulados de la teoría de L. Michaelis son los siguientes:

1.º En el punto isoeléctrico hay un máximo de partículas neutras.

2.º El punto isoeléctrico es independiente de la concentración del anfolito.

Este último que es exacto cuando se emplea mezclas puffer, no pasa en realidad cuando se emplean ácidos.

#### VISCOSIDAD DE GLUTINA + ACIDO SULFÚRICO (35° C.)

$nH_2SO_4$	Glutina 1,09 % t/t <sub>0</sub>	Glutina 0,66 % t/t <sub>0</sub>	Glutina 0,33 % t/t <sub>0</sub>
0	1,458	1,248	1,113
$5 \cdot 10^{-5}$	—	1,241	1,111
$1 \cdot 10^{-4}$	1,453	1,237	1,109*
$2 \cdot 10^{-4}$	1,445	1,233*	1,111
$2 \cdot 5 \cdot 10^{-4}$	1,443*	1,234	1,113
$4 \cdot 10^{-4}$	1,448	1,241	1,118
$5 \cdot 10^{-3}$	1,453	1,245	—

En el cuadro anterior vemos que el ( $\gamma$ ) se desplaza. Nosotros efectuamos una medida directa del comportamiento de las proteínas con los ácidos en concentraciones pequeñas ( $1.10^{-4}$  —  $1.10^{-2}$   $n$  HCl) y encontramos como se puede ver en el cuadro a continuación, que la mayor parte de los iones  $H^+$  agregados desaparecen, fijándose a la proteína.

$n$ HCl (agregado)	$C_H$ (Glutina)	$C_H$ (Seroalbúmina)
0,0	$7.88.10^{-6}$	$3.30.10^{-6}$
$1,10^{-4}$	$9.42.10^{-6}$	$6.22.10^{-6}$
$3,10^{-4}$	$1.06.10^{-5}$	$7.43.10^{-6}$
$5,10^{-4}$	$1.34.10^{-5}$	$1.17.10^{-5}$
$1,10^{-3}$	$1.96.10^{-5}$	$2.21.10^{-5}$

La glutina pura tiene una actividad iónica de  $7.88.10^{-6} n$  H. Determinamos el punto isoeléctrico de esta substancia por el método de la precipitación alcohólica, hallando un valor comprendido entre  $1,06$  —  $1,34.10^{-5} C_H$ .

Para obtener esta concentración de ion H, en otras palabras para aumentarle  $2,10^{-6} n H^+$  hemos tenido que agregarle 150 veces más cantidad de ácido que lo que teóricamente hubiera sido necesario agregarle al agua para llevarlo al mismo pH. Se le agregó algo más de  $3.10^{-4} n$  HCl. Empleando mezclas puffer (ácido acético-acetato de sodio) hemos encontrado un ( $\gamma$ ) para la seroalbúmina (1%) comprendido entre  $8,10^{-6}$  y  $1,01.10^{-5} C_H$ . La misma seroalbúmina en HCl nos dió un ( $\gamma$ ) comprendido entre  $C_H = 6,22.10^{-6}$  y  $7.43.10^{-6}$ . La actividad del ion H en la seroalbúmina pura (1 %) es igual a  $3,30.10^{-6}$ , teóricamente necesitamos para llevarla al ( $\gamma$ ) más o menos  $4,10^{-6} C_H$ , en cambio prácticamente le hemos tenido que agregar una cantidad de HCl comprendido entre 1 y  $3.10^{-4} n$  HCl.

Por estos experimentos vemos que cuando el sistema *HCl proteína*, tiene una concentración de ion H igual o menor al del punto isoeléctrico el ácido se halla en su totalidad fijado a la proteína.

La fijación del ácido a la proteína también la hemos estudiado combinando las medidas potenciométricas de ion  $H^+$ , con las de conductibilidad. Por la medida de  $C_H$  se conoce la conductibilidad que le corresponde al HCl libre.

Ahora bien, si restamos a la conductibilidad hallada experimentalmente ( $K$ ) la conductibilidad que le corresponde al HCl, tenemos un

resto de conductibilidad que sólo puede ser debido a las sales proteicas. Estas aumentan a medida que agregamos cantidades crecientes de ácido. En el siguiente cuadro exponemos parte de los resultados obtenidos.

Glutina 1,2 % + HCl	
$n$ HCl	K — K <sub>HCl</sub>
$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 92 \cdot 10^{-5}$
$3 \cdot 10^{-4}$	$3 \cdot 75 \cdot 10^{-5}$
$5 \cdot 10^{-4}$	$4 \cdot 96 \cdot 10^{-5}$

Con la seroalbúmina y con la ovoalbúmina pasa lo mismo: a medida que agregamos cantidades crecientes de HCl, aumenta la conductibilidad debida a las sales proteicas.

Seroalbúmina 1 % + HCl		Ovoalbúmina 1,57 % + HCl	
$n$ HCl	K — K <sub>HCl</sub>	$n$ HCl	K — K <sub>HCl</sub>
$1 \cdot 10^{-4}$	$2,1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$2,90 \cdot 10^{-5}$
$3 \cdot 10^{-4}$	$3,0 \cdot 10^{-5}$	$3 \cdot 10^{-4}$	$3,94 \cdot 10^{-5}$
$5 \cdot 10^{-4}$	$4,1 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-4}$	$5,44 \cdot 10^{-5}$

Vemos pues, que en la misma zona isoelectrica, es decir en la región que hay un aumento de proteínas neutras (máximo de precipitación alcohólica, mínimo de viscosidad) hay también un crecimiento en la conductibilidad debido al aumento de los iones proteicos. Este hecho es a primera vista paradójico. ¿Cómo es posible que el crecimiento de partículas neutras vaya ligado a un aumento en la conductibilidad? Más adelante explicaremos este fenómeno, teniendo en cuenta las teorías de Wo Pauli, basadas en hechos experimentales. Por lo pronto toda teoría del punto isoelectrico deberá explicar los hechos siguientes observados en la acción de ácidos fuertes sobre soluciones proteicas.

a) Elevación mínima en la concentración de ion — H<sup>+</sup> y una completa desaparición de los iones H<sup>+</sup> del ácido agregado.

b) Necesidad de emplear una cantidad mucho mayor de ácido (entre 100 y 150 veces más) que la necesaria teóricamente para llevar la solución al punto isoelectrico.

c) Marcha paralela de la fijación del ácido con el crecimiento de las partículas neutras y con el conocido aumento de la fluidez y aumento de precipitabilidad por el alcohol.

d) Desplazamiento del óptimo de fluidez y del máximo de precipitabilidad alcohólica con cantidades crecientes de proteínas (considerando, naturalmente, las mismas concentraciones finales de los ácidos).

e) Cataforesis en la región del mínimo de viscosidad y del máximo de precipitabilidad por el alcohol (la proteína colocada en un campo eléctrico sufre un pequeño transporte hacia el cátodo (Wo Pauli y Samec).

Bjerrum <sup>(1)</sup> publica un importante trabajo que se relaciona a la físico-química de los aminoácidos, y llega a la conclusión de que la parte que se considera como no disociada, de esas sustancias, en realidad es portadora de 2 cargas, una positiva y otra negativa, en la misma molécula, neutralizándose mutuamente y no siendo conductora de la electricidad (dípolo).

Podemos representarla de la siguiente manera  $+NH_3$ . R.  $COO^-$ . Las constantes de disociación ( $K_a$ ,  $K_b$ ) calculadas por este autor en los aminoácidos están de acuerdo con los valores experimentales hallados (\*).

Habiendo dado esta teoría valores que concuerdan con la realidad y siendo admitida por la mayoría de los físicos teóricos, Pauli creyó poder aplicarla a las proteínas, dado que éstas no son más que cadenas de aminoácidos y veremos como así logró explicar en gran parte, muchos puntos oscuros de la teoría de Michaelis.

En una solución proteica tenemos iones de la forma  $A^-$ ,  $A^+$  y  $+A^-$  y moléculas A de las proteínas sin ionizar. Tratando esta solución con HCl en concentraciones pequeñas la reacción de cloruración sólo puede efectuarse, con los iones  $A^-$  permaneciendo constantes los iones  $A^-$  y  $A^+$ . La ecuación sería:



transformando  $A^-$  en la forma  $+A^-$ .

Esta reacción no sufrirá cambios fundamentales si en vez de considerarla forma anfi-ionica, consideráramos cualquier otra forma neutra.

(\*) N. BJERRUM, *Zeitsch f. Phys. Chem.*, 104, 147, 1923.

Para cada ion  $H^+$  reaccionante aparece un  $Cl^-$ , no variando los iones  $H$  sensiblemente.

La mayor parte del ácido agregado es empleado en transformar los  $A^+$  en  $+A^-$  y el aumento de los iones  $H$  sólo corresponde a 1/100 partes del ácido agregado.

La migración de los iones  $Cl^-$  es mayor que la de los iones albumínicos y su aparición en el electrólito da por resultado un aumento en la conductibilidad, sin tomar en cuenta los iones  $H$ , que por su débil aumento no influyen a pesar de la sustitución de los aniones  $A^-$  por anfiones  $A^{+-}$ . En otras palabras el aumento de la conductibilidad en la zona isoeléctrica es debida al ion  $Cl^-$  (en nuestro caso). Vemos pues, que se forma  $-A^+$  a expensas de  $A^-$  es decir, que hay una disminución de los albuminiones negativos formándose anfiones, que desde el punto de vista de la conductibilidad son neutros.

Así se explica el mínimo de viscosidad y el máximo de precipitabilidad alcohólica, pues transformamos iones  $A^-$  en  $-A^+$  por el agregado del  $HCl$ , lo que nos explica claramente la importancia de la concentración proteica en la determinación del punto isoeléctrico con ácidos.

Podemos afirmar que el ácido (antes y en la zona isoeléctrica) no reacciona ni con  $A$  ( $NH_2$ ,  $R$ .  $COOH$ ) ni con  $+A^-$ , pues si así lo hiciera formaría nuevos iones protéicos, y en realidad se observa disminución de iones protéicos y máximo de partículas neutras en el punto isoeléctrico.

*La acción de los ácidos sobre las proteínas en la zona isoeléctrica se explica admitiendo que los iones  $A^-$  reaccionan con el  $H^+$  del ácido dando  $-A^+$*

A esto se debe el aumento de albuminiones neutros por el agregado de  $HCl$ , hasta alcanzar el ( $\gamma$ ).

Resumiendo, tenemos que, en la zona isoeléctrica pueden llegar a desaparecer los albuminiones negativos  $A^-$ , encontrándose solamente  $A^+$  y  $A^{+-}$  en la proporción  $+A^- > A^+$ . Además habrá iones  $H^+$  y el anión del ácido, en nuestro caso  $Cl^-$ , encontrándose en la siguiente relación  $A^+ + H^+ = Cl^-$ .

Esto también estaría de acuerdo con el hecho observado por Pauli y Samec de que en la zona del mínimo de viscosidad y máximo de precipitación alcohólica en un campo eléctrico existe un transporte de la proteína hacia el cátodo.

Haciendo un examen atento de las experiencias de Sørensen sobre el ( $\gamma$ ), Pauli (<sup>2</sup>) demuestra que en realidad el mismo autor encuentra que el punto isoeléctrico se desplaza en concentraciones crecientes de

proteína, admitiendo Sørensen que este pequeño desplazamiento es debido a la poca exactitud de estas determinaciones.

Este autor cree que siendo la concentración de ácido tan pequeña no hay exactitud en las mismas. Nosotros hemos operado en concentraciones bajas de ácido haciendo las determinaciones por duplicado y a veces por triplicado encontrando siempre, prácticamente, los mismos valores.

Están pues, explicados de una manera teórica experimental, los puntos oscuros de la teoría de L. Michaelis, viendo pues lo difícil que es hoy día el dar una teoría que no esté basada en experiencias minuciosas, como sería en el caso presente.

## SEGUNDA PARTE

### PROTEÍNAS EN CONCENTRACIONES ELEVADAS DE ÁCIDOS

#### PREPARACIÓN DE LA OVOALBÚMINA PURA.

Una vez separada la yema de huevos de gallina agitamos la clara hasta la formación de espuma consistente obteniéndose así un líquido de viscosidad homogénea, al cual se le agregó igual cantidad de agua y algunas gotas de toluol.

Pasamos a la diálisis, para eliminar por este método la mayor parte de los electrólitos y separar también gran parte de las globulinas.

#### CONDUCTIBILIDAD DE LA OVOALBÚMINA DURANTE LA DIALISIS.

Duración de la diálisis (en días)	K (conductibilidad)
0	$5 \cdot 10^{-3}$
2	$7.5 \cdot 10^{-4}$
3	$4.58 \cdot 10^{-4}$
5	$4.58 \cdot 10^{-4}$

Llegamos a obtener al quinto día un valor constante que seguramente se hubiera podido hacer descender aun más, por una diálisis más prolongada.

Sólo nos interesaba eliminar una parte de las sales y continuar luego con la electro-diálisis hasta la eliminación total.

Pasamos a electrodiagnosticarlo(\*) con 220 V (intercalando lámparas) en un modelo grande (1000 cm<sup>3</sup>.) de electrodiagnosticador Pauli y observamos enseguida el interesante fenómeno de la separación en capas y de la precipitación del colorante de la ovoalbúmina. La conductibilidad de la capa superior era diferente de la inferior. Esta diferencia se hace cada vez menor a medida que avanza la electrodiálisis.

CONDUCTIBILIDAD DE LA OVOALBÚMINA DURANTE LA ELECTRODIÁLISIS EN EL APARATO GRANDE

Duración de la electrodiálisis (en días)	K (Capa superior)	K (Capa inferior)
1	$4.35.10^{-5}$	$2.13.10^{-5}$
2	$3.47.10^{-5}$	$2.06.10^{-5}$
3	$2.34.10^{-5}$	$1.60.10^{-5}$

Obtenemos así una albúmina de color amarillo verdoso completamente transparente y cuya globulina ha precipitado casi en su totalidad. Mezcladas las dos capas nos dieron por conductibilidad  $K = 2.23.10^{-5}$ . Como aún contenía vestigios de globulina pasamos a electrodiagnosticarlo en el aparato mediano por fracciones (capacidad 300 cm<sup>3</sup>., electrodos de platino) previo el agregado de sales. (Método Adolf-Pauli).

La Dra. M. Adolf del Instituto de Viena demostró: que electrodiagnosticando mezclas de albúminas y globulinas en presencia de sales (concentración final entre N/100 — N/1000) se obtiene la precipitación total de las globulinas.

Siguiendo estas indicaciones colocamos 300 cm<sup>3</sup>. de la ovoalbúmina electrodiagnosticada en el aparato mediano, previo el agregado de 3 cm.<sup>3</sup> de SO<sub>4</sub>K<sub>2</sub> N/1.

CONDUCTIBILIDAD DE LA OVOALBÚMINA EN EL APARATO MEDIANO (PREVIO AGREGADO DE SO<sub>4</sub>K<sub>2</sub>).

Duración de la electrodiálisis (en días)	K Capa superior	K Capa inferior	Reacción globulinas
1	$1.93.10^{-4}$	$2.45.10^{-5}$	Negativa
3	$1.72.10^{-5}$	$1.65.10^{-5}$	Débil positiva

(\*) Bibliografía sobre electrodiálisis se encuentra en DHÉRE, *Ch. - Koll. Ziets* Marzo, 1927.

Como la capa inferior aun contenía vestigios de globulina (reacción con  $\text{SO}_4\text{Am}_2$ ) le volvimos a agregar la misma cantidad de sal continuando la electrodiálisis, repetimos nuevamente esta operación y así obtuvimos una ovoalbúmina *libre de globulina* que tenía una conductibilidad de  $K = 2,63.10^{-5}$ . Como esta era algo alta, volvimos a electrodiálizar aplicando 440 V y así obtuvimos una ovoalbúmina de una conductibilidad:  $K = 1,63.10^{-5}$ . Procedimos de la misma manera con las otras partidas obteniendo conductibilidades finales parecidas a esta última. Mezcladas las diferentes partidas nos dió una conductibilidad media:  $K = 1,625.10^{-5}$  y un contenido de ovoalbúmina igual a 3,16 %. (Ensayo gravimétrico).

Esta ovoalbúmina la conservamos en frascos cerrados pues de otra manera aumenta su conductibilidad, pues parte se combina con el  $\text{CO}_2$  del aire.

#### MEDIDA DE $P_H$ , $P_{Cl}$ y $K$

En las concentraciones de ácido que operamos (0,01 n — 0,05 n) llevaron a cabo las medidas sin ningún inconveniente no siendo necesario hacer corrección alguna por la combinación del calomel. (\*) Las medidas de  $P_{Cl}$  se hicieron como en el trabajo anterior electrométricamente.

Las medidas de  $P_H$ , se hicieron en el electrodo rotativo de Pauli con  $\text{H}_2$  puro, obtenido por electrólisis de una solución de  $\text{Na OH}$  al 10 % (12).

Hicimos las medidas de conductibilidad en un termostato a 25° C. Todas las operaciones, como en el trabajo anterior, las hacíamos por triplicado.

Completando experiencias anteriores hicimos medidas de conductibilidad y  $P_H$  de mezclas de ovoalbúmina +  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , con los siguientes resultados:

#### OVOALBÚMINA (CONCENTRACIÓN FINAL 1,57 %) + $\text{H}_2\text{SO}_4$ . $P_H$ y $K$

$\text{H}_2\text{SO}_4$	$K$	$P_H$	$C_H$	$P_{Cl}$ +calomel	$C_{Cl}$ +calomel
0	$1,73.10^{-5}$	4,7762	$1,67.10^{-5}$	3,4992	$3,17.10^{-4}$
0,0001	$3,30.10^{-5}$	4,7418	$1,81.10^{-5}$		
0,0003	$4,44.10^{-5}$	4,6816	$2,08.10^{-5}$	3,4217	$3,79.10^{-4}$
0,0005	$5,68.10^{-5}$	4,5869	$2,64.10^{-5}$	3,5077	$3,11.10^{-4}$
0,001	$9,51.10^{-5}$	4,5009	$3,16.10^{-5}$	3,5766	$2,65.10^{-4}$

(\*) Ver trabajo anterior.

Las medidas de  $C_H$  se hicieron en el sistema proteína +  $H_2SO_4$  las de  $C_{Cl}$  en el sistema proteína +  $H_2SO_4$  +  $Hg_2Cl_2$ .

La ovoalbúmina inicial tenía un  $C_H = 1,67 \cdot 10^{-5}$  y por el agregado de  $1 \cdot 10^{-3} n H_2SO_4$  sólo aumenta en  $1,49 \cdot 10^{-5} C_H$ . Luego casi el total del ácido se halla fijado.

Por las medidas de  $C_{Cl}$  en el sistema proteína +  $H_2SO_4$  +  $Hg_2Cl_2$  vemos que gran parte del calomel ( $3,17 \cdot 10^{-4}$ ) se halla combinado con la albúmina disminuyendo sólo una parte de esta combinación por el agregado del ácido sulfúrico, ( $2,65 \cdot 10^{-4}$ ). Agregando cantidades aun mayores de ácido este valor permanece constante.

Como se ve este valor constante  $2,60 \cdot 10^{-4} - n C_{Cl}$  no influye en la medidas en concentraciones elevadas, pues estas oscilan entre  $10^{-3} n$ .  $10^{-5} n C_{Cl}$ .

La F. E. M. (1) encontrada en nuestra cadena electrolítica, calculando según la clásica teoría de la disociación (grado de disociación) no nos da la repartición verdadera de los iones libres en solución, principalmente en las concentraciones en que operamos ( $0,01 n - 0,05 n$ . HCl).

En el trabajo anterior que hicimos con el Prof. Pauli operabamos en concentraciones pequeñas de ácido y aplicábamos la teoría clásica de la disociación. Las diferencias de los resultados obtenidos por cálculo aplicando ésta o la nueva teoría son insignificantes.

Pero ya no debemos calcular  $\alpha = \frac{\lambda}{\lambda_\infty}$  (\*) (grado de disociación) sino que todos los valores deberán ser referidos a las actividades iónicas.

La actividad se obtiene del producto  $c \cdot fa$  en donde  $c$ , es la concentración total del electrolito y  $fa$  representa el coeficiente de actividad (Aktivitätskoeffizient) en reemplazo del grado de disociación. Por lo tanto los valores  $P_H$  y  $C_H$  de la antigua nomenclatura Sørensen, pasan modificados según una nueva concepción de S. P. L. Sørensen y K. Linderström - Lang (13) a sus valores de actividades correspondientes a  $\pi_0$  (para  $18^\circ = 0,3357 V$ )  $Pa_H$  y  $a_H$ . Todo esto sería con respecto a la actividad del ión Cl. Con respecto a la actividad de ión Cl también es necesario hacer una pequeña corrección de acuerdo con los nuevos valores de la actividad del ClK; al valor  $\pi_0$  hay que agregarle 5 milivolts y corresponde en el  $P_{Cl}$  a un aumento de 0,086.

En las tablas de este trabajo se ha empleado el índice I para los

(\*) Ecuación de Arrhenius.

valores del HCl <sup>(14)</sup> el índice II para la mezcla HCl — proteínas y el índice III para la sal proteica pura (\*).

Dada la disociación completa de los electrolitos, una solución normal de HCl, será también normal para sus iones H<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> y éstas tres concentraciones iguales se representan:  $n_{\text{HCl}}, n_{\text{Cl}}, n_{\text{H}}, a_{\text{H}}, a_{\text{Cl}}$ , son las actividades iónicas en el HCl puro, considerando que no existe ninguna diferencia de concentración entre los iones H<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>.  $fa_{\text{H}}^{\text{I}} = fa_{\text{Cl}}^{\text{I}}$  son los coeficientes de actividad en las mismas condiciones anteriores.

En la tabla a continuación damos los valores anteriores al mismo tiempo fu, coeficiente de conductibilidad <sup>(14)</sup>.

(Esta tabla la hemos tomado del trabajo antes citado).

$n_{\text{HCl}} \dots \dots$	0,005	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05
$fa^{\text{I}}$ según Noyes y Mac- Innes $\dots \dots$	0,965	0,932	0,902	0,880	0,866	0,855
$fu^{\text{I}}$ según Kohlrausch $\dots$	0,9762	0,9661	0,9582	0,9504	0,9440	0,9399
$a_{\text{H}}^{\text{I}} = a_{\text{Cl}}^{\text{I}} \dots$	$4,743 \cdot 10^{-3}$	$9,171 \cdot 10^{-3}$	$1,780 \cdot 10^{-2}$	$2,596 \cdot 10^{-2}$	$3,409 \cdot 10^{-2}$	$4,207 \cdot 10^{-2}$

Para las mezclas proteína - ácido, empleamos los siguientes símbolos  $fa_{\text{H}}^{\text{II}}, fa_{\text{Cl}}^{\text{II}}, a_{\text{H}}^{\text{II}}, a_{\text{Cl}}^{\text{II}}$  <sup>(14)</sup>.

El cálculo de la concentración de la proteína combinada  $n_{\text{Clab}}$  puede hacerse en la siguiente forma: El valor  $a_{\text{H}}^{\text{II}}$  medido en la mezcla ácido proteína (que es menor que  $a_{\text{H}}^{\text{I}}$ ) dividida por su coeficiente de actividad  $fa_{\text{H}}^{\text{II}}$  nos da la concentración del ácido no fijado. Sin error apreciable puede admitirse  $fa_{\text{H}}^{\text{II}} = fa_{\text{H}}^{\text{I}}$  y se obtiene entonces como expresión de la cantidad de ion hidrógeno fijado, que es del mismo valor que la de sal proteica formada:

$$\text{CH (fijado)} = n_{\text{Clab}} = n_{\text{HCl}}^{\text{I}} - \frac{a_{\text{H}}^{\text{II}}}{fa_{\text{H}}^{\text{I}}} = \frac{a_{\text{H}}^{\text{I}} - a_{\text{H}}^{\text{II}}}{fa_{\text{H}}^{\text{I}}}$$

Debemos considerar la proteína en presencia del ácido como un electrolito fuerte; por ejemplo el cloruro de proteína, tiene que tener

(\*) En esta parte del trabajo seguimos al pie de la letra a J. Frisch, Wo. Pauli y Valko., *Bioch. Zeitsch.*, t. 164, C. 4/6, año 1925.

todos los Cl de la sal proteica disociados. De donde los iones Cl en la mezcla proteina-acido  $n_{\text{HCl}}^{\text{I}}$ , es igual a la concentracion de los iones Cl del acido y por lo tanto su producto con los coeficientes de actividad

$$fa_{\text{Cl}}^{\text{II}} \text{ es igual a la actividad Cl: } a_{\text{Cl}}^{\text{II}} \text{ de donde } fa_{\text{Cl}}^{\text{II}} = \frac{a_{\text{Cl}}^{\text{II}}}{n_{\text{HCl}}^{\text{I}}}$$

Por este camino se puede llegar al conocimiento de los coeficientes de actividad de los iones Cl, en la mezcla acido-proteina.

Tambien debemos conocer las actividades y coeficientes de actividad  $a_{\text{Cl}}^{\text{III}}$  y  $fa_{\text{Cl}}^{\text{III}}$  de sal proteica formada.

La diferencia entre el total de los iones Cl de la mezcla (indice II) y el de los hidrogenos (indice I) da la actividad Cl, de la sal proteica

$$a_{\text{Cl}}^{\text{III}} = n_{\text{Clab.}} - [ (a_{\text{H}}^{\text{I}} + n_{\text{Clab.}}) - a_{\text{Cl}}^{\text{II}} ] = a_{\text{Cl}}^{\text{II}} - a_{\text{H}}^{\text{I}}$$

Si hubiera solo HCl, la actividad del Cl debiera ser igual a la actividad del H.

Por lo tanto podemos decir que el exceso de la actividad Cl medida (sobre actividad H)  $a_{\text{Cl}}^{\text{II}} - a_{\text{H}}^{\text{I}}$  corresponde a la sal proteica.

Dividiendo la actividad de la sal proteica por su correspondiente concentracion molar tenemos el coeficiente de actividad de la sal proteica  $fa_{\text{Cl}}^{\text{III}} = \frac{a_{\text{Cl}}^{\text{III}}}{n_{\text{Clab.}}} \text{ (14).}$

Se puede, por ultimo, llegar a conocer el valor medio de los coeficientes de conductibilidad  $f_{\mu}^{\text{III}}$ , de una combinacion dada proteina-HCl siempre que dividamos  $k^{\text{II}}$ , por la conductibilidad total calculada usando los numeros de transportes y concentraciones de los electrolitos en solucion.

Los numeros de transportes se toman a 25°. Para el ion proteico se toma un valor  $u = 50 \text{ r } \Omega \text{ (15) (Adolf).}$

$$f_{\mu}^{\text{III}} = \frac{K^{\text{II}}}{[(n_{\text{HCl}}^{\text{I}} - n_{\text{Clab.}}) 426 + n_{\text{Clab.}} 126] 10^{-3}}$$

La concentracion de HCl libre, no combinado con la proteina, esta dado por

$$\frac{a_{\text{H}}^{\text{I}}}{fa_{\text{H}}^{\text{I}}} = n_{\text{HCl}} - n_{\text{Clab.}}, \text{ admitiendo que } fa_{\text{H}}^{\text{I}} = fa_{\text{H}}^{\text{II}}$$

La conductibilidad del HCl, en presencia de sal proteica esta dada por la expresion:

$$K_{\text{HCl}}^{\text{II}} = 426 a_{\text{H}}^{\text{II}} \frac{f_{\mu}^{\text{I}}}{f_a^{\text{I}}} \cdot \frac{1}{10^{-3}}$$

la conductibilidad de la sal proteica será

$$K^{\text{III}} = K^{\text{II}} - K_{\text{HCl}}^{\text{II}}$$

Finalmente obtenemos el coeficiente de conductibilidad de la sal proteica hallando la relación entre  $K^{\text{III}}$  y la conductibilidad calculada en función de la concentración y números de transporte:

$$f_{\mu}^{\text{III}} = \frac{K^{\text{III}}}{n_{\text{Clalb.}} \cdot 126 \cdot 10^{-3}}$$

\* \* \*

En el presente trabajo exponemos los resultados de nuestras medidas, efectuadas en soluciones proteicas en presencia de elevadas cantidades de HCl. De acuerdo con el método expuesto que sigue Pauli, hemos calculado la proporción en que se combinan ácido y proteína (ovoalbúmina) sólo hemos operado con la ovoalbúmina y en concentraciones diferentes a las empleadas por Frisch, Pauli y Valcov. Nuestros resultados que exponemos a continuación concuerdan en general con los de estos autores.

#### MEDIDA DE CH EN LA MEZCLA

OVOALBÚMINA (CONCENTRACIÓN FINAL 1,57 %) + HCl.

$n \text{ HCl}$	F. E. M. (en volts)	$P a_{\text{H}}^{\text{II}}$	$a_{\text{H}}^{\text{II}}$	CH (fijado) = = $n \text{ Clalb.}$
0,01	0,4455	2,7882	$1,63 \cdot 10^{-3}$	$7,48 \cdot 10^{-3}$
0,02	0,4095	2,1687	$6,78 \cdot 10^{-3}$	$10,73 \cdot 10^{-3}$
0,03	0,3910	1,8503	$1,41 \cdot 10^{-2}$	$11,13 \cdot 10^{-3}$
0,05	0,3730	1,5405	$2,88 \cdot 10^{-2}$	$11,43 \cdot 10^{-3}$

Hicimos estas medidas por triplicado, obteniéndose siempre valores que no diferían en más de 1-2 milivolts.

Los valores  $a_{\text{H}}^{\text{II}}$  se encuentran en el gráfico de la figura N.º 1.

MEDIDAS DE Pci EN LA MEZCLA OVOALBÚMINA  
(CONCENTRACION FINAL 1,57 %) + HCl.

$n^i$ HCl	F. E. M. (en volts)	$pa_{H}^{II}$	$a_{Cl}^{II}$
0,005	0,1355	2,4579	$3,58 \cdot 10^{-3}$
0,01	0,115	2,1910	$6,44 \cdot 10^{-3}$
0,02	0,1015	1,9587	$1,10 \cdot 10^{-2}$
0,03	0,0910	1,7779	$1,67 \cdot 10^{-2}$
0,05	0,0760	1,5197	$3,02 \cdot 10^{-2}$

Antes de hacer las medidas de Cci ensayamos la pureza del calomel y una vez comprobada ésta lo mezclamos bien en un mortero con mercurio para evitar su descomposición.

COEFICIENTE DE CONDUCTIBILIDAD DE LA MEZCLA DE LA OVOALBÚMINA  
(1,57 %) + HCl.

$n^i$ HCl	$K^{II}$	$K_{HCl}^{II}$	$K^{III}$	$f_u^{II}$	$f_u^{III (*)}$
0,01	$1,356 \cdot 10^{-3}$	$7,19 \cdot 10^{-4}$	$6,37 \cdot 10^{-4}$	0,6726	0,6762
0,02	$4,07 \cdot 10^{-3}$	$3,06 \cdot 10^{-3}$	$1,01 \cdot 10^{-3}$	0,7678	0,748
0,03	$3,42 \cdot 10^{-3}$	$6,48 \cdot 10^{-3}$	$1,94 \cdot 10^{-3}$	0,891	1,386
0,05	$1,63 \cdot 10^{-2}$	$1,35 \cdot 10^{-2}$	$2,80 \cdot 10^{-3}$	0,912	1,944

$n_{HCl}^i$  indica las concentraciones finales de HCl de la mezcla proteína + HCl.

$K^{II}$  las conductibilidades halladas experimentalmente del sistema proteína + HCl.

$K^{III}$  las conductibilidades que le corresponden a la sal protéica.

Finalmente  $f_u^{II}$  y  $f_u^{III}$  son los coeficientes de conductibilidad.

(\*) Posiblemente hemos considerado algo bajo los números de transporte de los iones Cl (75) y albumínico (50) y por eso también, hemos obtenido un valor  $f$  demasiado grande.

COEFICIENTE DE ACTIVIDAD DE LA MEZCLA OVOALBÚMINA  
(1,57 %) + HCl

$n^I$ HCl	$n_{alb}^{Cl}$	$a_{Cl}^{III}$	$fa_{Cl}^{III}$	$fa_{Cl}^{II}$
0,01	$7,48 \cdot 10^{-3}$	$4,81 \cdot 10^{-3}$	0,6430	0,4640
0,02	$10,73 \cdot 10^{-3}$	$4,22 \cdot 10^{-3}$	0,4000	0,5500
0,03	$11,13 \cdot 10^{-3}$	$2,60 \cdot 10^{-3}$	0,2330	0,5560
0,05	$11,43 \cdot 10^{-3}$	$1,40 \cdot 10^{-3}$	1,1220	0,6040

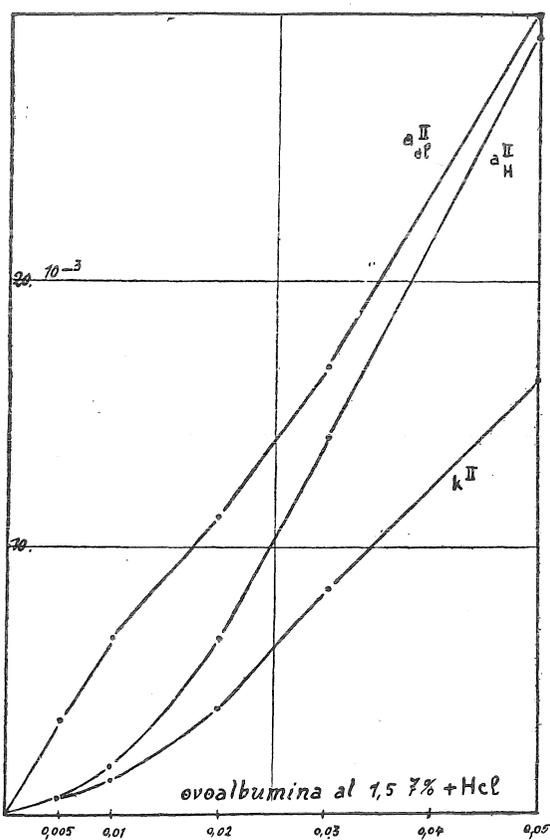


Fig I.

$n_{Clalb}$ . indica la concentración molar del cloruro de albúmina formado.

$a_{Cl}^{III}$ , la actividad del ion Cl de la sal proteica y se halla prácticamente restándole a  $a_{Cl}^{II}$ , el valor de  $a_{H}^{II}$ ,

$fa_{Cl}^H$ , el coeficiente de actividad de la mezcla proteína ácido, obtenido por la relación,  $\frac{a_{Cl}^H}{n_{HCl}}$

Y por último  $fa_{Cl}^{III}$ , el coeficiente de actividad de la sal proteica obtenida por la siguiente fórmula:  $fa_{Cl}^{III} = \frac{a_{Cl}^{III}}{n_{Clalb}}$

Los valores de H y Cl que figuran en los cuadros anteriores los determinamos potenciométricamente en la ovoalbúmina de concentración final 1,57 %.

Pauli, Frisch y Valko (loc. Cit.) obtienen como fijación máxima para una molécula proteica en la ovoalbúmina al 1 % 35 mol. HCl.

Nosotros, calculando para nuestras concentraciones (1,57 %), obtenemos para una molécula de ovoalbúmina 25 mol de HCl, máximo que sería ya prácticamente alcanzado en concentraciones 0,04 — 0,05 n HCl.

Adoptamos para nuestros cálculos el valor 27.000 (Sörensen) para el peso molecular de la ovoalbúmina.

En la figura N.º I están representados gráficamente  $a_{Cl}^H$  y  $a_H^H$ , es decir las actividades de los iones Cl y H en la mezcla ovoalbúmina + HCl.

Estas curvas marchan casi paralelamente acercándose en concentraciones elevadas ( $5 \cdot 10^{-2}$  HCl).

En la misma figura está representada  $K^{\sigma}$  que es la conductibilidad total de la mezcla proteica ácido hallada experimentalmente.

La figura N.º II representa las concentraciones molares del cloruro de albúmina formado, por adiciones crecientes de ácido (0,01 n—0,05n HCl); al principio la curva sube más o menos rápidamente (entre concentraciones 0,005-0,03) y toman luego una dirección casi paralela al eje de las abscisas. Como sabemos la cantidad de albúmina total es igual a los  $C_H$  fijados.

La curva  $a_{Cl}^{III}$  representa la actividad de la sal proteica en la que se observa el interesante fenómeno de que pasa por un máximo en concentraciones  $1 \cdot 10^{-2}$  n HCl.

La curva  $a_{Cl}^H$  (figura I) representa a los moles de Cl-total hallados en la mezcla ácido protéica, es decir la proporción de ion Cl correspondiente al cloruro de albúmina y al HCl que se encuentra libre. Si a estos valores hallados experimentalmente y que representan la concentración total de los iones Cl les restamos los  $a_H^H$  hallados experimentalmente tendremos los valores  $a_{Cl}^{III}$  correspondientes también exclusivamente al cloruro de ovoalbúmina.

Según nuestros resultados la actividad de la sal proteica (ovoalbúmina al 1,57 %) que se forma en presencia de cantidades crecientes de ácidos fuertes (HCl) alcanza un valor máximo, que decrece luego rápidamente; lo que está perfectamente de acuerdo con los resultados de Pauli y su escuela.

Las medidas de viscosidad hechas por los autores ya citados

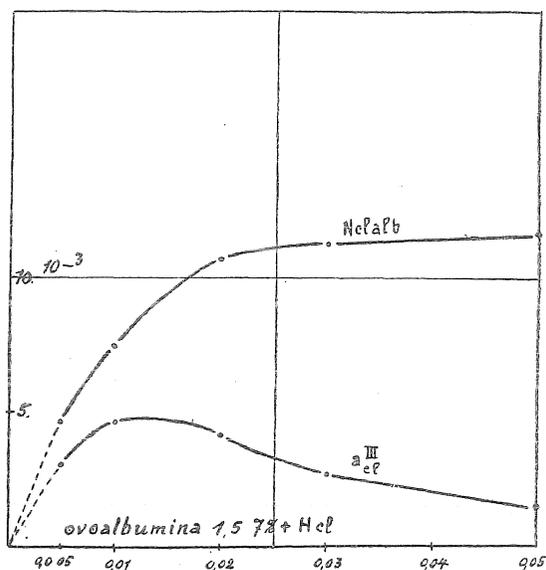


Fig. II.

en las mezclas ácido-proteínas (1,0 % y 2,32 %) dan también un máximo (viscosidad) que corresponde al máximo hallado por ellos y nosotros de  $a_{Cl}^{III}$

En la tabla IV damos los valores de los coeficientes de actividad  $fa_{Cl}^{II}$  y  $fa_{Cl}^{III}$  de la mezcla proteína ácido y de la sal respectivamente, calculados según las fórmulas:

$$fa_{Cl}^{II} = \frac{a_{Cl}^{II}}{n_{HCl}^I} \quad \text{y} \quad fa_{Cl}^{III} = \frac{a_{Cl}^{III}}{n_{Clalb}^{III}}$$

Pauli encuentra un paralelismo entre las curvas de conductibilidad y actividad de la sal proteica, así como en las curvas de los valores de  $a_{Cl}^{III}$  y  $K^{III}$  aunque no tan acentuado en este último caso.

Nuestros resultados discrepan con los de Pauli, Frisch y Valcow en que, no hemos hallado un máximo en los valores de  $K^m$ , y pensamos que esto puede ser atribuido a que realizamos las medidas de conductibilidad en un recipiente de muy pequeña capacidad ( $C = 0,244$ ) con el que las medidas de grandes conductibilidades son poco exactas.

### CONCLUSIONES

1.<sup>a</sup> En la zona isoelectrica del sistema HCl-proteína se observa que:

a) Contiene la totalidad del ácido fijado a la proteína cuando su concentración de ion H es igual o menor que el punto isoelectrico.

b) Requiere una cantidad de ácido mucho mayor ( $\pm 150$  veces) que la calculada para un líquido sin buffers, para llevarlo al punto isoelectrico.

c) Fija ácido en proporción lineal al aumento de partículas neutras.

d) El máximo de fluidez y el máximo de precipitabilidad por el alcohol dependen no sólo de la reacción real de medio, sino también de la concentración de la proteína.

e) Al aumentar la concentración de las partículas neutras de albúmina (A), a medida que la reacción se aproxima al punto isoelectrico aumenta también la conductibilidad.

f) Los aniones proteicos  $A^-$  reaccionan con el HCl dando iones con doble carga, aunque neutros:  $+A^-$ .

2.<sup>o</sup> En la zona más ácida que la isoelectrica del sistema HCl ovoalbúmina (1.57 %) hemos establecido que:

h) La fijación del HCl por la proteína aumenta proporcionalmente (fig. II) a la cantidad de ácido agregado hasta la concentración de 0,025 *n* HCl para luego mantenerse sensiblemente constante.

i) La actividad del ion Cl correspondiente a la sal proteica aumenta proporcionalmente a la cantidad de HCl agregado, llega a un máximo cuando éste alcanza a la concentración 0,01 *n* y disminuye luego lentamente (fig. II).

### BIBLIOGRAFIA

1. — WALDSCHMIDT-LEITZ. «Zur Struktur der Proteine», *Koll. Zeitsch.*, t. XL, Diciembre de 1926.
2. — Wo PAULI. «Eiweisskörper und Säuren», *Koll. Zeitsch.*, t. XL, Nov. 1926.

3. — THE SVEDBERG. *Zeitsch. f. Physik. Chem.*, 221, 65, 1926.
4. — LECOMPTE DU NOÛY. «Dimensions des molécules et poids moléculaires des proteines du sérum» *C. R. d. l'Acad. des Sciences*, t. 178, N.° 23, año 1924, pag. 1904.
5. — F. MODERN y WO PAULI. *Bioch. Zeitsch.*, 156, 482, 1925.
6. — J. LOEB «Les Proteines».
7. — L. MICHAELIS «Die Wasserstoffionkonzentration».
8. — S. P. L. SÖRENSEN. *Zeitsch. Physiol. Chem.*, 106-1-129, año 1919.
9. — PAULI «Kolloidchemie der Eiweisskörper».
10. — PAULI y SAMEC. *Bioch. Zeitsch.*, 62, 245, 1914.
11. — N. BJERRUM. *Zeitsch. f. Physik. Chem.*, 104, 147, 1923.
12. — PAULI. *Kolloid Zeitsch.*
13. — S. P. L. SÖRENSEN y K. LINDERSTROM-LANG. *C. R. des travaux du Lab. Carlsberg*, 15, N.° 6, 1924.
14. — FRISCH, WO PAULI y E. VALCOW. *Bioch. Zeitsch.*, t. 164, N.° 4|6, 1925, p. 481
15. — M. ADOLF. «Physikalische Chemie der Globuline», *Koll. Beihefte*, t. XXI, año 1924, pág. 363.