

Ensayos de purificación del suero antidiftérico por adsorción con el $\text{Al}(\text{OH})_3$

Por Raúl Wernicke y Fernando Modern

El primer ensayo que hemos encontrado en la literatura, de purificar el suero antidiftérico por adsorción y elución de la antitoxina, usando como adsorbente el $\text{Al}(\text{OH})_3$, se debe a H. Aronson. ⁽¹⁾

Este autor parte de la observación de que toxinas y antitoxinas filtradas a través de $\text{Al}(\text{OH})_3$ recién precipitado, pierden su actividad. Creyendo encontrar así un método de aislar la antitoxina diftérica, somete al suero antitóxico a la acción adsorbente del $\text{Al}(\text{OH})_3$ precipitado en el seno mismo del líquido, para cuyo efecto le agrega una solución $(\text{SO}_4)_3 \text{Al}_2$ y cantidad equivalente (hasta débil acidez) de NH_3 . Al precipitado que arrastra casi totalmente (95 %) la antitoxina, lo lava con agua y luego lo somete a la acción prolongada de una débil solución alcalina (NH_3 ó NaOH), que apenas azulea el papel rojo de tornasol. Realiza una segunda elución del precipitado y a los líquidos que han extraído la antitoxina los somete a la acción precipitante del alcohol o del SO_4Am_2 . Obtiene así un polvo blanco, con muy poca ceniza (3-5 %) perfectamente soluble en agua, sobre todo si ha sido alcalinizada débilmente. En cuanto al rendimiento del método, no es fácil formarse una idea clara, pues los datos no son muy explícitos y además no hay concordancia entre los resultados numéricos y los comentarios del autor. Sin embargo, en uno de los experimentos es fácil sacar en limpio que ha conseguido concentrar alrededor de 3 veces el valor antitóxico del suero, pues encuentra igual acti-

vidad en 0.0005 cm.³ del suero inicial y 0.000015 gramos del polvo obtenido según su método. Admitiendo que el suero tuviera 9 % de proteínas, en los 0.0005 cm.³ habría 0.000045 grs. de residuo seco (protéico), que corresponde justamente al triple del peso de sustancia de igual actividad finalmente obtenida.

Aronson habla de sueros que ha conseguido concentrar "solo 30 veces", por lo que es de suponer que ha logrado concentraciones mayores, pero en su memoria no figuran los protocolos que atestiguarían tan halagüeños resultados.

Además del Al(OH)₃ como adsorbente, ha empleado ferrocianuro de zinc, hidrato férrico y otros precipitados, que igualmente le han dado buenos resultados.

Brieger y Boer ⁽²⁾ se han preocupado de purificar sueros antitéticos (antidiftéricos y antitetánico) por precipitación con disolventes orgánicos (etanol, metanol) ácidos orgánicos y minerales, sales alcalinas y alcalino-térreas y finalmente con sales de metales pesados.

De estas últimas ensayan acetato de plomo, sulfato de cadmio, sulfato de cobre, bicloruro de mercurio, nitrato de plata y sulfato y cloruro de zinc. Por adición de estas sales, por ejemplo, en el caso de emplear sulfato o cloruro de zinc, se forman en el suero precipitados más o menos abundantes que arrastran la antitoxina. Este precipitado es lavado y disuelto en solución débilmente alcalina (\pm N/400), y se elimina luego al metal pesado (Zn) por acción del CO₂ y aún del SH₂. Finalmente, aunque no consiguen eliminar totalmente al zinc de la antitoxina, obtienen ésta bajo la forma de un polvo blanco fácilmente soluble en agua. Partiendo de 10 cm.³ de suero antidiftérico o antitetánico, recogen totalmente la antitoxina en 0.1 gramo de polvo seco.

Como se ve, este método difiere fundamentalmente del de Aronson por cuanto usa las sales de metales pesados para formar combinaciones protéicas insolubles que arrastran consigo las antitoxinas, combinaciones que luego solubilizan y desdoblan por la acción de precipitantes del metal, dejando proteínas y la antitoxina en solución; de modo que si bien las antitoxinas precipitaron por adsorción, en cambio no fueron recuperadas por elución.

Freund y Sternberg ⁽³⁾ confirman posteriormente los resultados de Brieger y Boer y ensayan otras sales metálicas con resultados variables. Las sales de Sr. y Co no son utiliza-

bles, pero si las de Al, (sulfato y el alumbre potásico) que agregadas al suero forman un abundantísimo precipitado, fácilmente filtrable, que deja toda la antitoxina en solución. En cambio el suero adicionado de alumbre potásico y alcalinizado con KOH, forma un precipitado que arrastra la antitoxina, la que se recupera por extracción en medio alcalino.

Precipitando al Zn como carbonato o fosfato, en el suero no arrastra la antitoxina, pero en cambio es adsorbida si se precipita al estado de hidrato y la antitoxina fijada entra en solución al tratar el precipitado con álcalis débiles.

En esta memoria no figuran protocolos ni datos numéricos referentes a estos ensayos.

Los ensayos de Zunz ⁽⁴⁾ sobre adsorción de toxinas y anticuerpos se han referido especialmente al ácido silícico (purificado por electrólisis y químicamente puro) aunque empleó también carbón animal y caolín como adsorbentes. Sus resultados son poco concretos (no hace mediciones, sino sólo verificaciones cualitativas) y además no se preocupa de recuperar las sustancias activas separadas por adsorción.

Marshall y Nelker ⁽⁵⁾ han estudiado extensamente el poder precipitante del $Al(OH)_3$ recientemente obtenido (por adición de NH_3 a soluciones de alumbre amoniacal) cuando es agregado a soluciones coloidales. En sus ensayos sobre toda clase de coloides: metales, sales, óxidos, colorantes, polisacaridos, grasas, jabones, albúminas, globulinas, caseína, nucleoproteidos, proteosas y sustancias complejas tales como leche y suero, han obtenido un resultado uniforme, en el sentido de que el $Al(OH)_3$ fija todos los coloides ensayados, con la sola excepción de la hemoglobina que se conserva íntegramente en solución. Estos ensayos nos llevarían a admitir la imposibilidad de fraccionar coloides por adsorción, salvo en casos muy especiales, como el de la hemoglobina, pero antes de llegar a tal conclusión, debemos tener en cuenta que estos autores han procedido siempre con soluciones coloidales muy diluídas, circunstancias en las cuales es difícil y quizás imposible, notar diversidad de comportamientos para con un adsorbente.

Ensayos posteriores de Welker y Marshall ⁽⁶⁾ se refieren al poder adsorbente del $Al(OH)_3$ para las enzimas, las que son todas fijadas totalmente con excepción de la amilasa de la saliva, que sólo lo es parcialmente. Estos autores no han extendido sus investigaciones al estudio del comportamiento de toxinas, etc.

Nebel ⁽⁷⁾ describe la patente Sames que utiliza el $\text{Al}(\text{OH})_3$ formado por adición de acetado de aluminio al suero alcalinizado, para eliminar del mismo gran parte de las proteínas inactivas.

Rakusin y Fliher ⁽⁸⁾ creen haber encontrado un método para obtener antitoxina pura, método que serviría también para la medición de los sueros. Fundados en la observación de Zunz (4) de que la antitoxina diftérica no es fijada por distintos absorbentes y en el hecho de que el $\text{Al}(\text{OH})_3$ suspendido en agua y adicionado al suero fija buena parte de las proteínas (el 44 % en tres adsorciones sucesivas), admiten ellos de que en estas condiciones la antitoxina diftérica no es adsorbida y queda en solución al estado de antitoxina pura. El trabajo no contiene protocolos ni medidas que confirmen esta conclusión.

Ultimamente, Eisler y Spiegel-Adolf ⁽⁹⁾ estudian una serie de métodos físico-químicos para concentrar anticuerpos, y se ocupan especialmente de la adsorción con $\text{Al}(\text{OH})_3$. Los ensayos con el suero antidiftérico, son poco demostrativos, pues los resultados que publican parecen no ser concordantes.

En todas estas investigaciones, referentes a la purificación del suero antidiftérico por adsorción de la antitoxina con $\text{Al}(\text{OH})_3$ y posterior elución, nos hemos encontrado con datos insuficientes sobre las condiciones experimentales y con resultados contradictorios.

Como en algunos casos parecería que el método ha permitido purificaciones considerables del suero, nos propusimos aplicarlo a nuestros sueros, con las variantes que la experiencia nos indicara.

Los ensayos previos nos revelaron inmediatamente la existencia de factores de acción que debían ser bien determinados a fin de conseguir experimentos reproducibles. En primer término figura el pH del medio durante la adsorción y durante la elución. Además como en todo fenómeno de adsorción, son factores importantes la concentración y volumen del suero, la cantidad de $\text{Al}(\text{OH})_3$ y el tiempo de contacto.

Nuestros experimentos han respondido al siguiente plan:

I. Adsorción con $\text{Al}(\text{OH})_3$ seco, agregado al suero:

- a) En proporciones variables, con respecto a la cantidad de suero.

b) En sueros diluídos a distintas concentraciones.

II. Adsorción con $\text{Al}(\text{OH})_3$ precipitado en el seno del suero:

a) Con cantidades crecientes de $\text{Al}(\text{OH})_3$.

b) Con diluciones de suero, de distintas concentraciones.

c) Haciendo la adsorción a distintos pH.

Hemos ensayado adsorciones sucesivas sobre una misma porción de suero, renovando el adsorbente, eluciones repetidas sobre un mismo adsorbente, y también hemos ensayado eluciones a distintos pH.

I

ADSORCIÓN CON $\text{Al}(\text{OH})_3$ SECO

Como material adsorbente hemos empleado, hidrato de aluminio purísimo, exento de alcali, de Merck y otro producto preparado por nosotros en la siguiente forma: la solución Cl_3Al 2N. es adicionada de NaOH 2N. hasta débil coloración rosada con fenoltaleína, recojemos el precipitado sobre papel de filtro plegado y lo lavamos con agua destilada caliente unas diez veces. Como el líquido de lavaje arrastraba continuamente cloruros, suspendemos el precipitado en agua, agitamos hasta suspensión homogénea y centrifugamos. Con el precipitado repetimos esta operación cuatro veces y luego lo secamos en una estufa a $105^\circ - 110^\circ$, hasta constancia de peso (± 15 horas).

Las suspensiones en agua de este $\text{Al}(\text{OH})_3$ tenían reacción ligeramente ácida.

CUADRO I

No del Experimento	Dilución del suero	Unidades antitóxicas por cm. ³	Proteína por %	1ª ADSORCIÓN				2ª ADSORCIÓN				
				Volúmen empleado cm. ³	Al (OH) agregado	U. A. p. cm. ³ no adsorb.	Proteína % (no adsorb.)	Volúmen empleado cm. ³	Al (OH) ₃ agregado	U. A. p. cm. ³ no adsorb.	Proteína % (no adsorb.)	pH final
1	1:5	62	1.50	50	1 gr.	62	—	42.5	1 gr.	58	1.40	4.59
2	1:5	62	1.50	25	1 gr.	62	1.49	17.5	1 gr.	60	1.47	4.40
3	1:5	62	1.50	25	2 gr.	62	1.52	17.5	2 gr.	60	1.54	4.49

En el cuadro N.º 1 figuran los datos del primer experimento realizado con el $\text{Al}(\text{OH})_3$ preparado por nosotros. La técnica era la siguiente: sobre un determinado volumen de suero diluido agregamos el $\text{Al}(\text{OH})_3$ seco; agitamos en agitador mecánico durante 20 horas y centrifugamos. Del líquido sobrenadante reservamos una parte para medir su poder antitóxico y contenido protéico y al resto lo sometemos a una segunda adsorción con nueva cantidad de $\text{Al}(\text{OH})_3$. Agitamos también durante veinte horas, centrifugamos, hacemos las mismas determinaciones y además el pH sobre el líquido sobrenadante.

Como se ve, no se ha producido adsorción apreciable, pero es de notar que por la acidez del $\text{Al}(\text{OH})_3$ hemos procedido con líquidos de pH muy bajos.

CUADRO II

N.º del Experimento	Dilución del suero	Unidades antitóxicas p. cm.º	Protéina %	1ª ADSORCIÓN					2ª ADSORCIÓN					EN LAS DOS ADSORCIONES		
				Volumen empleado cm.º	$\text{Al}(\text{OH})_3$ agregado	U. A. p. cm.º no adsorb.	Protéina % (no adsorb.)	Protéina % adsorbida	Volumen empleado cm.º	$\text{Al}(\text{OH})_3$ agregado	U. A. p. cm.º no adsorb.	Protéina % (no adsorb.)	Protéina % adsorbida	pH final	Protéina % adsorb.	U. A. p. cm.º adsorbida
4	1:10	31	0.75	40	4 gr.	28	0.61	0.14	30	4 gr.	25	0.40	0.21	8.18	0.35	6
5	3:10	93	2.25	40	4 gr.	78	2.12	0.13	30	4 gr.	75	1.85	0.27	8.30	0.40	18
6	1:2	155	3.75	40	4 gr.	—	3.50	0.25	28	4 gr.	140	3.23	0.27	8.31	0.52	15

En este cuadro N.º II figuran los datos de un experimento análogo al anterior, pero en el que usamos como adsorbente el $\text{Al}(\text{OH})_3$ Merck. Seguimos la misma técnica experimental que en el caso anterior.

Notamos aquí que ha habido una pequeña adsorción de las proteínas y de la antitoxina, pero la relación $\frac{\text{U. A.}}{\text{Prot.}}$ del material desaparecido por adsorción es la misma que la del suero inicial, por lo cual es de prever que no nos proporcionará una purificación de la antitoxina.

Es de notar que la débil adsorción positiva observada con el $\text{Al}(\text{OH})_3$ Merck, en oposición al resultado negativo obtenido con el $\text{Al}(\text{OH})_3$ preparado por nosotros, no debe atribuirse solamente a la naturaleza del adsorbente, sino también y quizás en primer término al pH del medio más elevado.

Vemos, por lo tanto, que el $\text{Al}(\text{OH})_3$ seco agregado al suero, tiene muy poco valor para la fijación de antitoxinas.

II

ADSORCIÓN CON $\text{Al}(\text{OH})_3$ PRECIPITADO EN EL SUERO

Los cuadros 3, 4 y 5 presentan los datos experimentales y resultados de nuestros ensayos de adsorción de la antitoxina diftérica por el $\text{Al}(\text{OH})_3$ precipitado en el seno mismo del suero.

Los experimentos fueron hechos en la siguiente forma: a un volúmen dado de suero se le agregan cantidades variables de agua y luego de soluciones equivalentes de Cl_3Al y NaOH , de manera que en cada ensayo obteníamos volúmenes iguales para todas las diluciones resultantes del suero. Este líquido heterogéneo era sometido una media hora a la centrifugación, con lo que separaba el precipitado adsorbente del resto del líquido sobrenadante. Sobre éste se medían valor antitóxico y contenido proteico, estableciéndose por deferencia la proporción de proteínas y de antitoxinas adsorbidas.

CUADRO III

Nº del Experimento	Volúmen del Suero cm. ³	Volúmen de Agua cm. ³	Volúmen Cl_3Al N I	Volúmen NaOH N I	Volúmen Total cm. ³	Dilución del suero	Proteína %	U. A. por cm. ³	Líquido sobrenadante			Adsorbido	
									pH	Proteína %	U. A. cm. ³	Proteína %	U. A. cm. ³
7	30	—	7.5 c. ³	7.6 c. ³	45.1	2:3	5. —	207	8.9	4.34	200	0.66	7
8	20	10	7.5 c. ³	7.6 c. ³	45.1	4:9	3.33	137	9.2	2.90	133	0.43	4
9	10	20	7.5 c. ³	7.6 c. ³	45.1	2:9	1.7	67	9.3	1.24	60	0.42	7

En este experimento (cuadro N° III) la adsorción ha sido muy débil, lo que es atribuible al elevado pH de los líquidos. Por otra parte la relación $\frac{\text{U. A.}}{\text{Prot.}}$ ha aumentado en el líquido sobrenadante (4600 contra 4100 del suero original), lo que indica que en estas condiciones el $\text{Al}(\text{OH})_3$ absorbe proporcionalmente más proteínas que antitoxinas.

CUADRO IV

N.º del Experimento	Volumen del Suero cm. ³	Volumen de Agua cm. ³	Volumen Cl ₃ Al 2N	Volumen Na OH 2N	Volumen Total cm. ³	Dilución del suero	Proteína %	U. A. por cm. ³	Liq. sobrenadante			Adsorbido	
									pH.	Proteína %	U. A. cm. ³	Proteína %	U. A. cm. ³
10	30	40	10 c. ³	10 c. ³	90	1:3	2.5	103	8.2	1.48	62	1.02	41
11	30	20	20 c. ³	20 c. ³	90	1:3	2.5	103	7.8	0.83	60-30	1.67	43.-73
12	30	—	30 c. ³	30 c. ³	90	1:3	2.5	103	7.1	0.65	< 30	1.85	> 73

Operando a pH más próximo del punto neutro (cuadro N° IV), la adsorción es más intensa y como era de suponer, es proporcional además a la cantidad de adsorbente. La relación $\frac{U. A.}{Prot.}$ no se modifica sensiblemente en el líquido sobrenadante.

CUADRO V

N.º del Experimento	Volumen del Suero cm. ³	Volumen de Agua cm. ³	Volumen Cl ₃ Al. I	Volumen Na OH I	Volumen Total cm. ³	Dilución del suero	Proteína %	U. A. por cm. ³	Liq. sobrenadante			Adsorbido	
									pH.	Proteína %	U. A. cm. ³	Proteína %	U. A. cm. ³
13	3	21.4	3 c. ³	2.6 c. ³	30	1:10	0.75	31	7.2	0	0	0.75	31
14	3	21.7	3 c. ³	2.3 c. ³	30	1:10	0.75	31	4.5	0.26	15	0.49	16
15	3	22	3 c. ³	2.0 c. ³	30	1:10	0.75	31	4.3	0.45	25	0.30	6

En este experimento (cuadro N° V), operando con sueros más diluidos y a distintos pH, se obtiene la adsorción total de proteínas y por lo tanto de las antitoxinas a pH 7,2 y en cambio la fijación es más débil a pH bajos. Es de notar que en el líquido sobrenadante hay un sensible aumento en el valor de la relación $\frac{U. A.}{Prot.}$ (en el suero original el valor de esta relación es 4100), de manera que en medios ácidos, igualmente que en medios alcalinos, el Al(OH)₃ absorbe proporcionalmente más proteínas inertes en las proximidades del punto neutro.

Vemos, en resumen, que el Al(OH)₃ recientemente precipitado en el seno del suero mismo manifiesta en grados diversos su poder adsorbente para las proteínas y antitoxinas, dependiendo, en la forma que lo evidencian los cuadros de más arriba, la dilución del suero, la cantidad de adsorbente y la reacción del medio.

III

RECUPERACIÓN DE LA ANTITOXINA DIFTÉRICA POR ELUCIÓN

En los ensayos de elución de la antitoxina adsorbida se planteaba el doble problema de averiguar, en primer término, en qué condiciones se producía la elución y luego, si era ella selectiva o más acentuada, para las antitoxinas, con lo que haría factible su purificación.

En los cuadros números VI, VII y VIII figuran los datos suficientes para conocer las condiciones experimentales y los resultados obtenidos.

CUADRO VI

N.º del Experimento	Líquido original			pH.	Líquido sobrenadante			Adsorbido		pH.	Líquido de elución		
	Protéina %	U. A. cm. ³	U. A. p. gr. Prot.		Protéina %	U. A. cm. ³	U. A. p. gr. Prot.	Protéina %	U. A. cm. ³		Protéina %	U. A. cm. ³	U. A. p. gr. Prot.
16	0.75	31	4100	9.4	0.52	22	4200	0.225	9	> 9.5	0.23	7	3044
17	0.75	31	4100	7.03	0.30	13	4300	0.45	18	8.2	0.44	18	4100

En el primer experimento (cuadro N.º VI), procedimos en la forma siguiente: a dos porciones de 3 cm.³ suero antidiftérico-agregamos 21 cm.³ de agua y 3 cm.³ de Cl_3Al $\frac{\text{N}}{1}$; ahora bien, a fin de que los dos líquidos tuvieran distintos pH, precipitamos el $\text{Al}(\text{OH})_3$, en uno de ellos, agregando 3 cm.³ NaOH $\frac{\text{N}}{1}$ y en el otro, agregando sólo 2.8 cm.³ NaOH $\frac{\text{N}}{1}$.

Ambos líquidos eran centrifugados media hora, recogíamos el líquido sobrenadante, y medíamos su volumen, a fin de agregar uno igual de NaOH $\frac{\text{N}}{100}$ sobre el precipitado adsorbente. Homogeneizada esta nueva mezcla, era luego agitada durante 20 horas, al cabo de las cuales por una nueva centrifugación se separaba el líquido de elución.

Lo que mayormente se destaca de este experimento es que la adsorción fué más activa a pH 7.03 que a pH 9.4, dato concordante con los anteriores y la elución fué prácticamente total en ambos casos, realizadas en medio francamente alcalino.

CUADRO VII

N.º del Experimento	Líquido original y Líquido sobrenadante	Adsorbido		Liq. de la 1.º Elución			Líquido de la 2.º Elución				U. A. Recuperados en las 2 Eluciones	
		Proteína %	U. A. cm.³	pH.	Proteína %	U. A. cm.³	U. A. gr. Prot.	pH.	Proteína %	U. A. cm.³		U. A. gr. Prot.
13 b	Ver los datos en Cuadro N.º 5	0.75	31	8.3	0.35	18	5140	> 8.5	0.315	+ 15	+ 4760	100 %
14 b		0.49	16	—	0	—	—	> 8.5	0.37	+ 15	+ 4000	,,
15 b		0.30	6	—	0	—	—	> 8.5	0.31	+ 7	+ 2300	,,

Los ensayos de elución que figuran en el cuadro N° 7 fueron hechos sobre los adsorbentes obtenidos en los experimentos 13, 14 y 15 que constan en el cuadro N° 5. En principio y en detalles el experimento lo realizamos en análoga forma al anterior con la sola diferencia que procedimos a una segunda elución.

Los adsorbentes de 14 y 15 eran muy ácidos (ver cuadro N° V), así que al agregarle el NaOH N/100 para provocar la elución, la mezcla debió tener un pH por debajo de 7, lo que impidió la redisolución de las proteínas. En la segunda elución, en cambio, en que los líquidos eran francamente alcalinos, tenemos la recuperación prácticamente total de proteína y antitoxina adsorbidas.

En ninguno de estos experimentos hemos conseguido una ventaja real de purificación, pues muy poco o nada ha aumentado la proporción de unidades antitóxicas por gramo de proteína.

CUADRO VIII

Líquido original			Líquido sobrenadante			Adsorbido		Líquido de Elución				
Proteína %	U. A. gr. Prot.	U. A. Grs. Prot.	pH.	Proteína %	U. A. cm.³	U. A. gr. Prot.	Proteína %	U. A. cm.³	pH.	Proteína %	U. A. cm.³	U. A. gr. Prot.
0.826	60	7230	7.26	0.245	+ 15	6100	0.58	+ 45	8.4	0.56	+ 45	+ 8000

Finalmente tenemos en el cuadro N° VIII un experimento realizado con otro suero antidiftérico (N° 480) de 600 U.A./cm.³

y un contenido de 8.26 % de proteína. A 9 cm.³ de suero agregamos 63 cm.³ de agua, 9.5 cm.³ Cl₃Al N/1 y cantidad suficiente (9 cm.³) de NaOH N/1 para que la mezcla tuviera un pH próximo a la neutralidad (7.26).

Hicimos una sola elución con un volúmen de NaOH N/100 igual al del líquido sobrenadante recogido al separar por centrifugación la masa de Al(OH)₃ adsorbente.

La adsorción fué incompleta, pero la elución fué total, consiguiendo un pequeño mejoramiento (8000 contra 7230 inicial) en la proporción de unidades antitóxicas por gramo de proteína.

CONCLUSIONES

1° El hidrato de aluminio seco, en polvo, adicionado al suero antidiftérico, manifiesta muy débil o ningún poder de adsorción para las proteínas y antitoxinas.

2° El hidrato de aluminio precipitado en el seno mismo del suero tiene un marcado poder adsorbente para las proteínas y antitoxina diftérica, sobre todo si se opera en medio sensiblemente neutro. En medios ácidos o alcalinos la adsorción es menor, sobre todo para la antitoxina, de manera que operando en estas condiciones la fracción protéica no adsorbida presenta un ligero aumento en la proporción de antitoxina por gramo de proteína, con respecto al suero inicial.

3° El hidrato de aluminio no muestra marcada acción selectiva en la adsorción de las antitoxinas en medio neutro, lo que vale decir, que, en las fracciones adsorbida y no adsorbida no se modifica en manera aprovechable la proporción de antitoxina fijada a un gramo de proteína.

4° Por elución en medio alcalino (pH > 8.4) se puede recuperar cuantitativamente las proteínas y antitoxinas adsorbidas por el hidrato de aluminio, proceso en el que tampoco se consigue elevar la proporción de antitoxina ligada a cada gramo de proteína.

BIBLIOGRAFIA

1. — H. ARONSON. *Berl. Klin. Woch.* p. 453, año 1894.
2. — BRIEGER Y BOER. *Zt. f. Hygiene.* t. 21, p. 259, año 1896.
3. — FREUND Y STERNBERG. *Zt. f. Hygiene,* t. 31, p. 429, año 1899.

4. — E. ZUNZ. *Zeitsch. f. Immunitätsfors.* t. 19 (orig.), p. 326, año 1913.
5. — J. MARSHALL Y H. W. WELKER. *Journ. Am. Chem. Soc.* t. 35, p. 820, año 1913.
6. — W. H. WELKER Y J. MARSHALL. *Journ. Am. Chem. Soc.* t. 35, p. 822, año 1913.
7. — W. NEBEL. *Med. Klin. Woch.* p. 911, año 1913.
8. — M. A. RAKUSIN Y G. B. FLIEHER. *Zeitsch. f. Immunitätsfor.* t. 39, p. 193, año 1924.
9. — EISLER Y SPIEGEL ADOLF. *Bioch. Zeits.* t. 204, p. 28, año 1929.