

## Electrodiálisis de sueros antitóxicos

Por Fernando Modern

Mucho se ha discutido respecto a quien correspondía el mérito del descubrimiento de la electrodiálisis y sus aplicaciones en Biología. Lo cierto es que Reitstötter <sup>(1)</sup> en su trabajo titulado "La electrodiálisis en la bioquímica" señala al Graf B. Schwerin como el autor que tiene más patentes registradas al respecto. Además ya en el año 1896 D. Winkler <sup>(2)</sup> registra una patente que trata de la purificación de las albumosas y otras proteínas con el auxilio de la corriente eléctrica.

En el año 1903, Morse y Pierce <sup>(3)</sup> describen un estudio sobre gelatina (Diffusion und Uebersättigung in Gelatine) purificada también empleando la corriente eléctrica, sin darle a esto último importancia.

Tribot y Chretien en el año 1905 emplean un método parecido para purificar  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  coloidal. Sin embargo, este procedimiento había quedado ignorado largo tiempo y recién en el año 1910 Dhéré presenta un trabajo en donde textualmente dice: "élimination des électrolytes liés aux colloïdes sous l'action de la force de diffusion combinée à celle d'un champ électrique, procédé que l'on peut nommer dialyse électrique".

Dhéré <sup>(4)</sup> sostiene que pueden considerarse sinónimos diálisis eléctrica y electrodiálisis.

Wo Pauli <sup>(5)</sup> en su trabajo publicado en el año 1922, sostiene que hacía 10 años que empleaba la electrodiálisis para purificar las proteínas.

Los trabajos hasta ahora publicados sobre electrodiálisis son muy numerosos, muchos de ellos tratan de la purificación de glucidos, enzimas, anticuerpos, etc., habiendo Dhéré <sup>(6)</sup> publicado una bibliografía cronológica, donde están citados todos los trabajos publicados hasta el año 1927.

No solamente se ha empleado la electrodiálisis para la purificación de los coloides sino también como medio analítico, pues se pueden valorar, como lo hace por primera vez Wernicke <sup>(7)</sup>, las bases totales del suero sanguíneo, demostrando que es un método exacto y rápido. Sugiere además la idea de emplear este método en toxicología.

Gollán <sup>(8)</sup> emplea la electrodiálisis para el análisis de tierras con buenos resultados.

A. Bechhold <sup>(9)</sup> combina la electrodiálisis a la ultrafiltración, dando un nuevo método de purificación de coloides. Según Heymann <sup>(10)</sup> este método permite una eliminación más rápida de los cristaloides que la diálisis y electrodiálisis, dando en sus trabajos los valores respectivos.

Y para terminar esta reseña bibliográfica, diremos que existen gran cantidad de modelos de electrodiálizadores y microelectrodiálizadores, empleando nosotros en nuestros trabajos el modelo Pauli <sup>(11)</sup> que es el más corriente.

En un trabajo ya publicado <sup>(12)</sup> demostramos que por electrodiálisis de sueros antitóxicos (antidiftérico y antitetánico) separábamos la totalidad de la fracción activa. Operábamos con sueros diluidos al 1/5 y siguiendo un método especial conseguimos la precipitación de más del 99 % de las antitoxinas. Las electrodiálisis duraban entre 80 y 150 horas empleando más o menos el mismo tiempo las diálisis previas.

En esos ensayos también demostramos que podíamos recuperar cuantitativamente las antitoxinas del suero en el precipitado, por lo tanto no se ejercía acción destructora. También demostramos que bastaba el simple contacto de las soluciones albumínicas con las globulinas (antitoxinas) en ausencia de la corriente eléctrica, para que éstas se redisolvieran parcialmente en aquéllas.

En este trabajo exponemos los ensayos complementarios efectuados. Tratamos en primer lugar de confirmar los resultados obtenidos en el trabajo ya publicado <sup>(13)</sup> haciendo ensayos con diferentes sueros pero procediendo de la misma manera, es decir, con electrodiálisis de sueros diluidos, poca intensidad de corriente y empleando en ambos electrodos papel de pergamino. Además tratamos de hacer *práctico* este método de la electrodiálisis, es decir, aplicarlo en gran escala a la concentración de sueros. Para poder llegar a eso, era necesario ante todo, 1º, suprimir las diálisis previas; 2º, diluir el suero lo menos po-

sible, y 3º, emplear grandes intensidades para acelerar la electrodiálisis y por lo tanto la precipitación de las antitoxinas.

a) ELECTRODIÁLISIS DE SUEROS DILUIDOS (Intensidad pequeña + 50.M.A).

En el cuadro I damos los detalles de esta electrodiálisis de suero diluido al 1/3 sin diálisis previa.

CUADRO I

	Volumen cm. <sup>3</sup>	Marcha (ED*)	Valores de K*	Reac. SO <sub>4</sub> Am <sub>2</sub> a ½ sat.
Suero N° 433 diluido al 1/3 (150 cm. <sup>3</sup> suero + 300 cm. <sup>3</sup> H <sub>2</sub> O) ....	200	24 h. 30 volts	—	líquido sobrenadante con gran precipitado de globulinas
		2 h. 100 „	—	
		20 h. 150 „	—	
		2 h. 250 „	1,25.10 <sup>-3</sup>	

Notamos que a pesar de ser la conductibilidad muy elevada, pasando 250 volts, el suero no se calentaba ni desprendía burbujas en los electrodos. En el fondo del electrodiálizador había muy poco precipitado, habiéndose adherido éste en el papel del cátodo formando una membrana resistente al paso de la corriente eléctrica. En esta electrodiálisis efectuada con suero diluido al 1/3, sin *toluol*, y sin diálisis previa se produjo una cataforesis de las globulinas que se opuso a la terminación de nuestra electrodiálisis.

En vista de este resultado volvimos a electrodiálizar sin diálisis previa, un suero diluido al 1/5 con agua, en el aparato grande.

CUADRO II

	Volumen (cm. <sup>3</sup> )	Marcha (E. D.)	Valores de K	pH
Suero diluido al 1/5	840	2 h. 50 volts	—	4,64
		22 h. 50 „	—	—
		17 h. 250 „	1,88.10 <sup>-4</sup>	—

(\*) E. D) = Electrodiálisis. (K) = Conductibilidad específica.

Separamos cuantitativamente las globulinas precipitadas por electrodiálisis, suspendiéndolas en 140 cm.<sup>3</sup> de agua destilada. Recogimos por otra parte 640 cm.<sup>3</sup> de líquido sobrenadante. A 10 cm.<sup>3</sup> de la suspensión de globulinas le agregamos 90 cm.<sup>3</sup> de solución fisiológica (que contenía 1 gr. de bicarbonato de sodio). La medida de su valor antitóxico nos daba 70 unidades. El líquido sobrenadante contenía 10 unidades.

CUADRO III

Líquido	Volumen	U. A. por cm. <sup>3</sup>	U. A. totales
Sobrenadante .....	640	10	6.400
Precipitado .....	140	700	98.000

En este ensayo hay una pequeña pérdida que es del 15 %, habiéndose precipitado en esta electrodiálisis el 82 % de las antitoxinas totales.

El pH del líquido durante esta operación nunca fué inferior a 4,64 a pesar de haber operado con un suero que no había sido previamente dializado.

El líquido sobrenadante electrodiálizado nuevamente previo el agregado de sales (método Adolf-Pauli) permitía precipitar la mayor parte de las unidades antitóxicas restantes.

Hicimos otro ensayo de electrodiálisis de un suero diluido al 1/5, aplicándole dos acumuladores las primeras 24 horas, en sustitución de la diálisis previa.

Inmediatamente después aplicamos 100 volts durante 24 horas y nos interesamos en averiguar la repartición de las antitoxinas en esta electrodiálisis rápida.

CUADRO IV

Líquido	Volumen cm. <sup>3</sup>	U. A. por cm. <sup>3</sup>	U. T. totales
Sobrenadante .....	480	10	4.800
Precipitado .....	500	18	9.000
Suero dil. al 1/5 .....	500	28	14.000

Podemos ver en el cuadro anterior que no ha habido pérdida, pero sólo ha precipitado el 64 % de las antitoxinas.

Por todos estos ensayos y los ya publicados, llegamos a la convicción de que este método que tan buen resultado daba en el laboratorio, no podía ser aplicado corrientemente en la concentración de sueros, pues la dilución del suero, la diálisis previa y la duración de la electrodiálisis, lo hacían poco práctico.

Necesitábamos ensayar un método que nos permitiera electrodiálisis los sueros concentrados o sólo diluídos al 1/2 ó al 1/3 con agua y empleando intensidades elevadas, acortando así la operación, acelerando por lo tanto la precipitación de las antitoxinas.

#### ELECTRODIÁLISIS DE SUEROS SIN DILUIR

20 cm.<sup>3</sup> de suero antidiftérico, colocados en el electrodiálisis pequeño, anodo-platino, membrana de colodio embebida en albúmina electrodiálisis (\*), el cátodo de plata, empleando membrana de pergamino (14). Comenzamos la electrodiálisis de manera que pasaran 100-300 M.A. Cuando pasaban 300 M.A., se le agregaba a las cámaras anódicas y catódicas agua destilada agitándose el suero continuamente con un agitador mecánico. Después de una hora de electrodiálisis, cuando sólo pasaban 5 M.A., interrumpimos la operación recogiendo 15 cm.<sup>3</sup> de suero que completamos a 20 cm.<sup>3</sup> (volumen inicial del suero) con agua destilada. Centrifugamos recogiendo 15 cm.<sup>3</sup> de líquido sobrenadante y el precipitado lo tratamos de redissolver en solución fisiológica (1 % de bicarbonato de sodio) llevándolo a 20 cm.<sup>3</sup>. Se redissolvió sólo parcialmente. En este ensayo precipitaron menos de 80 unidades antitoxicas encontrándose el resto en el líquido sobrenadante.

Debido a este ensayo negativo, decidimos repetir la operación con suero diluido al 1/2, pues dada la concentración proteica del suero ya nos pareció "a priori" que sólo precipitaría una mínima parte de las antitoxinas, desde el momento que las globulinas (antitoxinas) se redissolvían parcialmente en albúminas concentradas. En este ensayo empleamos 10 cm.<sup>3</sup> de suero, al cual agregamos 10 cm.<sup>3</sup> de agua, comenzamos con 90

(\*) Se emplea el colodio preparado en esa forma para evitar la acidificación de los sueros durante la electrodiálisis. (ERTIS Y EWIG).

volts (100-300 M.A.); a los 15' ya había bastante turbidez, llegando al máximo de turbidez a los 35'. Durante 25' conectamos 120 volts y al final de la operación (1 hora) pasaban menos de 5 M.A. Separamos del electrodiálizador precipitado y líquido centrifugándolo. Suspendimos el precipitado en solución fisiológica en la que se disolvió totalmente, al contrario de lo que sucede con el precipitado obtenido por la electrodiálisis de sueros sin diluir. Al líquido sobrenadante se le agregó unos cristallitos de  $\text{ClNa}$  lo que produjo su completa clarificación. El cuadro siguiente nos da la repartición de las antitoxinas y proteínas de ambos líquidos.

CUADRO V

Líquido	Volumen (cm. <sup>3</sup> )	U. A. por cm. <sup>3</sup>	Proteínas %	U. A. totales
Precipitado .....	20	40	1,79	800
Sobrenadante .....	25	85	2,8	2.100
Suero primitivo .....	10	290	—	2.900

Como se ve por el cuadro anterior, sólo hemos logrado la precipitación parcial de las antitoxinas, quedando la mayor parte en el líquido sobrenadante.

Efectuamos otra electrodiálisis empleando un aparato de 1000 cm.<sup>3</sup> de capacidad, el suero fué diluído al 1/3 con agua destilada (300 cm.<sup>3</sup> de suero + 600 cm.<sup>3</sup> de agua), y seguimos la técnica de Etisch y Ewig empleando en el cátodo papel de pergamino y el ánodo colodio embebido en albúmina de huevo.

El siguiente cuadro da los detalles de la operación efectuada.

CUADRO VI

Tiempo en minutos	Voltage	Amperage	Valores de K	p H
0' .....	250	2A	$2,50 \cdot 10^{-3}$	7,82
17' .....	250	2A	$1,66 \cdot 10^{-3}$	7,19
37' .....	250	—	$6,40 \cdot 10^{-4}$	6,50
50' .....	250	—	$2,77 \cdot 10^{-4}$	6,85
90' .....	250	0,1A	$8,25 \cdot 10^{-6}$	5,92

Antes de pasar del tiempo 1 al tiempo 2 (ver cuadro) y así hasta el fin de la operación cambiamos el agua a los electrodos (temperatura 5°C) para evitar el calentamiento del suero.

A los 50' le agregamos al suero agua, pues se había producido una ósmosis que reducía su volumen a la mitad.

Debido a esta dilución y a la electrodiálisis la conductividad del suero pasó de  $2,50 \cdot 10^{-3} \Omega R.$  a  $8,25 \cdot 10^{-6} \Omega R.$  (ver cuadro anterior).

En la célula central la temperatura no pasó de 42°C. Hacia el final de la operación se produjo una notable electrósmosis, habiendo pasado a la cámara anódica más de 400 cm.<sup>3</sup> de líquido. Cuando retiramos el suero completamos su volumen con agua a 900 cm.<sup>3</sup> (volumen primitivo).

El precipitado lo disolvimos en 300 cm.<sup>3</sup> de solución fisiológica y el líquido sobrenadante después de centrifugado lo completamos a 1000 cm.<sup>3</sup>. La repartición de las U.A. fué la siguiente:

CUADRO VII

Líquido	Volumen (cm. <sup>3</sup> )	V. A. por cm. <sup>3</sup>	V. A. totales
Precipitado .....	300	150	45.000
Sobrenadante .....	1000	140	140.000

El suero contenía 650 U.A. por cm.<sup>3</sup>, luego un total de 195.000 fueron electrodializadas. Como recogimos 185.000 entre el líquido sobrenadante y precipitado podemos asegurar que prácticamente no ha habido destrucción, pero sólo han precipitado una mínima parte de las antitoxinas.

## BIBLIOGRAFÍA

1. — REITSTÖTTER J. Die Elektrodialyse in der Biochemie. *Koll. Zeitschr.* (1927). Tomo 43, pág. 35.
2. — WINKLER D. "Reinigung von Albumosen und Eiweisabbauprodukten mit hilfe des electrischen Stromes". (1896). *Brit.* pág. 5749.
3. — MORSE H. W. y G. W. PIERCE. *Zeitschr. f. physik. chem.* (1903). Tomo 45, pág. 589.

4. — DHÉRE CH. Uber Elektrodialyse. *Biochem. Zeitschr.* (1924). Tomo 154, pág. 504.
5. — PAULI Wo. Aus der Kollochemie der Eiweiskörper. *Kolloid-Zeitschr.* (1922). Tomo 31, pág. 252.
6. — DHÉRE CH. Die Elektrodialyse in der Biochemie I y II. *Kolloid-Zeitschr.* (1927). Tomo 41, pág. 243 y 315.
7. — WERNICKE R. Determinación de las bases totales del suero y demás líquidos orgánicos por electrodiálisis y otras aplicaciones de este nuevo método analítico. *Rev. Instituto Bacteriológico.* (1925). Tomo 4, pág. 7.
8. — GOLLAN J. Análisis de las tierras y rocas por la electrodiálisis. *Segundo Congreso de Química.* (1924). Tomo III, pág. 297.
9. — BECHHOLD H. Elektro-Ultrafiltration. *Zeitschr. f. Elektroch.* (1925). Tomo 31, pág. 496.
10. — HEYMANN E. Ein Vergleich zwischen Dialyse und Ultrafiltration, Elektrodialyse u. Elektroultrafiltration. *Kolloid-Zeitschr.* (1926). Tomo 38, pág. 58.
11. — PAULI Wo. Untersuchungen au elektrolytfreien, wasserlöslichen Proteinen I. *Bioch-Zeitschr.* (1924). Tomo 152, pág. 355.
12. — WERNICKE R. y F. MODERN. Electrodiálisis de sueros antitóxicos. *Rev. Instituto Bacteriológico.* (1926). Tomo 4, pág. 441.
13. — ETTISCH G. y W. EWIG. Zur Elektrodialyse des Serums. *Bioch-Zeitschr.* (1928). Tomo 195, pág. 175.