

## Tesis de Posgrado

# Aplicación del método de Bull a la medición de presión osmótica de suero y determinación del peso molecular medio de sus proteínas

Caviglia, Enrique Jorge

1954

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Química de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

#### Cita tipo APA:

Caviglia, Enrique Jorge. (1954). Aplicación del método de Bull a la medición de presión osmótica de suero y determinación del peso molecular medio de sus proteínas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_0809\\_Caviglia.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0809_Caviglia.pdf)

#### Cita tipo Chicago:

Caviglia, Enrique Jorge. "Aplicación del método de Bull a la medición de presión osmótica de suero y determinación del peso molecular medio de sus proteínas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1954.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_0809\\_Caviglia.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0809_Caviglia.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

TESIS

APLICACION DEL METODO DE BULL A LA MEDICION DE PRESION  
OSMOTICA DE SUERO Y DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR  
MEDIO DE SUS PROTEINAS.

*TESIS 809*

Tesis presentada por  
ENRIQUE JORGE CAVIGLIA

Para optar al título de Doctor en Química

1954

*TESIS 809*

Deseo expresar mi agradecimiento al Dr. N.Mittelman por su constante ayuda y consejos.

## I- INTRODUCCION

### 1) GENERALIDADES

Entre los métodos para la determinación de tamaño de moléculas proteicas (1), el basado en la medición de la presión osmótica es el que requiere aparatos más fácilmente obtenibles, ya que los demás métodos, tales como la ultracentrifugación, difracción de rayos X, velocidad de sedimentación y constante de difusión, microscopía electrónica y ultrafiltración, necesitan el empleo de dispositivos técnicos muy elaborados.

Además, entre las propiedades coligativas, la presión osmótica puede ser medida con mucha mayor precisión que el aumento ebulloscópico, descenso crioscópico y descenso de la presión de vapor, ya que, sólo una pequeña fracción del mol se halla presente en las soluciones proteicas. En efecto, si se trata de una proteína de peso molecular con números 34.000, presente en una solución al 10%, ejercerá una presión osmótica de 68 mm de agua, perfectamente medible, en contraposición con la ínfima fracción de grado centígrado que correspondería al descenso crioscópico.

Sin embargo, tropieza la medición de presión osmótica con el inconveniente de que, en general, los métodos desarrollados son sumamente delicados y lentos, así como con la necesidad de preparar membranas semipermeables adecuadas al caso en estudio, lo cual no suele ser demasiado simple.

Debe tenerse en cuenta que la presión osmótica solo proporciona datos de pesos moleculares medios, por lo cual en caso de desearse determinar el peso molecular de una determinada proteína es necesario previamente su aislamiento. Esto no es un inconveniente tratándose de sueros sanguíneos, pues es de interés clínico la obtención de datos para comparar su eficiencia osmótica, relacionada por ejemplo con los casos de shock (2).

Es deseable por lo tanto la puesta a punto de un método que permita la medición de presión osmótica de suero, en tiempo relativamente corto, mediante instrumental simple. Se intenta alcanzar ello en este trabajo, investigando la aplicación del método de Bull (3) (4), a sueros y realizando por vez primera mediciones de presión osmótica de proteínas en nuestro país.

## 2) FUNDAMENTOS TEORICOS

Cuando una membrana en contacto con una solución es capaz de permitir el pasaje a través de ella del solvente pero no del soluto, se la denomina membrana semipermeable. En el caso de las proteínas la membrana deberá ser permeable no sólo al solvente, sino también a los electrolitos presentes. Son apropiadas para esto las membranas de colodio.

Sea un recipiente dividido en dos por una pared vertical, una de cuyas porciones es una membrana semipermeable, conteniendo a un lado una solución, y al otro el solvente puro. Sobre la superficie de la solución hay un pistón y la superficie del solvente está libre, y en el mismo ambiente que el pistón, actuando sobre ella la presión  $p_0$ .

Llamemos:

$f_1^0$  = presión de vapor del solvente puro.

$f_1$  = " " " " " en la solución.

$f_1^0$  = fugacidad del solvente puro a la presión considerada.

$f_1$  = " " " en la solución.

$F_1^0$  = energía libre molar del solvente puro a la presión  $p_0$  y temperatura considerada.

$F_1$  = energía libre parcial molar del solvente en la solución.

se cumplirá:  $\bar{F}_1 < F_1^0$

Para alcanzar el equilibrio pueden considerarse varios mecanismos. Uno es el fluir del solvente dentro de la solución (ósmosis), cesando la ósmosis al alcanzar dicho equilibrio.

Otra forma es la siguiente:

Sabemos que

$$\left( \frac{\partial \bar{F}_1}{\partial P} \right)_T = \bar{v}_1 \qquad d\bar{F}_1 = \bar{v}_1 \cdot dp$$

Por lo tanto  $\bar{F}_1$  puede aumentarse incrementando  $p$ .

Si llamamos  $P$  a la presión sobre el pistón necesaria para alcanzar el equilibrio, igualando las energías libres, tenemos:

$$P = \pi + p_0 \qquad \therefore \qquad \pi = P - p_0$$

La presión osmótica  $\pi$  es la sobrepresión que se necesita aplicar a la solución para alcanzar un estado de equilibrio.

Integrando

$$\int_{\bar{F}_1}^{\bar{F}_1^0} d\bar{F}_1 = \int_{f_1}^{f_1^0} RT \, d \ln f_1 = \int_{p_0}^P \bar{v}_1 \cdot dp$$

$$\bar{F}_1^0 - \bar{F}_1 = RT \ln \frac{f_1^0}{f_1} = v_1 (P - p_0) = v_1 \pi$$

Hemos supuesto que  $\bar{v}_1$  es igual a  $v_1$ , lo que es muy aproximado.

Esta ulterior expresión representa el trabajo gastado en transferir un mol de solvente a través de la membrana.

Si consideramos que la solución es ideal, por la ley de Raoult tenemos

$$f_1 = f_1^0 \cdot N_1$$

donde  $N_1$  es la fracción molar del solvente:

$$N_1 = \frac{n_1}{n_1 + n_2}$$

Entonces

$$\pi = \frac{RT}{v_1} \ln \frac{f_1^0}{f_1} = -\frac{RT}{v_1} \ln \frac{f_1}{f_1^0} = -\frac{RT}{v_1} \ln N_1$$

$$\pi = \frac{RT}{v_1} \left[ -\ln(1-N_2) \right]$$

Desarrollando el logaritmo en serie de Taylor

$$\pi = \frac{RT}{v_1} \left( N_2 + \frac{1}{2} N_2^2 + \frac{1}{3} N_2^3 + \dots \right)$$

Si la solución es diluida pueden despreciarse los términos a partir del segundo.

$$\pi = \frac{RT}{v_1} \cdot N_2 = \frac{RT}{v_1} \cdot \frac{n_2}{n_1+n_2}$$

Por la misma razón se desprecia  $n_2$  en el denominador

$$\pi = \frac{RT}{v_1} \cdot \frac{n_2}{n_1}$$

y como  $n_1 \cdot v_1$  es el volumen total  $V$  de solvente

$$\pi = RT \cdot \frac{n_2}{V}$$

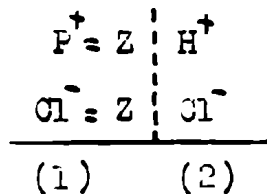
$\frac{n_2}{V}$  es la concentración del soluto en moles por litro de solvente, que para soluciones diluidas puede considerarse igual a la molaridad  $c$  (moles / litro de solución) y obtenemos la conocida fórmula

$$\pi = R T c$$

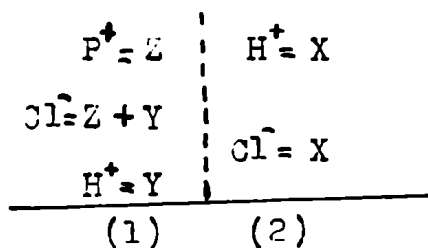
En el caso de que el soluto sea una proteína, ocurre que los electrolitos difusibles no se disponen en actividades iguales a ambos lados de la membrana, debido a que la presencia de la proteína, que es en realidad un electrolito no difusible. El exceso de iones en el interior de la membrana, produce un exceso de presión osmótica, llamado diferencia de presión

iónica. Esta distribución no uniforme está considerada por la teoría del equilibrio de membrana de Donnan (5).

Consideremos una sal de un ácido monovalente y una proteína, suponiéndola totalmente ionizada, de un lado de la membrana, estando del otro el ácido. Sus concentraciones equivalentes serán:



Al establecerse el equilibrio, tendremos por la condición de electro-neutralidad:



La variación de energía libre correspondiente a la transferencia de un mol de ácido clorhídrico a través de la membrana, será nula al estado de equilibrio, y estará dada por

$$(\Delta \bar{F})_{ClH} = RT \ln \frac{(H^+)_2}{(H^+)_1} + RT \ln \frac{(Cl^-)_1}{(Cl^-)_2} = 0$$

Para esto es necesario que se cumpla

$$\frac{(H^+)_2}{(H^+)_1} = \frac{(Cl^-)_1}{(Cl^-)_2} \therefore (H^+)_2 (Cl^-)_2 = (H^+)_1 (Cl^-)_1$$

Teniendo en cuenta las designaciones dadas para las concentraciones equivalentes :

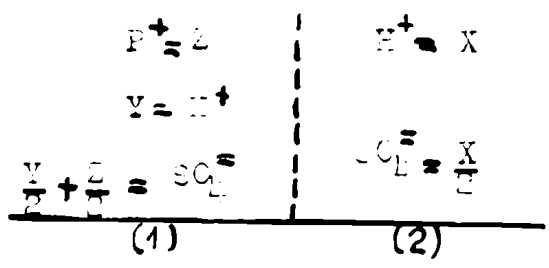
$$\frac{X}{Y} = \frac{Y+Z}{X} \qquad X^2 = Y(Y+Z)$$

Se define como coeficiente de Donnan o relación de distribución a:



$$\lambda = \frac{X}{Y} = \frac{(H^+)_{2}}{(H^+)_{1}} = \frac{(Cl^-)_{1}}{(Cl^-)_{2}}$$

El  $\lambda = 1$  la distribución es uniforme, esto es, el ácido está totalmente ionizado, esto es, en equilibrio, con

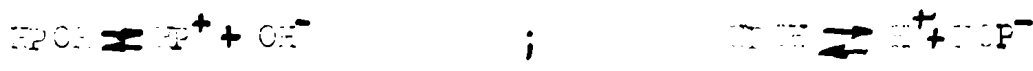


$$\frac{(H^+)_{2}}{(H^+)_{1}} = \sqrt{\frac{(SO_4^{2-})_{1}}{(SO_4^{2-})_{2}}} \quad \frac{X^2}{Y^2} = \frac{1/2 (Y+Z)}{1/2 X} \quad \therefore X^3 = Y^2 (Y+Z)$$

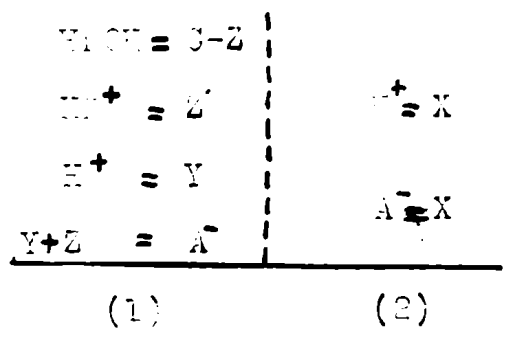
Entonces, para  $\lambda = 1$ , tenemos un número de iones distribuidos:

$$\frac{(K^+)_{2}}{(K^+)_{1}} = \frac{(K^+)_{2}}{(K^+)_{1}} = \sqrt{\frac{(OH^{++})_{2}}{(Ca^{++})_{1}}} = \sqrt{\frac{(E^{n+})_{2}}{(E^{n+})_{1}}} = \frac{(OH^-)_{1}}{(OH^-)_{2}} = \frac{(Cl^-)_{1}}{(Cl^-)_{2}} = \sqrt{\frac{(SO_4^{2-})_{1}}{(SO_4^{2-})_{2}}} = \sqrt{\frac{(A^{m-})_{1}}{(A^{m-})_{2}}}$$

Donde  $E^{n+}$  es una función de  $Ca^{++}$  y  $A^{m-}$  es una función de  $Cl^-$ .  
 En el caso de un ácido débil, cuando el ácido está en equilibrio con sus iones, se tiene:



Entonces si consideramos los iones distribuidos en cada compartimento, en equilibrio, tenemos:



Aplicando el mismo tratamiento se llega a

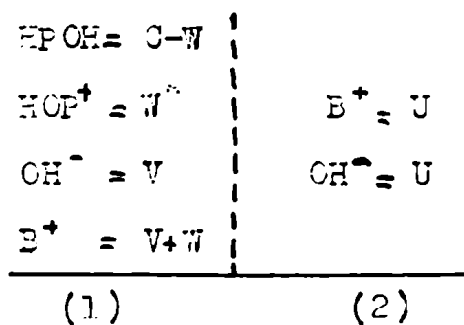
$$\lambda = \frac{X}{Y} = \sqrt{1 + \frac{C}{K_1 + Y}}$$

Donde  $K_1$  es la constante  $K_w/K_b$  siendo:

$$K_w = (H^+) \cdot (OH^-) \quad \text{y} \quad K_b = \frac{(HF^+) \cdot (OH^-)}{(HPOH)}$$

Vemos que  $\lambda$  tenderá a uno cuando  $Y$ , es decir la concentración de ión hidrógeno sea muy alta. Esta es una forma de anular el efecto Donnan.

Si consideramos ahora a la proteína como un ácido no difusible, en presencia de una base monovalente:



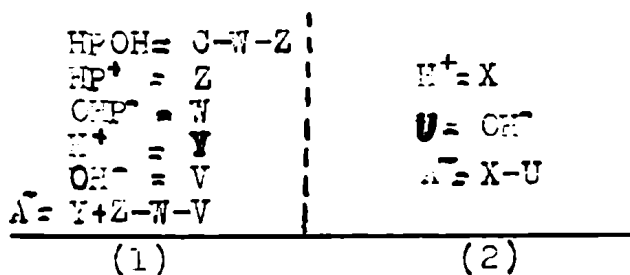
Llegando a

$$\lambda = \frac{V}{U} = \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{C}{K_2 + V}}}$$

Donde  $K_2 = K_w / K_a$   $K_a = \frac{(H^+) \cdot (POH^-)}{(HPOH)}$

Se ve que  $\lambda$  tiende a uno cuando la concentración de OH<sup>-</sup> es muy alta. Otra forma de anular el efecto Donnan.

Por último, si se considera que ambas ionizaciones se presentan simultáneamente, que es lo que realmente ocurre, tenemos, tomando un ácido monovalente difusible



Se llega a

$$\lambda = \sqrt{\frac{1 + c(Y^2 - I^2)}{Y(Y^2 + YK_1 + I^2)}}$$

Donde I es la concentración de H<sup>+</sup> correspondiente al pH isoelectrico de la proteína.

Vemos que cuando la concentración de H<sup>+</sup> sea igual I,  $\lambda=1$ , anulándose el efecto Donnan.

Además, de la igualdad vista al principio

$$x^2 = Y(Y+Z)$$

se deduce que cuando X e Y sean grandes, es decir, la concentración de electrolitos alta, el efecto de Z se hace despreciable quedando

$$x^2 \cong Y^2$$

sea el efecto Donnan se anula a altas concentraciones de iones difusibles. De la misma manera si Z es pequeño, es decir hay poca proteína presente, se obtendrá también distribución uniforme.

Veamos como actúa el efecto Donnan sobre la presión osmótica de soluciones proteicas. Consideremos el caso simple visto previamente de un catión proteico en presencia de un ácido monovalente. Sea a la concentración molar de la proteína. La presión osmótica observada  $\Pi$  en el equilibrio osmótico, será entonces

$$\Pi = RTa + RT(Y+Z) + RTY - 2RTX$$

$$\Pi = RTa + 2RTY - 2RTX + RTZ$$

$$\Pi = RTa + RT(2Y - 2X - Z)$$

si llamamos

$$2Y + 2X - Z = e$$

$$\Pi = RTa + RTe$$

El primer término corresponde a la presión osmótica coloidal de la proteína o "presión oncótica", mientras que el segundo es debido a la diferen

cia de presión osmótica resultante del efecto Donnan.

$$\text{Haciendo } \pi_p = RTa \quad ; \pi_D = RTc \quad \therefore \pi = \pi_p + \pi_D$$

La presión debida al efecto Donnan será entonces

$$\pi_D = RT(2Y - 2X + Z)$$

Como  $\lambda = \frac{X}{Y} = \frac{Y+Z}{X}$  será, reemplazando:

$$\pi_D = RT(Y - 2\lambda Y + \lambda^2 Y)$$

$$\pi_D = RTY(\lambda^2 - 2\lambda + 1) = RTY(\lambda - 1)^2$$

Cuando  $\lambda$  sea igual a uno la presión de Donnan será cero y se observará únicamente la presión debida a la proteína, que es independiente de dicho efecto.

Puede demostrarse que este razonamiento es también válido al considerar la proteína como electrolito anfótero.

En el caso del suero no es posible anular el efecto Donnan ubicándose en el punto isoeléctrico, ya que se trata de una mezcla de proteínas; tampoco es posible ponerse en la zona muy ácida o muy alcalina, o aumentar mucho la concentración salina, pues además hay peligro de desnaturalización, y lo que se desea es trabajar en condiciones fisiológicas. Además, si se trabaja con muy pequeña concentración proteica, la precisión del método es poca. El problema se resuelve aplicando el tratamiento de Adair (6)(7) (3).

En el cálculo del peso molecular de proteínas, deben tomarse en cuenta tres factores: la diferencia de presión iónica, el efecto de volumen de proteína hidratada, y los efectos de las fuerzas de interacción entre las moléculas. Se puede considerar

$$p = \phi RT C_p = \phi RT (10 C/L)$$

$p$  = presión osmótica leída.

$C_0$  = moles de proteínas por litro de solución.

$\phi$  = coeficiente que representa la suma de los efectos osmóticos debido a los tres factores recién nombrados.

$C$  = gramos de proteína por 100 ml de solución .

$M$  = peso molecular de la proteína.

Si se hace el cociente entre la presión leída, en mm de Hg a  $C^\circ C$ , y la concentración  $C$  correspondiente, se tiene para cada concentración

$$\pi = p/C$$

El valor límite de esta relación en la solución infinitamente diluida, se denomina  $\pi_0$ , y se obtiene extrapolando para  $C = 0$  la curva que representa  $\pi$  en función de  $C$ . Se observó que las presiones pueden representarse por la fórmula empírica:

$$p = \frac{\pi_0 C}{1 - K_b C}$$

donde  $K_b$  es una constante, con un efecto semejante a la corrección de volumen  $b$  de Van der Waals. Si pasamos  $C$  al primer miembro

$$p/C = \pi = \frac{\pi_0}{1 - K_b C}$$

invertiendo

$$1/\pi = \frac{1}{\pi_0} - \frac{K_b C}{\pi_0}$$

Vemos que hay una relación lineal entre  $1/\pi$  y  $C$ . Por lo tanto será más fácilmente extrapolable esta función.

Como la extrapolación da el valor para la concentración proteica **Cero**, se elimina así el efecto Donnan y los otros inconvenientes mencionados.

Corresponde entonces hacer una serie de mediciones de presión osmótica a distintas diluciones del suero.; Construir el gráfico de  $1/\pi$  en función de  $C$ , extrapolar, y el valor hallado reducirlo a mm de Hg a  $0^\circ C$ , pudiendo

entonces calcularse el peso molecular medio del suero por la fórmula:

$$M = \frac{10RT}{\pi_0} = \frac{170.330}{\pi_0}$$

### 3) MÉTODOS DE MEDICIÓN DE PRESIÓN OSMÓTICA DE PROTEÍNAS.

Las primeras mediciones sobre presión osmótica de proteínas fueron hechas por Sørensen en 1917, utilizando el método de determinar la presión negativa a ejercer sobre el líquido exterior para impedir la ósmosis.

Es de importancia el trabajo de Adair (9), quien realizó mediciones de hemoglobina de oveja y caballo, en 1925, utilizando buffers de fosfato.

Usaba un aparato consistente en un tubo de ensayo ancho con un tapón atravesado por un capilar que oficiaba de manómetro. Los tiempos requeridos para la equilibración eran desde 24 horas a tres semanas, y, por esta razón, para evitar desnaturalizaciones, trabajaba a 0°C, introduciendo el aparato en un termo lleno de hielo en equilibrio con agua. Para la preparación de las membranas de colodio utilizaba el método de gotear la solución de colodio sobre un tubo horizontal rotante, cerrado en un extremo. Este último método se verá luego en detalle.

Realizaba mediciones de varias concentraciones distintas y luego calculaba el peso molecular por el método de extrapolación.

En 1930 Eurs y Greenberg (10), utilizaron un método de medición semejante, pero para la preparación de las membranas de colodio vertían su solución en las paredes interiores de un tubo de ensayo bien pulido, previamente recubiertas de caramelo, disolviendo luego éste en agua.

Bull en 1941(3) hizo mediciones de presión osmótica de ovalbúmina, mediante el aparato y método que veremos con detalle en la parte experimental. No utilizaba el método de extrapolación, calculando el peso molecular por la fórmula

$$M = 2,530 \cdot 10^5 \cdot c/p$$

donde  $p$  es la presión osmótica en cm de agua y  $C$  es la concentración proteica en g/100 ml de solución.

Indicaba la ventaja de obtener el equilibrio final en unas dos horas. Trabajaba a 25°C.

El mismo autor hizo en 1946 (4) mediciones sobre  $\beta$ lactoglobulina, utilizando el mismo método con la diferencia que buscaba inicialmente el equilibrio por agregado de una columna de solución, tal que compensase la presión osmótica por su presión hidrostática. En esta forma no obtenía casi movimiento del menisco en el manómetro de tolueno, lo cual es una ventaja, pues elimina la necesidad de capilares calibrados.

Scatchard y colaboradores publicaron en 1946 (11), un trabajo en que describen en forma minuciosa la preparación de membranas por el método de rotación, indicando la dificultad para obtener un alto porcentaje de membranas satisfactorias. El osmómetro utilizado es más complicado que el de Bull usando dos tipos de manómetros de tolueno, para altas y bajas presiones osmóticas. Las mediciones fueron realizadas sobre proteínas plasmáticas, a 25°C.

Un método para preparar las membranas enteramente diferente a los ya vistos es el de Brown (12) que también veremos luego en detalle.

#### 4) PRECIÓN OSMÓTICA DE SUEROS

En 1938 (13) Zozaya estudió la presión osmótica del suero, por el método de Adair, pero haciendo las mediciones sobre suero sin diluir. Como líquido exterior usó buffer de  $\text{PO}_4 \text{HNa}_2 - \text{PO}_4 \text{H}_2\text{K}$  de  $\text{pH} = 6,81$ .

Indica como valores medios para sueros de 1,02717 g/ml de densidad, y 7,037 % de proteína total, una presión osmótica de 11,96 mm Hg. Esto corresponde a una presión por gramo de proteína de 1,702 mm Hg, indicando que la teórica en base a la composición del suero es 1,876.

El peso molecular medio de las proteínas, calculado en base a los datos de composición y pesos moleculares dados por Zozaya sería de 106.700.

Scatchard (2) y sus colaboradores realizaron mediciones de plasma por los métodos mencionados, indicando un peso molecular medio de 90.000.

Popjak y Mc Carthy (14) midieron la presión osmótica de suero humano normal y lipémico por el método de Adair, utilizando suero previamente dializado durante 48 a 72 horas contra varias porciones de buffer de fosfato de pH 6,8, usando este buffer luego como líquido exterior.

Los tiempos de equilibración eran de 10 a 14 días, manteniendo a 0°C la temperatura. Utilizaron el método de extrapolación de Adair. La concentración proteica se medía determinando nitrógeno por micro-Kjeldahl.

Como peso molecular medio para suero normal indican 84.400, y para el suero lipémico dan un valor de 112.400.-



## II- TRABAJO EXPERIMENTAL

### 1) PREPARACION DE LAS BRANAS DE COLODIO

Para la preparación de membranas se utilizó el método descrito por Seachard (II), Zozaya (13), y otros.

Se ensayaron como materia prima los colodios de distinta procedencia siguientes: colodio Merck al 4%; pariodion Mallinckrodt sólido; colodion normal al 6% de la British Drug Houses Ltd. (B.D.H.); colodion elástico al 6% de La Estrella; colodion Duperial, y un colodio sin marca, al 6%, que se poseía en el laboratorio con anterioridad.

En cada caso el material respectivo se llevó a una dilución conveniente con mezcla de alcohol etílico de 95° y eter en proporción 3 a 1; esta dilución estaba indicada por la fluidez necesaria para poder pinetear y verter gota a gota con facilidad, y debía determinarse en cada caso por tanteos.

De los materiales mencionados, solamente se obtuvo buen resultado con el colodio (B.D.H. diluido al 1/3 con la referida mezcla alcohol eter, y con el colodio de origen desconocido diluido al medio.

Con los demás materiales se obtuvieron membranas frágiles, de aspecto inhomogeneo, que presentaban tendencia a pegarse en los moldes y se rompían al sacarlas, generalmente longitudinalmente, o sino, se partían transversalmente al tirar por ambos puntos.

El método consistió en lo siguiente:

Se utilizaron como molde, tubos de vidrio de 10,7 mm de diámetro externo y unos 150 mm de longitud, con un extremo abierto y el otro cerrado en forma de tubo de ensayo, estando en algunos casos este último extremo perforado con un agujero de 0,1 mm, cuya misión veremos luego.-

El tubo se mantenía rotando en posición sensiblemente horizontal alrededor de su eje longitudinal, pero con una inclinación de dos o tres grados, manteniendo el extremo cerrado más bajo que el otro.

Para este fin se insertaba en el extremo abierto un tubo de goma de diámetro adecuado colocado sobre el extremo de un eje metálico con la inclinación adecuada, mantenido por un soporte y con una polea fija en su otra punta. (Ver fotografía).

Esta polea de diámetro conveniente obtenía veinte revoluciones por minuto, iba vinculada por una correa a un motor eléctrico con reducción.

Una vez colocado el tubo en posición, y en marcha el motor, se pipeteaba la solución de colodio dejando caer el líquido gota a gota sobre el molde, desde una altura de unos tres centímetros, de tal manera que al chocar con la superficie exterior del vidrio la gota se abría, y por efecto de la rotación formaba un anillo alrededor del tubo. El goteo comenzaba por el extremo abierto y se iba corriendo la pipeta lentamente a lo largo del tubo, hacia el extremo cerrado, de tal manera que, ayudada por la inclinación del tubo y la rotación, los sucesivos anillos se fueron uniendo formando una capa continua sobre el molde.

La dilución de la solución, la velocidad de rotación del tubo, su inclinación, y la velocidad de goteo fueron elegidas de tal manera que se obtuviera un film continuo de colodio, sin dejar "islas" de vidrio no cubierto.

Si la solución es muy concentrada, las gotas no se extienden; si es demasiado diluida caen rápidamente del tubo, dejando una capa excesivamente delgada. Si el tubo rota con distinta velocidad de la conveniente, se observó dificultad para sincronizar el goteo. Si el tubo tiene demasiada inclinación la solución correrá muy rápidamente hacia la punta, dejando incompletos los anillos. Si por el contrario, el tubo está completamente horizontal, no se obtiene una unión perfecta entre los sucesivos anillos.



Al llegar el goteo a la punta cerrada se tomaba especial cuidado en que quedara completamente cubierta, permitiendo las gotas superponerse unas a otras, a fin de obtener en esta parte una pared más gruesa, ya que se observó una mayor tendencia en las membranas terminadas a perder por la punta.

La operación de depositar una capa llevaba término medio unos sesenta segundos, dependiendo todas las condiciones del material, de manera que no es posible dar normas estrictas, sino que en cada caso particular debe ajustarse el método por tanteo.

Una vez depositada la primer capa, se dejaba el tubo rotando durante cinco minutos para permitir la evaporación de parte del solvente, de manera de obtener un film semisólido. Luego se extendía en la misma forma una segunda capa y así sucesivamente, dejando siempre intervalos de cinco minutos entre cada una. Si el intervalo es demasiado corto, las gotas al caer disuelven rápidamente y se mezclan con el film de la capa anterior, obteniéndose membranas finas y débiles; en caso de ser mayor el intervalo, la superficie estará demasiado seca y no habrá una unión entre ambas capas tan perfecta como para dar una pared homogénea.

No apareció como necesario colocar una fuente calefactora en las cercanías del tubo rotante, para acelerar la evaporación, según indican algunos autores.

Se seguían agregando capas hasta obtener una membrana de aspecto conveniente. En el caso de colodio E.D.H. se utilizaron cuatro y cinco capas.

Luego de la última capa se dejó secar al aire durante media hora, manteniendo los 10 primeros minutos en rotación y luego en posición vertical.

Por fin los tubos se sumergían en un vaso con agua a fin de disolver el resto de la mezcla alcohol-eter, durante 24 horas.

Al día siguiente se lavaban con un chorro de agua, y se procedía a hacer una incisión con una hoja de afeitar, en la membrana todo alrededor

del tubo, en la parte cercana al extremo abierto, pero a aproximadamente un centímetro del bordé del film de colodio. Esto se debe a que el extremo de las membranas, debido a la deposición de capas sucesivas, se presentaba en forma no definida nítidamente.

Una vez retirada la parte cortada, se tomaba a la membrana entre el pulgar y el índice y hacía presión en dirección al extremo cerrado, de tal manera de ir deslizando el saco de colodio a lo largo del molde, esta operación se veía facilitada por la presencia del pequeño agujero en la punta del tubo pues éste permitía el paso del aire del tubo, al espacio que se iba formando entre la punta de la membrana y la del tubo.

En algunos casos se observó que la membrana va corriendo a lo largo del tubo en toda su longitud, obteniéndose membranas lisas; en otros casos la punta permanecía adherida al tubo hasta último momento, obteniéndose membranas arrugadas.

El parlodion Mallinckrod y los colodios Merck, Duperial y elástico presentaron gran dificultad para realizar esta operación sin romper la membrana.

Una vez sacada la membrana, se lavaba con abundante agua y se procedía a revisar la presencia de pérdidas, lo que se realizaba llenándola de agua y apretando con los dedos el extremo abierto; al hacer presión con la otra mano sobre la membrana, no se debía obtener salida de líquido en forma de finos chorros a través de las paredes laterales y la punta.

El almacenaje de las membranas se realizó siempre bajo agua, pues al quedar expuestas al aire, se resecan, y hacen rígidas y quebradizas.

Las membranas de colodio elástico y Duperial, que presentaron la mayor tendencia a ser frágiles mostraban un blanqueamiento en forma de manchas, durante la operación de deposición de las capas sucesivas.

Una vez obtenidas con un material membranas de buenas propiedades mecánicas, se realizaba la comprobación de la semipermeabilidad.

Para ello se colocaba en la membrana una solución de cloruro de potasio al 4% y la proteína de interés, y se sumergía la membrana en agua de g u l a d e s t i l a d a, una vez lavada su superficie exterior perfectamente.

A intervalos de tiempo se retiraban dos porciones del líquido exterior, y se agregaba en una, gotas de nitrato de plata 0,1 N, debiendo dar reacción positiva de cloruros, A la otra porción se le agregaba un volumen igual de ácido tricloroacético al 10%, debiendo obtenerse reacción negativa de proteína. En algunos casos estos ensayos se continuaron durante dos días.

Los dos materiales que presentaban buenas propiedades mecánicas, demostraron dar membranas permeables al ClK en pocos minutos e impermeables a las proteínas.

Los colodios elástico y Duperial dieron membranas impermeables por completo a electrolitos. Es posible que esto sea debido al agregado de sustancias extrañas como plastificantes, tales como el aceite de ricino.

Las buenas membranas tenían en general un espesor de pared de alrededor de 40/100 de mm.

También se ensayó la preparación de membranas por el método de Brown (2), para lo cual se sumergía el tubo molde de las dimensiones ya dadas pero sin perforación en la punta, en la solución de colodio, hasta una profundidad de unos 7-8 cm y luego se invertía rápidamente, girando el tubo para que el film de colodio se extendiera lo más homogéneamente posible hacia el extremo abierto.

Rápidamente se colocaba en el extremo del tubo un tapón de corcho con una perforación igual al diámetro exterior del tubo, y partido al medio

para poder ponerlo y quitarlo con facilidad. Entonces el tubo se introducía en un erlenmeyer de medio litro, mantenido fijo con la boca hacia abajo que poseía un cuello de diámetro tal para poder ajustar el tapón.

De esta manera se forma una atmósfera de solvente en el interior del erlenmeyer produciéndose un secado lento, al cabo de cinco minutos el tubo se retiraba. Se quitaba el tapón y se sumergía en agua por espacio de 24 horas.

Con este método se obtuvieron membranas demasiado finas, de paredes no homogéneas y que perdían en su mayoría por la punta.

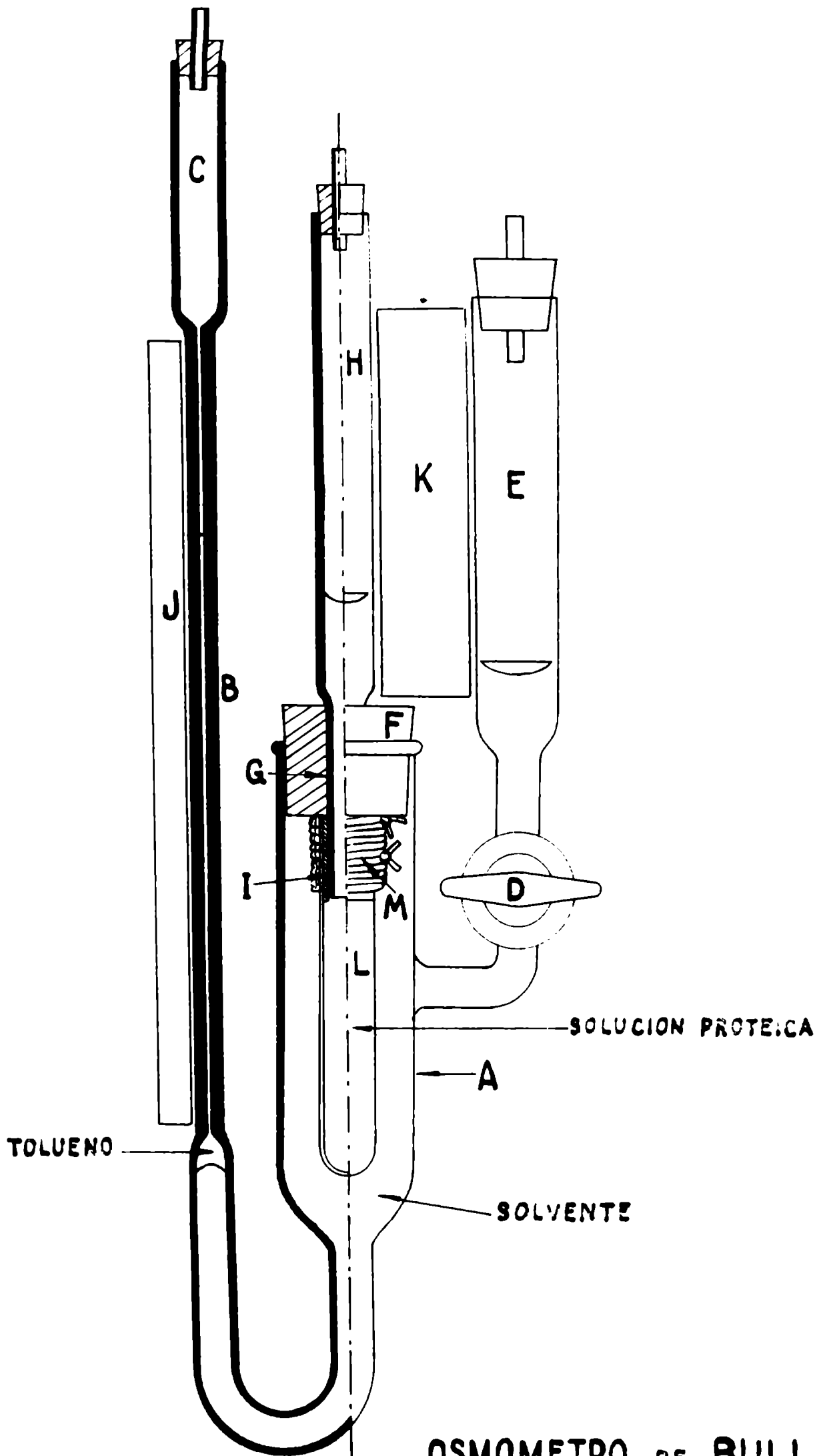
Se trató de obviar el inconveniente utilizando concentraciones de colodio mucho mayores que en el método de Scachard, pero se tropezó con el inconveniente de que las soluciones demasiado viscosas no corrían bien sobre el molde encontrándose dificultad en el manipuleo del tubo para formar la membrana.

Por esta razón, se adoptó el método Scachard para la producción de las membranas usadas en las mediciones.

## 2) OSMOMETRO DE BULL

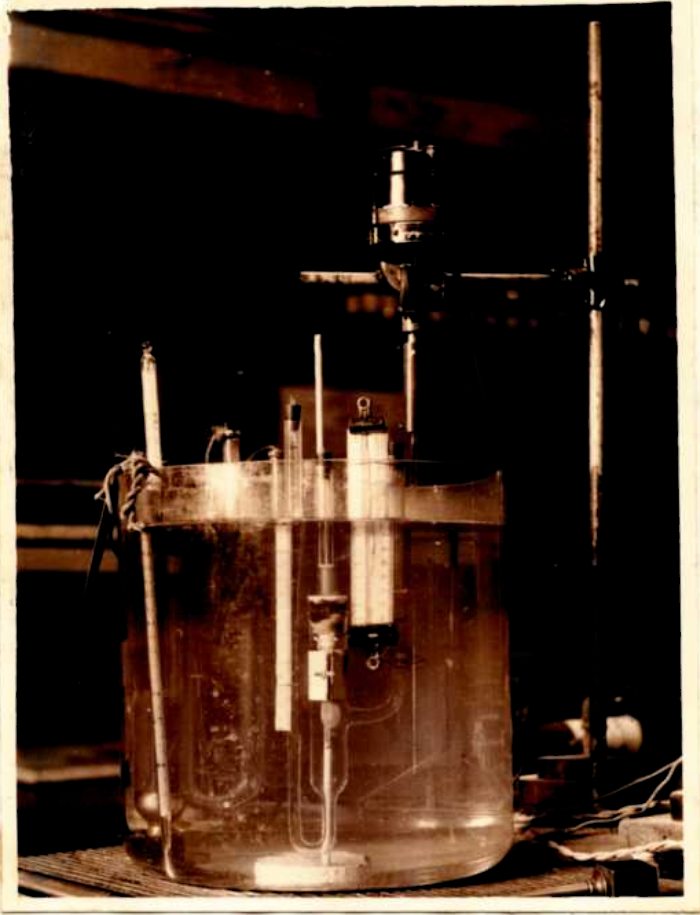
Para las mediciones se utilizó el aparato de Bull(3) (4). Este osmómetro, realizado en vidrio Pirex, consta, según puede verse en el esquema, de un cuerpo central (A), cilíndrico, de 25 mm de diámetro por 100 mm de alto, prolongado en forma de U por un manómetro, constituido por un tubo capilar (B), de 0,5 mm de diámetro interno y 150 mm. de longitud, que tiene soldado un tubo de 10 mm de diámetro (C) en su parte superior, para facilitar la carga.

Del cuerpo A parte una tubuladura lateral acodada, que lleva una llave de una vía (D) y en la parte superior se ensancha en un tubo de 15 mm de diámetro (E).



**OSMOMETRO DE BULL**  
 ESCALA 1:1





El cuerpo A va cerrado por un tapón de caucho (F) de diámetro apropiado para obtener un perfecto ajuste. Este tapón está perforado y es atravesado por un tubo (G) central, que en su parte inferior, de longitud de 35 mm, tiene un diámetro externo de 7 mm, y es continuado por una parte ensanchada (H) de 30 mm de longitud y 10 mm de diámetro.

La parte fina del tubo B debe sobresalir por lo menos 15 mm hacia abajo del tapón. Sobre esta parte se desliza un tubo de caucho (I), cuyo espesor debe ser tal que se obtenga un diámetro total levemente inferior al diámetro interno de la membrana usada, de tal manera de poder enchufar el tubo en la membrana en forma más o menos ajustada, pero sin romperla. Como las membranas suelen diferir al o en diámetro, entre sí, fué conveniente tener un conjunto de tubos de caucho de distinto espesor, y seleccionar el adecuado en cada caso.

Las bocas de los tubos C, E y H se obtienen con tres tapones de goma, impedir la entrada de materias extrañas y disminuir la evaporación, pero estos tapones van atravesados por un tubo de vidrio de 2 mm de diámetro para permitir el equilibrio con la atmósfera.

Para la obtención de la temperatura constante, indispensable para estas mediciones, se dispuso un baño termostático, constituido por una cuba cilíndrica de vidrio Pyrex de unos 30 litros de capacidad, llena de agua mantecada a  $25^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$  por medio de un termo regulador de tubo-mercurio, operante sobre una resistencia de inmersión, y el correspondiente sistema de transformador y relays. El conjunto se completó con un agitador con motor eléctrico y un termómetro para control.

A fin de mantener la estabilidad del oscilómetro durante el manipuleo y dentro del bulbo, se fijó en un soporte especial consistente en una abrazadera metálica, ajustable a tornillo sobre el cuerpo A y unida a una barra vertical fija en un pie de peso adecuado.

El aparato se completó con dos escalas milimetradas, de material plástico, (J) y (K), adhesivas, una al tubo capilar, y otra mantenida entre los tubos E y H. La misión de estas escalas era permitir la lectura de los niveles de los meniscos en los tres tubos. En rigor es recomendable el uso de un centómetro, en caso de poder disponerse de él.

### 3) METODO DE MEDICION

Una vez perfectamente limpio y seco el osmómetro, la operación se comenzaba agregando el líquido exterior con pipeta, por el cuerpo A hasta alcanzar un nivel, unos cinco mm, por debajo del comienzo inferior del capilar B.

Entonces se agregaba tolueno puro por el tope de C hasta llegar a pasar levemente el extremo inferior del capilar. Generalmente debía hacerse descender el tolueno, haciendo una leve presión con la yema de un dedo sobre la abertura de C. quedaba así establecido el menisco tolueno-líquido exterior.

A continuación se vertía líquido exterior por el cuerpo A hasta que el nivel sobrepasaba algo la llave D, que debe estar abierta durante toda la operación hasta que se indique lo contrario.

Se llega así a la parte más delicada de la operación, la colocación de la membrana.

Esta se cortaba de una longitud apropiada, de tal manera que la punta cerrada de la membrana, una vez colocada, quedaba a uno o dos centímetros del fondo del cuerpo A. Conviene comenzar con la mayor longitud de membrana posible, pues al usarlas sucesivas veces se rascan en la parte de las puntaduras, y debe irselas cortando. Se ha trabajado sin dificultades con membranas de longitud tal que sobresalían solo aproximadamente 20 mm del extremo inferior del tubo de goma I.

Una vez ajustada la longitud, se desliza la membrana por fuera del tubo I hasta llegar con su borde a tocar la parte inferior del tapón F.

La membrana (L) se ajustaba al tubo de goma por medio de bandas elásticas de goma (M), lavadas con agua destilada. Para ello se enrollaba una banda de goma en forma de espiral, sobre la membrana, comenzando al nivel del contacto del tubo I con el tapón y dejando unos centímetros al extremo de la banda libres. El enrollado se hacía hacia el otro extremo hasta llegar a utilizar aproximadamente la mitad de la longitud de la banda, manteniéndola siempre en tensión. Al llegar a este punto se invertía el sentido, volviendo hacia el tapón, de manera de formar una nueva capa sobre las espiras de la primer capa de goma. Al llegar nuevamente al tapón se ataba el extremo en operación de la banda con el otro extremo que se había reservado por medio de dos nudos bien ajustados.

A continuación de la última espira de goma se comenzaba a enrollar otra banda elástica hasta llegar casi al finel del tubo I, y se volvía hacia arriba dando en idéntica forma que la primer banda.

Debía entonces probarse la efectividad de la atadura, para ello se vertía agua por el tope del tubo H llenando completamente la membrana y parte de dicho tubo; se secaban perfectamente los bordes de la membrana y goma con papel de filtro y se tapan el tope del tubo con un pulgar, apretando varias veces la membrana entre los dedos de la otra mano. Se pasaba el borde de un papel de filtro por el borde de la membrana, no debiendo observarse humedecimiento del papel. De lo contrario se consideraba la atadura como no satisfactoria, volviendo a realizarla.

Se vaciaba la membrana antes de proseguir. La operación de apretado de la membrana constituía una nueva ocasión para descubrir pérdidas en la misma.

Realizado todo esto, se colocaba el conjunto de membrana y tubo en posición en el osmómetro, de tal manera que al ajustar el tapón el nivel del líquido casi rebalsara el borde del cuerpo A.

De esta manera se evitaba la permanencia de burbujas en la parte inferior del tapón. En caso de que el nivel no alcanzara y en este propósito, se agregaba algo más de líquido exterior por el tope del tubo E, y se repetía el cerrado con el tapón.

Se secaba con papel de filtro la junta tapón-vidrio y se colocaba en ella gresca de vacío por medio de una varilla, en forma de hacer un cierre continuo alrededor del tapón.

Colocados los pequeños tapones en los topos de los tres tubos, se colocaba el aparato en el baño termostático, conjuntamente con un erlenmeyer de tapa esmerilada conteniendo la dilución de suero a medir. Se termostataba como mínimo durante 15 minutos antes de proseguir la operación, no retirándose más el osmómetro del termostato, hasta dársele por terminado.

Se retiraban los tapones de los tubos E y H y se vertía con pipeta la solución proteica por el tubo H, llenando la membrana. Como muchas veces sucedía que, estando parcialmente llena la membrana se producía una columna de líquido en el tubo H, quedando por lo tanto aire dentro de la membrana, se introducía un fino tubo de vidrio, a través de H y G, subiéndolo y bajándolo varias veces hasta expulsar las burbujas.

Se observó que algunas veces, al colocar el tubo con la membrana vacía en su posición, esta última se aplastaba por la presión hidrostática del líquido exterior. En estos casos el resultado final estaba afectado de un fuerte error por defecto. Se supuso que este error era debido a que la membrana aplastada, al producirse la entrada del líquido exterior por ósmosis, modificaba su volumen, ensanchándose de manera que todo ocurría como si la membrana se hinchara absorbiendo cada vez más líquido en su interior, pe-

no sin variación del volumen total del líquido exterior.

Para evitar este inconveniente, se acostumbró a agregar un exceso del suero al llenar la membrana, de manera de obtener un nivel de líquido en H lo más cercano posible al tope del tubo, manteniendo el nivel de líquido exterior en E, apenas sobre el nivel de la llave D. De esta manera el exceso de presión hidrostática dentro de la membrana, la distiende al máximo, evitando posteriores cambios de volumen.

Inmediatamente se agregaba líquido exterior por E hasta unos milímetros por encima del <sup>comienzo de</sup> la parte ensanchada de este tubo. Este nivel determinaba el nivel del menisco tolueno-aire en el capilar. Conviene que este menisco que que se encuentre a unos cinco o diez milímetros por debajo del tope superior del capilar. En caso de utilizar soluciones concentradas de suero o de proteínas que tu vieran bajo peso molecular, es conveniente que el nivel inicial del tolueno sea del mismo bajo, pues al final de la experiencia, el menisco podría quedar por debajo del extremo inferior del capilar, perdiéndose precisión en la medida.

Por último se retiraba con pipeta el exceso de solución proteica, en forma de dejar un nivel 15 a 20 mm superior en H al del líquido exterior en E.

Una indicación de que la membrana estaba bien distendida se obtenía por que al variar el nivel en H, por retirar líquido, no se obtenía variación en el menisco de tolueno.

Se procedía entonces a leer el nivel del tolueno en el capilar, y la diferencia de niveles entre la solución de suero en H y el líquido exterior en E. Al hacer cada lectura, además, se leía como control la temperatura.

Se procedía entonces a cerrar la llave D que debía estar perfectamente

engrasada para evitar pérdidas,

Como generalmente la presión osmótica, era mayor que la presión hidrostática establecida por la diferencia de niveles, se observaba a partir del cierre un descenso lento pero continuo en el nivel del menisco mercurio-aire en V. Se iba registrando la altura alcanzada por el menisco a intervalos de 10 a 15 minutos, según la velocidad del descenso. Esta variación de nivel es motivada por el pasaje de líquido a través de la membrana, de afuera hacia adentro.

Al mismo tiempo se registraba la diferencia de niveles entre F y E.

Con la tabla obtenida, se construía un gráfico en coordenadas ortogonales, en papel milimetrado, de la altura del menisco de tolueno en función del tiempo.

En algunos casos se obtenía un pequeño ascenso inicial de unos milímetros, pero inmediatamente comenzaba la rama descendente.

Al cabo de un tiempo variable, entre una y dos horas, según la membrana, los puntos dispónense en forma horizontal por alcanzarse el equilibrio, con una pequeña dispersión en zig zag, por efecto de la leve fluctuación en la temperatura del termóstato, que producía contracciones y expansiones en el aparato, en el gráfico la curva se hacía pasar en forma de dejar igual número de puntos a cada lado, constituyendo una meseta.

La presión osmótica final en centímetros de agua, se calculaba de la siguiente manera: se hacía la diferencia de la lectura inicial del nivel de tolueno, menos el valor final del mismo, dado por la altura constante de la meseta en el gráfico. Esta diferencia se multiplicaba por la densidad del tolueno (0,86 g/ml) obteniéndose el equivalente en agua al descenso del tolueno.

A este valor se le suma la diferencia entre los niveles de solución

proteica y líquido exterior multiplicada por la densidad de la solución proteica. En el caso de diluciones de suero humano con cloruro de sodio, de concentración 9 g/l, la densidad de las diluciones obtenidas es sensiblemente igual a la de la solución diluyente, y como para soluciones de 10,5 g/l las tablas dan una densidad de 1,0053 g/l, la densidad de la solución usada puede tomarse igual a 1,00 g/l, sin error apreciable, ya que por otra parte en nuestro caso usábamos diferencias de nivel entre la solución proteica o suero y el líquido exterior, inferiores a los dos centímetros.

La suma obtenida, expresada en centímetros de agua es la presión osmótica de la solución.

Al realizar el cálculo en esta forma se cometen dos pequeños errores. Uno, consiste en que durante la experiencia, también se produce un descenso del nivel del menisco tolueno-líquido exterior. por lo tanto la diferencia de presión indicada por el manómetro de tolueno, no es exactamente la que se obtiene al multiplicar la diferencia entre el nivel inicial y final del tolueno por la densidad del mismo. Pero dado que este corrimiento hacia abajo del menisco es muy pequeño, debido a la gran diferencia entre los diámetros del capilar y el tubo subsiguiente, puede despreciarse el error correspondiente.

El otro error reside en que la solución proteica y el líquido exterior no tienen exactamente la misma densidad, por lo tanto la diferencia de presión hidrostática entre el interior y el exterior de la membrana no está dada solamente por la diferencia entre sus niveles, multiplicada por la densidad de la solución proteica. Según Bull este error es menor del 1%, hasta en las soluciones más concentradas, y además es casi contrabalanceado por el error que se comete posteriormente en los cálculos, al



tomar la concentración proteica sin tener en cuenta el efecto de aumento de la concentración que resulta de la hidratación de la proteína. En efecto, al despreciar la corrección por diferencias de densidades se obtendría una presión osmótica menor o sea un peso molecular mayor. Al despreciar el efecto de sobreconcentración por hidratación se obtiene, al tomar una concentración menor que la efectiva, un peso molecular menor. Si ambos errores son de la misma magnitud se anularán.

Terminada la medición, y retirado el osmómetro del termostato, se quitaba el tubo central de su posición, eliminando inmediatamente la grasa de vacío del tapón y borde del cuerpo A con un lienzo seco.

La operación de retiro de la membrana del tubo I es peligrosa para ella. Al fin de no romperla, se cortaba los nudos de goma, se volcaba la solución reemplazándola con agua se tapaba la boca del tubo, presionando suavemente sobre la membrana para que el agua se deslizara entre su pared y la goma. Conseguido ésto bastaba tirar hacia afuera con los dedos sobre el borde de la membrana para retirarla.

Se tenía especial cuidado en eliminar todas las proteínas de las paredes de la membrana con un chorro de agua, y por último se enjuagaba con agua descalcada.

Como el tolueno del capilar no podía eliminarse totalmente con agua, luego de lavarlo se llenaba el osmómetro con mezcla de alcohol-éter. Cerrando la llave D y colocando un tapón de goma sin agujerear en la boca de A, al hacer presión hacia abajo sobre dicho tapón, se conseguía hacer ascender el alcohol-éter por el capilar, eliminando las gotas de tolueno y secando el aparato.

#### 4) DETERMINACION FOTOCOLORIMETRICA DE LA CONCENTRACION PROTEICA

Para determinar la concentración en proteínas de los sueros se utilizó

la reacción del biuret por vía fotocolorimétrica, empleando un fotocolorímetro Thermotrón tipo "junior". Con esto se buscó evitar los largos manipuleos del Kjeldahl .

El reactivo (15) se preparó disolviendo 11,25 gramos de sal de Rochelle en unos 200 ml de hidróxido de sodio 0,2 N; agregando luego 1,25 gramos de sulfato de cobre(  $5 H_2O$ ) y cuando esta sal se hubo disuelto totalmente, añadiendo 1,25 g de ioduro de potasio. Se llevó esta solución a 250 ml con hidróxido de sodio 0,2 N y homogeneizó .

La calibración del fotocolorímetro se realizó con albúmina de bovino liofilizada. Para ello, se determinó previamente la humedad de la albúmina, pesando una cantidad conocida en un desfiltro seco, y manteniéndola en estufa a  $105^{\circ}C$  hasta obtener constancia de peso.

Se pesaron 0,400 g de una albúmina con 12,25 por ciento de humedad, y disolvieron en agua destilada, llevando a 10 ml el volumen. Se obtuvo así una solución de 3,51 g de proteína seca /100 ml.

Se hicieron diluciones sucesivas de ésta, tomando 5 ml y agregando un ml de agua destilada, luego tomando 5 ml de la solución así obtenida y agregándole otros 5 ml de agua y así sucesivamente.

Tres mililitros de cada dilución se mezclaron con igual volumen del reactivo. Se dejó transcurrir media hora y se hizo la medición fotocolorimétrica de cada uno.

Con los valores así obtenidos, se construyó un gráfico del número de divisiones leídas en función de la concentración.

Teniendo la curva de calibración, para determinar la concentración de un suero, se diluía 1 ml de éste con 25 ml de agua destilada; a 3 ml de esta solución se le agregaba 3 ml del reactivo y luego de media hora se realizaba la medición.

Se buscó en la curva de calibración el valor de concentración correspondiente al número de divisiones obtenidas y se multiplicó por 26 para obtener la concentración proteica del suero sin diluir.

El aparato utilizado consiste en un estabilizador de tensión que alimenta una lámpara, cuya luz pasa a través de un filtro constituido por un vidrio coloreado, atraviesa luego la muestra contenida en un tubo y llega a la fotocélula. En esta última se genera entonces una tensión que es medida por el sistema de oposición en un potenciómetro, siendo indicado el punto de equilibrio por un galvanómetro.

Para la medición, primeramente se debía poner la aguja del galvanómetro en cero, mecánicamente, por medio de la perilla correspondiente. Luego se conectaba a la red de 220 volts, 50 ciclos y encendíase el aparato con el interruptor. Se seleccionaba el filtro adecuado a nuestro caso, o sea el verde, y en el tubo de la muestra se colocaba el ensayo en blanco, constituido por 3 ml del reactivo mezclados con 3 ml de agua destilada. Colocado el tubo en su lugar, y luego de estar encendido el aparato por lo menos durante 15 minutos, se procedía a llevar a cero la aguja del galvanómetro por medio de la perilla de la izquierda, debiendo para ésto estar en cero el dial de medición.

Se reemplazaba entonces el blanco por la solución a medir, y se giraba el dial de medición hasta llevar nuevamente el galvanómetro a cero leyéndose el número de divisiones correspondiente.

En la calibración del fotocolorímetro se obtuvieron los siguientes valores:

Div.  
1cm: 2 divisiones

30

20

10

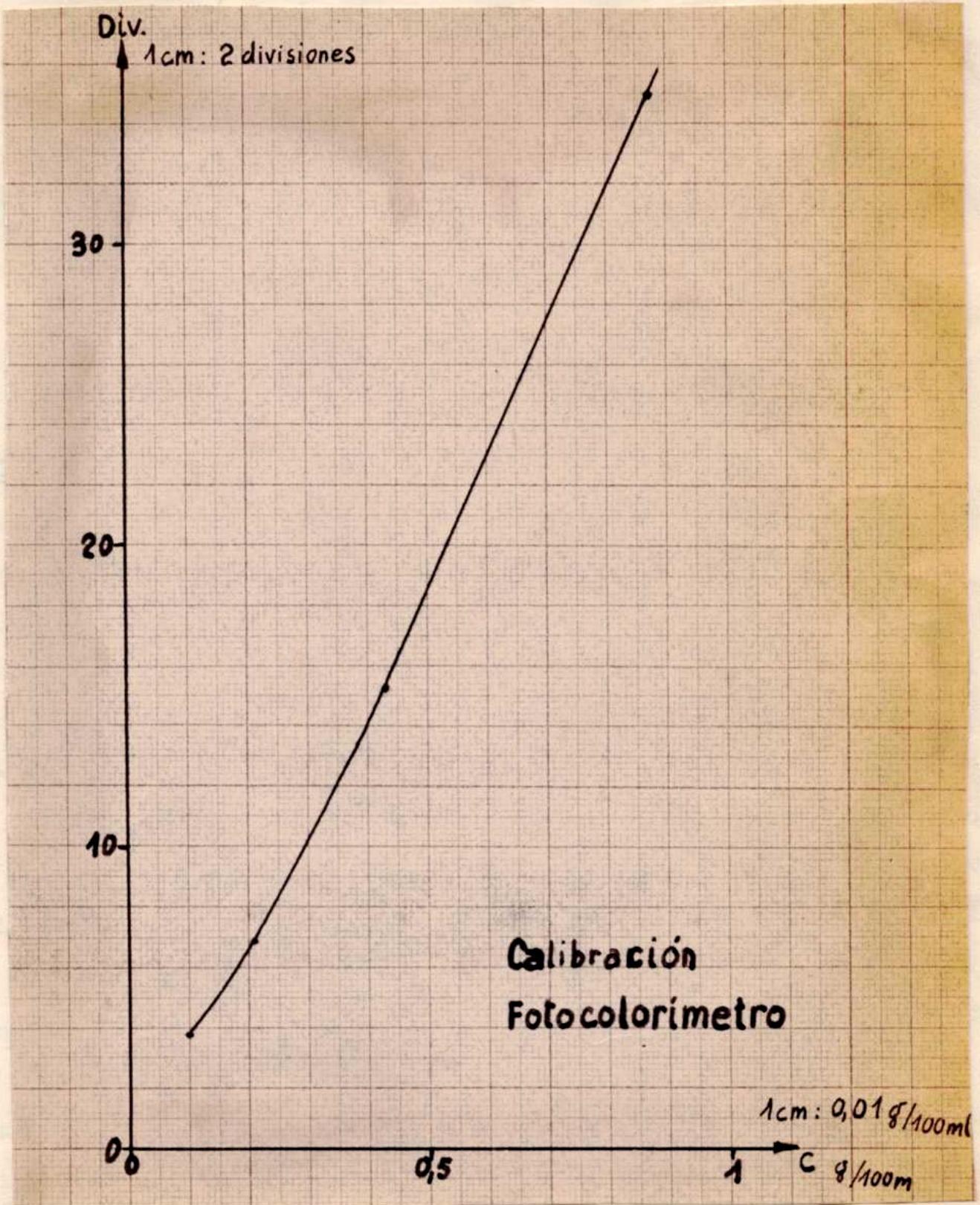
00

0,5

1

Calibración  
Fotocolorimetro

1cm: 0,01 g/100ml  
C g/100ml



Concentración proteica	Nro. de divisiones
g/100 ml	-
3,51	35
1,75	35
0,37	35,0
0,43	15,3
0,21	6,9
0,10	7,8
0,04	1,4

#### 5) RESULTADOS EXPERIMENTALES

Como tarea previa se realizaron unas cincuenta experiencias utilizando soluciones de gelatina de concentración 4 g/100 ml disuelta en buffer de fuerza iónica 0,1 y pH 4,7 (isoelectrico), preparado con acetato de sodio-acido acético. Esto tuvo por finalidad tomar destreza en el manejo del osmómetro y desarrollar los detalles del método, no indicados en la bibliografía.

El trabajo fundamental consistió en realizar mediciones sobre suero humano, absolutamente de hemólisis, obtenido por extracción de sangre, coagulación natural y centrifugación, para separar el coágulo y los glóbulos en la forma más completa posible.

Los sueros stock se mantuvieron constantemente en refrigerador para evitar desnaturalizaciones.

Como líquido para las diluciones y líquido exterior en el osmómetro se utilizó solución de cloruro de sodio 9 g/l a fin de realizar todas las mediciones a pH y fuerza iónica aproximadamente fisiológicos.

A los resultados de presión osmótica se les aplicó el método de extrapolación de Adair ya visto, para obtener el peso molecular medio de las proteínas. El dato de extrapolación se redujo a mm Hg y a 0°C calculándose entonces en base a esto el peso molecular medio de las proteínas del suero.

A continuación se dan los resultados de seis series comprendiendo 23 experiencias.

Experiencia Nº 55- Membrana Nº 22- Osmómetro Nº 1

Suero humano de concentración proteica 7,41 g/100 ml

Dilución : 1 vol. suero : 1 vol. ClNa 9g/l ; C=3,70 g/100 ml

tiempo	diferencia niveles	nivel B
hora, min.	H-B cm	cm
00'	1,75	15,45
15'	1,70	16,00
30'	1,75	17,95
40'	1,75	19,45
1h 20'	1,75	23,85
2h 05'	1,75	24,65
2h 15'	1,75	24,70
2h 25'	1,75	24,75
2h 35'	1,75	24,55
2h 45'	1,75	24,65

Nota: En ésta y en las experiencias sucesivas el primer dato de la columna corresponde a llave D abierta y todos los demás a llave D cerrada.-

$$24,65 \text{ cm} - 15,45 \text{ cm} = 9,20 \text{ cm}$$

$$9,20 \text{ cm} \times 0,86 \text{ cm} = 7,90 \text{ cm}$$

$$7,90 \text{ cm} + 1,75 \text{ cm} = 9,65 \text{ cm H}_2\text{O}$$

Experiencia N° 56 - Membrana N° 22 - Osmómetro N° 1

Suero de Exp.55

Dilución: 1 vol. suero: 2 vol. agua 9 g/l; C = 2,46 g/100 ml

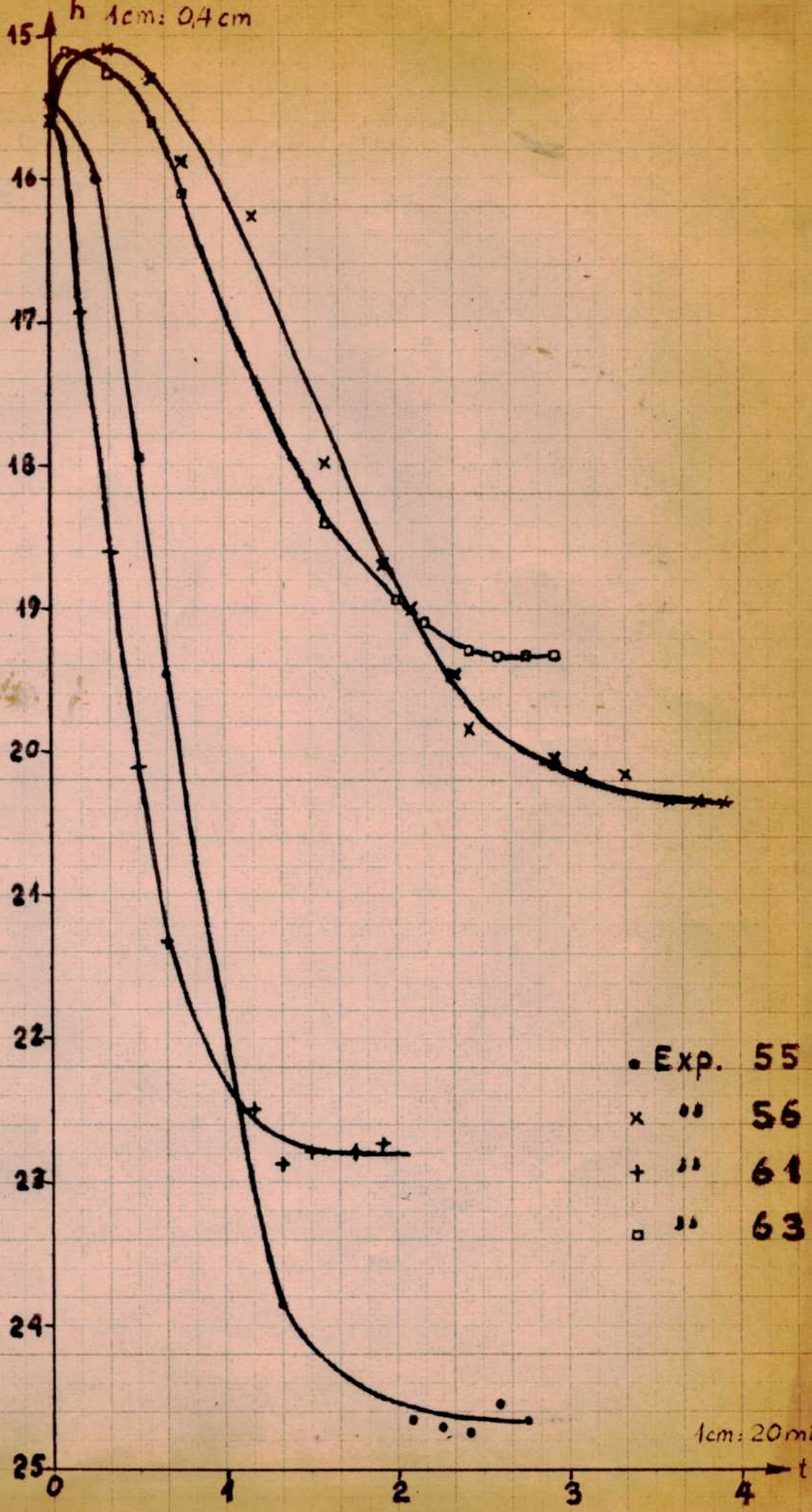
Tiempo hora, min.	diferencia niveles H-E cm	nivel B cm
00'	1,60	15,60
20'	1,60	15,05
35'	1,65	15,30
45'	1,65	15,90
1h 10'	1,65	16,25
1h 35'	1,65	18,00
1h 55'	1,65	18,70
2h 05'	1,65	19,00
2h 20'	1,65	19,45
2h 25'	1,65	19,85
2h 55'	1,65	20,05
3h 05'	1,65	20,15
3h 20'	1,70	20,15
3h 35'	1,70	20,35
3h 45'	1,65	20,35
3h 55'	1,65	20,35

$$20,35 \text{ cm} - 15,60 \text{ cm} = 4,75 \text{ cm}$$

$$4,75 \text{ cm} \times 0,86 = 4,10 \text{ cm}$$

$$4,10 \text{ cm} + 1,65 \text{ cm} = 5,75 \text{ cm}$$

$h = 1\text{cm} = 0,4\text{cm}$





Exp. N° 61 - Membrana N° 22 - Osmómetro N° 1

Suero de exp. N° 55

Dilución 1 vol.: 1,33 vol.  $\text{ClNa}$  9 g/l ;  $\text{C} = 3,17$  g/100 ml

Tiempo hora, min.	diferencia niveles F-E cm	nivel B cm
00'	1,55	15,45
10'	1,55	16,95
20'	1,55	18,60
30'	1,55	20,10
40'	1,55	21,35
1h 10'	1,55	22,50
1h 20'	1,55	22,85
1h 30'	1,55	22,80
1h 45'	1,55	22,80
1h 55'	1,55	22,75

$$22,80 - 15,45 \text{ cm} = 7,35 \text{ cm}$$

$$7,35 \text{ cm} \times 0,86 = 6,31 \text{ cm}$$

$$6,31 \text{ cm} + 1,55 \text{ cm} = 7,86 \text{ cm}$$

Exp. N° 63 - Membrana N° 22 - Osmómetro 1

Suero de Exp. N° 55

Dilución: 1 vol. suero : 2,5 vol.  $\text{ClNa}$  9 g/l ;  $\text{C} = 2,12$  g/100 ml

Tiempo hora, min.	diferencia niveles H-E cm	nivel B cm
00'	1,55	15,45
10'	1,55	15,05
20'	1,55	15,15

	35'	1,55	15,60
	45'	1,55	16,10
1h	35'	1,55	16,40
2h	00'	1,55	16,95
2h	10'	1,55	17,10
2h	25'	1,55	19,30
2h	35'	1,55	19,35
2h	45'	1,55	19,35
2h	55'	1,55	19,35

$$19,35 \text{ cm} - 15,15 \text{ cm} = 3,90 \text{ cm}$$

$$3,90 \text{ cm} \times 0,86 = 3,35 \text{ cm}$$

$$3,35 \text{ cm} + 1,55 \text{ cm} = 4,90 \text{ cm H}_2\text{O}$$

Extrapolación: Membrana N° 22 - Suero de concentración 7,41 g/100 ml

Exo.	C	P	1/π
-	g/100 ml	cm H <sub>2</sub> O	g/p
63	2,12	4,90	0,441
56	2,46	5,75	0,428
61	3,17	7,36	0,403
55	3,70	9,65	0,382

$$1/\pi_0 = 0,515 \frac{\text{g/100ml}}{\text{cmH}_2\text{O}}$$

$$\pi_0 = \frac{1}{0,515} \frac{\text{cmH}_2\text{O}}{\text{g/100ml}} = \frac{1,94 \times 10}{13,5} \frac{\text{mmHg}}{\text{g/100 ml}} = 1,43 \frac{\text{mmHg}}{\text{g/100 ml}}$$

Reducción a 0°C:

$$\pi_0^c = \frac{1,43 \times 273}{298} = 1,31 \frac{\text{mmHg}}{\text{g/100ml}}$$

$$M = \frac{170.370}{1,31} = 132.000$$

$\frac{1}{\pi}$   
1 cm: 0,05

0,5

0,4

0,3

0,2

0,1

0

- Membrana 22. Suero  $c = 7,41 \text{ g}/100 \text{ ml}$
- x " 15 "  $c = 7,41 \text{ g}/100 \text{ ml}$
- + " 6 "  $c = 7,41 \text{ g}/100 \text{ ml}$

1 cm: 0,5 g/100 ml

c g/100 ml

0 1 2 3 4 5

Exp. N° 72 - Membrana N° 15 - Osmómetro 1

Dilución: 1 vol. suero : 1 vol. ClNa 9 g/l;  $C = 3,70$  g/100 ml

Suero de exp. N° 75

Tiempo hora, min.	diferencia niveles H-E cm	nivel B cm
00'	1,65	15,80
10'	1,65	18,85
20'	1,65	21,10
30'	1,65	22,45
40'	1,65	23,20
1h 15'	1,65	23,90
1h 25'	1,65	24,15
1h 35'	1,70	24,15
1h 45'	1,70	24,15

$$24,15 \text{ cm} - 15,80 \text{ cm} = 8,35 \text{ cm}$$

$$8,35 \text{ cm} \times 0,86 = 7,40 \text{ cm}$$

$$7,40 \text{ cm} + 1,70 \text{ cm} = 9,10 \text{ cm H}_2\text{O}$$

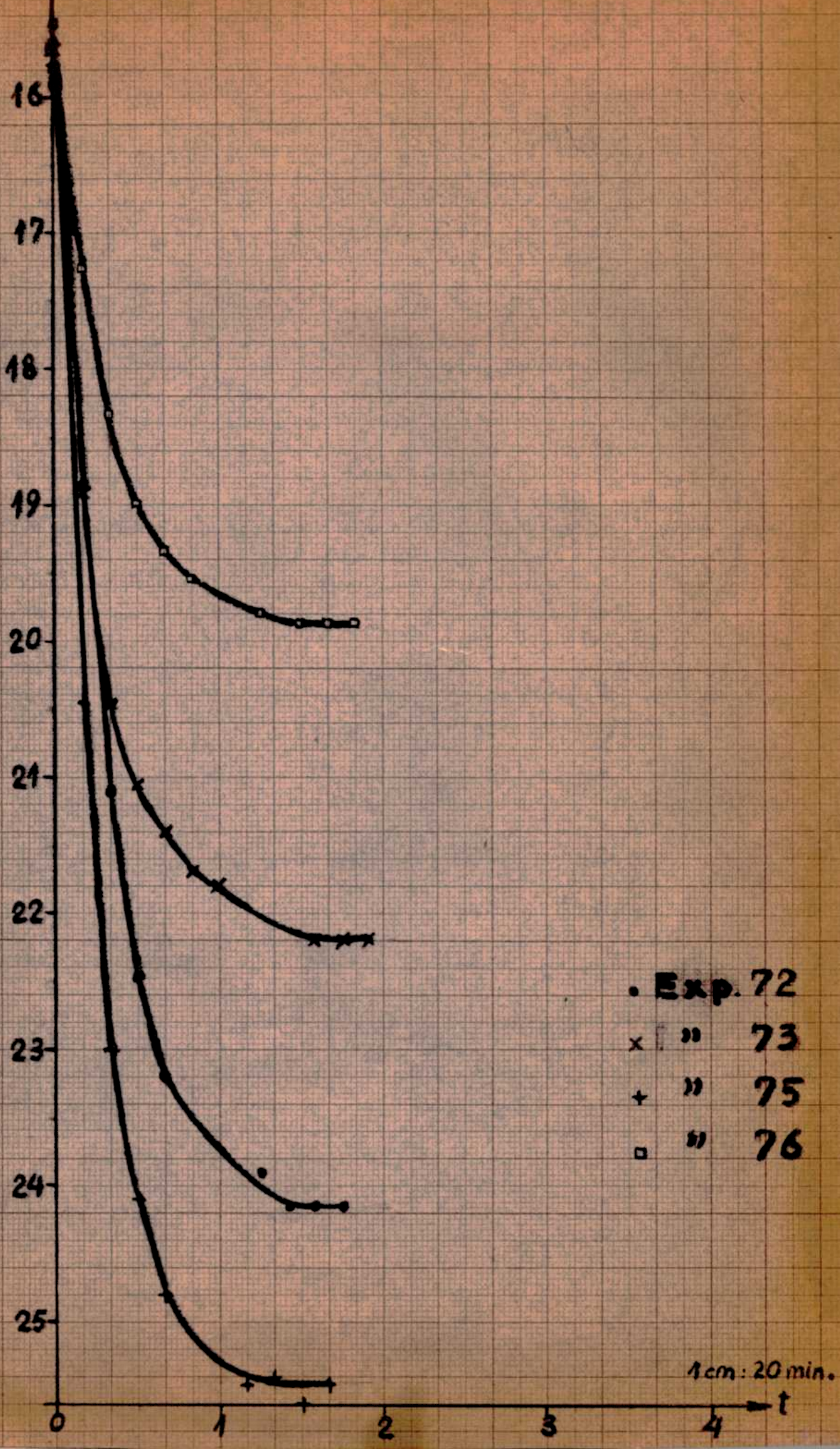
Exp. N° 73 - Membrana N° 15 - Osmómetro N° 1

Suero Exp. N° 55

Dilución: 1 vol. suero: 1,37 vol. ClNa 9 g/l;  $C = 3,17$  g/100 ml

Tiempo hora, min	diferencia niveles H-E cm	nivel B cm
00'	1,30	15,65
10'	1,30	18,90
20'	1,30	20,45
30'	1,85	21,05
40'	1,85	21,40
50'	1,35	21,70

15<sup>h</sup>  
1 cm: 0,4 cm



• Exp. 72  
x " 73  
+ " 75  
□ " 76

1 cm: 20 min.

t

1h	00'	1,85	21,80
1h	35'	1,85	22,00
1h	45'	1,85	22,00
1h	55'	1,85	22,00

$$22,00 \text{ cm} - 15,65 \text{ cm} = 6,35 \text{ cm}$$

$$6,35 \text{ cm} \times 0,86 = 5,46 \text{ cm}$$

$$5,46 \text{ cm} + 1,85 \text{ cm} = 7,31 \text{ cm H}_2\text{O}$$

Exp. N° 75 - Membrana N° 15 - Osmómetro N° 2

Suero Exp. N° 55

Dilución: 1 vol. suero : 0,75 vol. cNa 9 g/l ; c=4,22 g/100 ml

Tiempo	diferencia niveles	nivel E
hora, min.	H-E cm	cm
00'	1,90	15,75
10'	1,90	24,45
20'	1,90	27,00
30'	1,90	24,10
40'	1,90	24,30
1h 10'	1,90	25,45
1h 20'	1,90	25,40
1h 30'	1,90	25,50
1h 40'	1,90	25,45

$$24,45 \text{ cm} - 15,70 \text{ cm} = 9,70 \text{ cm}$$

$$9,70 \text{ cm} \times 0,86 = 9,05 \text{ cm}$$

$$9,05 \text{ cm} + 1,90 = 10,95 \text{ cm H}_2\text{O}$$

Exp. N° 76 - Membrana N° 15 - Osmómetro N° 2

Suero exp. N° 55

Dilución : 1 vol. suero : 2 vol. cNa 9 g/l ; c=2,46 g/100 ml

Tiempo hora, min.	Diferencia Niveles H-E cm	Nivel B cm
00'	1,60	15,45
10'	1,65	17,25
20'	1,65	18,35
30'	1,65	19,00
40'	1,65	19,35
50'	1,65	19,55
1h 15'	1,65	19,80
1h 30'	1,65	19,85
1h 40'	1,65	19,85
50'	1,65	19,85

$$19,85 \text{ cm} - 15,45 \text{ cm} = 4,40 \text{ cm}$$

$$4,40 \text{ cm} \times 0,96 = 3,90 \text{ cm}$$

$$3,90 \text{ cm} - 1,65 = 2,25 \text{ H}_2\text{O cm}$$

Extr. solución Membrana N° 15 - Suero de Concentración 7,41 g/100 ml

Exp.	c g/100 ml	p cm H <sub>2</sub> O	$\frac{1}{\pi}$ c/p
76	2,46	5,55	0,443
73	3,17	7,31	0,433
72	3,70	9,10	0,407
75	4,22	10,95	0,782

$$\frac{1}{\pi_0} = 0,541 \frac{\text{g/100 ml}}{\text{cm H}_2\text{O}} \text{ correspondiente}$$

$$\pi_0 = 1,26 \frac{\text{cm H}_2\text{O}}{\text{g/100 ml}}$$

$$M = \frac{170.330}{1,26} = 137.000$$

Exp. N° 79 - Membrana N° 6 - Camómetro N° 2

Suero Exp. N° 55

Disolución : 1 vol. suero: 1 vol. ClNa 9 g/l;  $\sigma = 3,70$  g/100 ml

Tiempo hora, min.	Diferencia Niveles H-E cm	Nivel E cm
00'	1,85	15,60
10'	1,85	18,25
20'	1,85	20,40
30'	1,85	21,80
40'	1,85	22,75
50'	1,85	23,35
1h 20'	1,85	24,15
1h 30'	1,85	24,35
1h 40'	1,85	24,30
1h 50'	1,85	24,30
2h 00'	1,85	24,30

$$24,30 \text{ cm} - 15,60 = 8,70 \text{ cm}$$

$$3,70 \text{ cm} \times 0,86 = 7,50 \text{ cm}$$

$$7,50 \text{ cm} + 1,85 \text{ cm} = 9,35 \text{ cm H}_2\text{O}$$

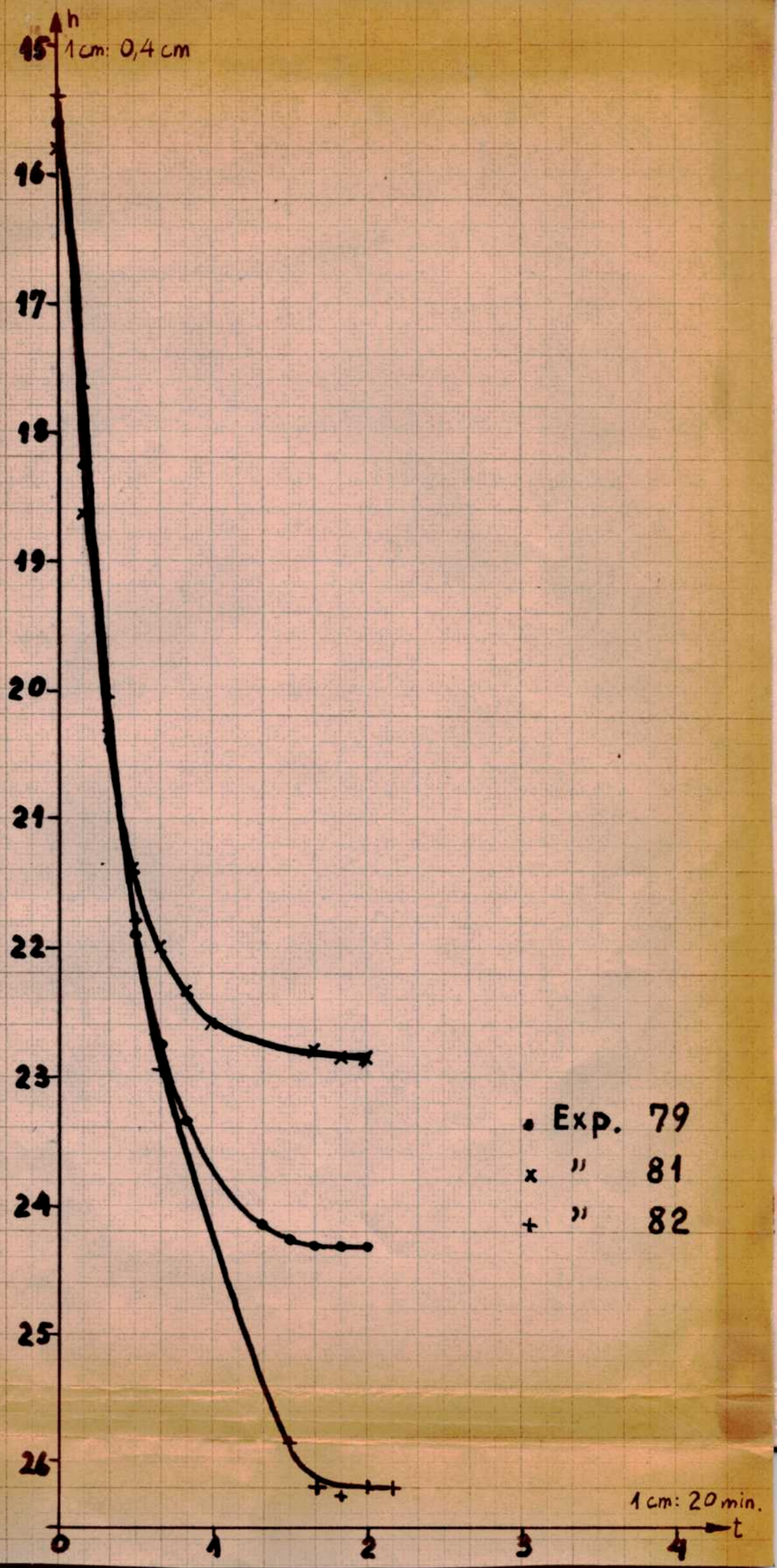
Exp. N° 81 - Membrana N° 6 - Camómetro N° 2

Suero Exp. N° 55

Disolución : 1 vol. suero: 1,33 vol. ClNa 9 g/l ;  $\sigma = 3,17$  g/100 ml

Tiempo hora, min.	Diferencia Niveles H-E cm	Nivel L cm
00'	1,80	15,00
10'	1,85	18,15
20'	1,85	20,30





45  
 16  
 17  
 18  
 19  
 20  
 21  
 22  
 23  
 24  
 25  
 26

• Exp. 79  
 x " 81  
 + " 82

1 cm: 20 min.

30'	1,85	21,40
40'	1,75	22,60
50'	1,65	22,75
1h 00'	1,55	21,60
1h 40'	1,85	22,20
1h 50'	1,85	22,85
2h 00'	1,75	22,65

$$22,85 \text{ cm} - 17,80 \text{ cm} = 7,05$$

$$7,05 \text{ cm} \times 0,6 = 6,06$$

$$6,06 + 1,05 \text{ cm} = 7,11 \text{ cm} \approx 700$$

• 2° 30' - 30' - calculato 12° 2'

• 2° 55'

h: 1 val. muro: 0,75 val. 31 e 0,5/1 ;  $\beta = 4,22$  / 00 m1

Time o ,min.	Difer N-E cm	livello D cm
00'	1,85	11,40
10'	1,75	17,65
20'	1,65	20,05
30'	1,55	21,60
40'	1,45	21,75
50'	1,35	21,85
1h 40'	1,85	26,20
1h 50'	1,75	26,85
2h 00'	1,65	26,20
2h 10'	1,55	26,40

$$26,20 - 15,40 \text{ cm} = 11,0 \text{ cm}$$

$$11,00 \text{ cm} \times 0,6 = 6,60$$

$$6,60 \text{ cm} + 1,17 \text{ cm} = 7,77 \text{ cm} \approx 700$$

Exta dilución Membrana N° 6 - Suero con concentración 7,19  $\mu$ /100 ml

Exo.	J		1/ $\pi$
-		$\mu$ /100 ml cm H <sub>2</sub> O	3/p
31	3,17	7,91	0,462
79	3,70	,79	0,336
82	4,22	11,15	0,377

$$1/\pi = 0,470 \frac{\mu/100 \text{ ml}}{\text{cm H}_2\text{O}} \text{ correspondientes a}$$

$$\pi_0^2 = 1,44 \frac{\text{cm H}_2\text{O}}{\mu/100 \text{ ml}}$$

$$M = \frac{170.330}{1,44} = 120.000$$

Ex . ° 24- Membrana N° 28 - Osmómetro N° 1

suero de concentración proteica 6,76  $\mu$ /100 ml

Dilución: 1 vol. suero; 1,75 vol. agua  $\mu$ /l ; J = 2,91  $\mu$ /100 ml

tiempo	Diferencia: niveles	Nivel B
hor., min.	H-E cm	cm
00'	1,35	15,75
10'	1,35	17,00
20'	1,35	18,10
30'	1,35	19,15
40'	1,35	19,75
50'	1,35	20,35
1h 00'	1,35	20,75
1h 10'	1,75	20,95
1h 20'	1,35	21,10
1h 55'	1,35	21,35
2 10'	1,75	21,35
2h 20'	1,75	21,35

$$21,35 \text{ cm} - 15,75 \text{ cm} = 5,30 \text{ cm}$$

$$5,30 \text{ cm} \times 0,96 = 4,98 \text{ cm}$$

$$4,38 \text{ cm} + 1,37 \text{ cm} = 6,36 \text{ cm H}_2\text{O}$$

Exp. N° 95 - Membrana N° 28 - Osmómetro N° 2

Suero de Exp. N° 94

Dilución: 1 vol. suero: 0,75 vol. ClNa 9 g/l ;  $C = 3,33 \text{ g}/100 \text{ ml}$

Tiempo hora, min.	Diferencia Niveles H-E cm	Nivel E cm
00'	1,55	15,55
10'	1,55	21,05
25'	1,60	27,55
35'	1,60	24,45
45'	1,60	21,75
1h 20'	1,60	24,35
1h 45'	1,60	24,75

$$24,75 \text{ cm} - 15,55 \text{ cm} = 9,20 \text{ cm}$$

$$9,20 \text{ cm} \times 0,86 = 7,90$$

$$7,90 \text{ cm} + 1,60 \text{ cm} = 9,50 \text{ H}_2\text{O}$$

Exp. N° 96 - Membrana N° 28 - Osmómetro N° 1

Suero Exp. n° 14

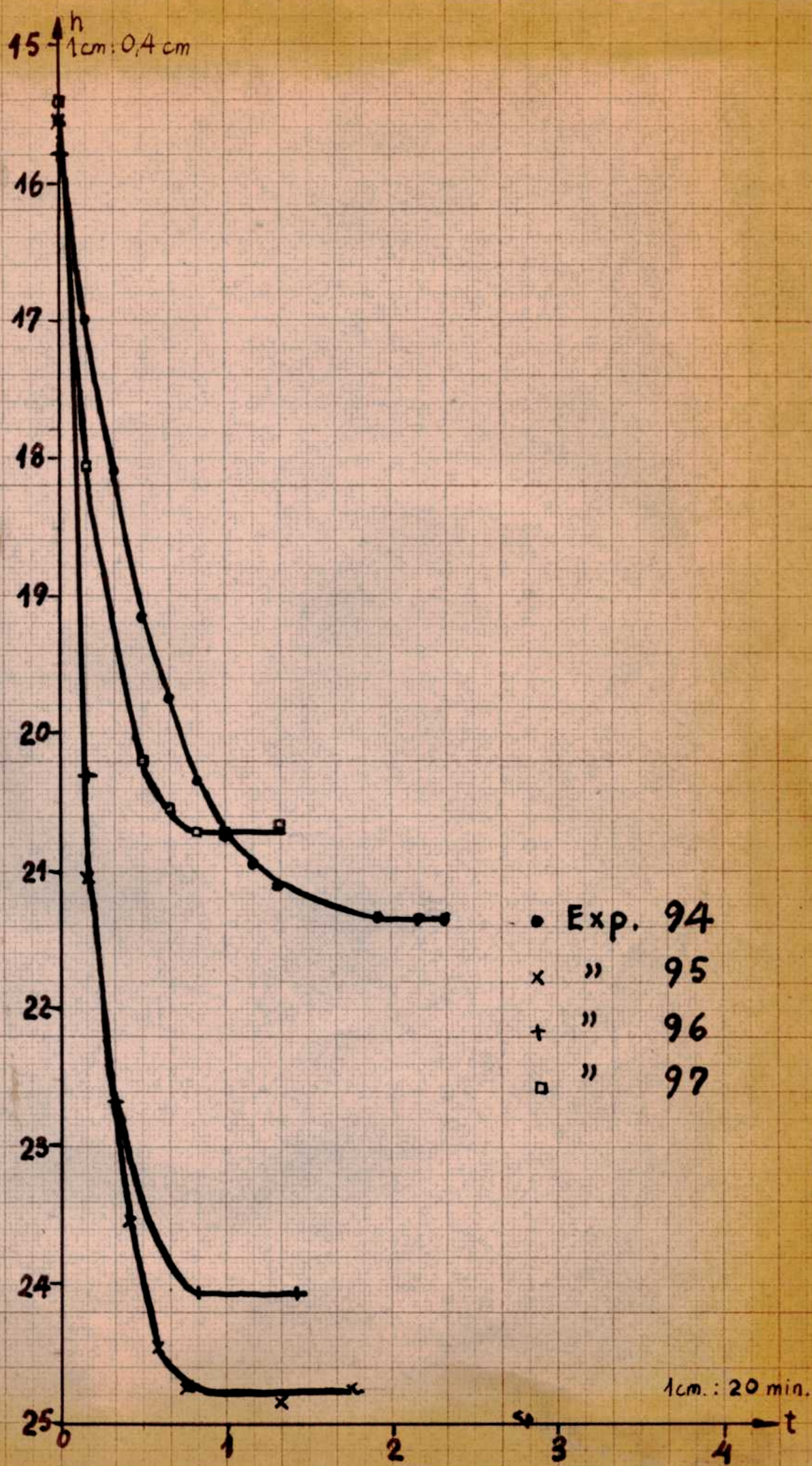
Dilución: 1 vol. suero: 1 vol ClNa 9 g/l ;  $C = 3,39 \text{ g}/100 \text{ ml}$

Tiempo hora, min.	Diferencia Niveles H-E cm	Nivel E cm
00'	1,65	15,80
10'	1,70	20,50
20'	1,70	22,15
50'	1,70	21,05
1h 25'	1,70	24,05

$$24,05 \text{ cm} - 15,80 = 8,25 \text{ cm}$$

$$8,25 \text{ cm} \times 0,86 = 7,10 \text{ cm}$$

$$7,10 \text{ cm} + 1,70 \text{ cm} = 8,80 \text{ cm H}_2\text{O}$$



... 37 - ... 28 - Calómetro nº 1

Exp. nº 34

...: 1 vol. ...: 1,0 vol. ... 3 .../1; ...=2,42 .../100 ml

Tiempo hora, min.	Diferencia H-E cm	Nivel A	Nivel B
00'	1,25		15,40
10'	1,25		16,05
20'	1,25		16,20
30'	1,25		16,57
40'	1,25		16,70
1h 00'	1,25		16,70
1h 20'	1,25		16,65

$$16,70 \text{ cm} - 15,40 \text{ cm} = 1,30 \text{ cm}$$

$$1,30 \text{ cm} \times 0,36 = 0,468 \text{ cm}$$

$$0,468 \text{ cm} + 1,25 \text{ cm} = 1,718 \text{ cm} \quad \text{H}_2\text{O}$$

Extrapolación - ... nº 28 - ... concentración 6,76 .../100 ml

Exp.	3	2	$1/\pi$
-	.../100 ml	cm H <sub>2</sub> O	0/2
37	2,42	5,31	0,12
34	2,91	6,37	0,16
36	2,79	8,30	0,39
35	2,30	2,70	0,11

$$1/\pi_0 = 0,53 \frac{.../100 \text{ ml}}{\text{cm H}_2\text{O}} \text{ correspondiente}$$

$$\pi_0^{02} = 1,29 \frac{\text{cm H}_2\text{O}}{.../100 \text{ ml}}$$

$$M = \frac{170.330}{1,29} = 132.000$$

Exp. N° 105 - Membrana N° 28 - Osmómetro N° 1

Suero de Concentración proteica 7,28 g/ml

Dilución : 1 vol. Suero: 1 vol. ClNa 9 g/l ;  $\sigma = 3,64$  g/100 ml

Tiempo hora, min.	Diferencia Niveles H-E cm	Nivel B cm
00'	1,75	15,35
15'	1,75	19,50
25'	1,75	20,60
45'	1,75	21,80
1h 05'	1,75	22,20
1h 20'	1,75	22,20
1h 30''	1,75	22,20

$$22,20 \text{ cm} - 15,35 \text{ cm} = 6,85 \text{ cm}$$

$$6,85 \text{ cm} \times 0,86 = 5,90 \text{ cm}$$

$$5,90 \text{ cm} + 1,75 = 7,65 \text{ cm H}_2\text{O}$$

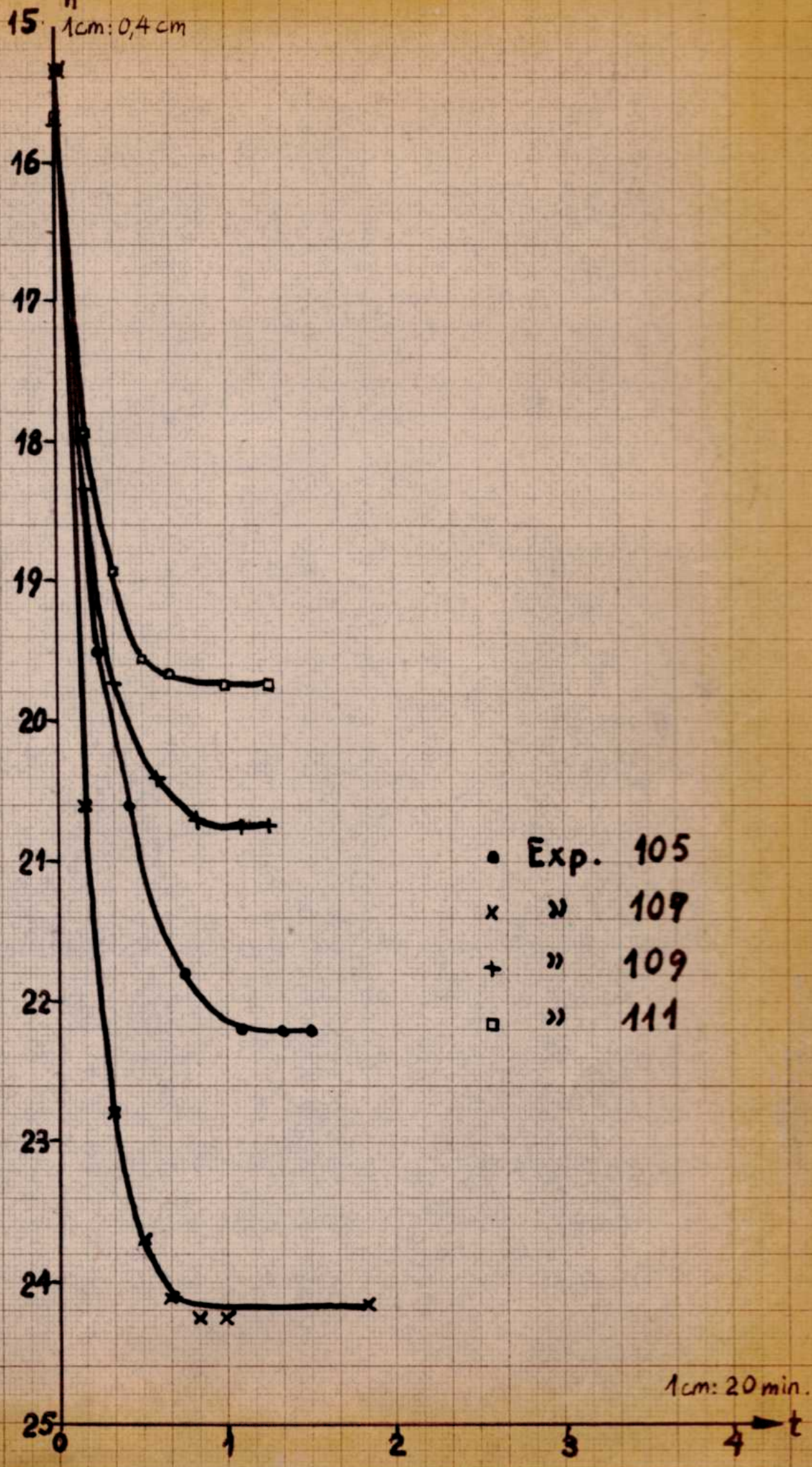
Exp. N° 107 - Membrana N° 28 - Osmómetro N° 1

Suero Exp. N° 105

Dilución: 1 vol. Suero: 0,75 vol. ClNa 9 g/l ;  $\sigma = 4,14$  g/100 ml

Tiempo hora, min.	Diferencia Niveles H-E cm	Nivel B cm
00'	1,65	15,35
10'	1,70	20,60
20'	1,70	22,30
30'	1,70	23,70
40'	1,70	24,10

h  
1cm: 0,4 cm





	50'	1,70	24,25
1h	00'	1,70	24,25
1h	50'	1,70	24,15

$$24,15 \text{ cm} - 15,35 \text{ cm} = 8,80 \text{ cm}$$

$$8,80 \text{ cm} \times 0,86 = 7,55 \text{ cm}$$

$$7,55 \text{ cm} + 1,70 \text{ cm} = 9,25 \text{ cm H}_2\text{O}$$

Exp. 109 - Membrana N° 28 - Osmómetro N° 1

Suero Exp. 105

Dilución: 1 vol. Suero: 1,33 vol. ClNa g/l ; C 3,11 g/100 ml

Tiempo hora, min.	Diferencia Niveles H-E cm	Nivel B cm
00'	1,45	15,75
10'	1,45	18,35
20'	1,50	19,75
35'	1,50	20,40
50'	1,50	20,70
1h 05'	1,50	20,75
1h 15'	1,50	20,75

$$20,75 \text{ cm} - 15,75 \text{ cm} = 5,75 \text{ cm}$$

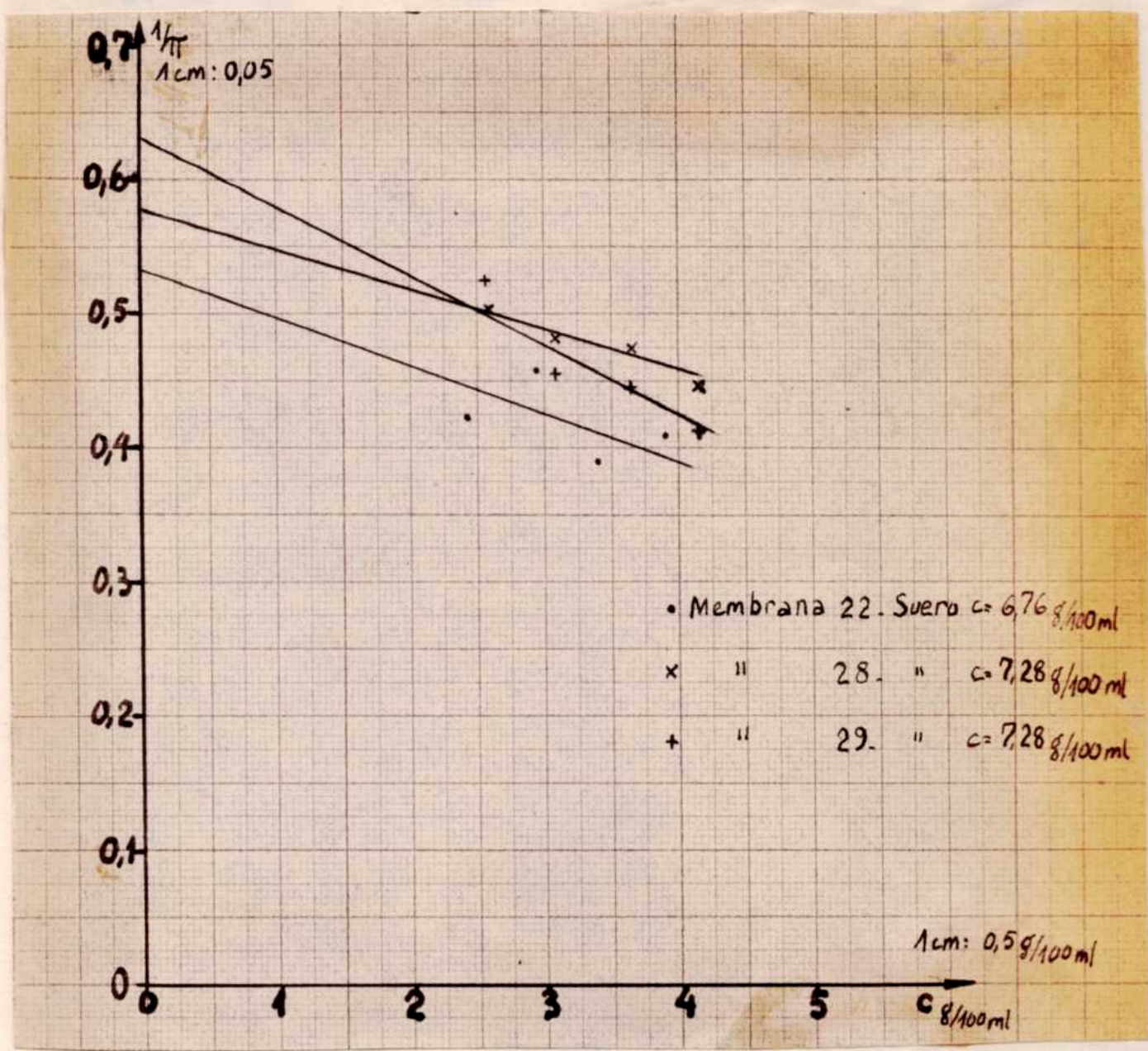
$$5,75 \text{ cm} \times 0,86 = 4,95 \text{ cm}$$

$$4,95 \text{ cm} + 1,50 \text{ cm} = 6,45 \text{ cm H}_2\text{O}$$

Exp. N° 111 - Membrana N° 28 - Osmómetro N° 1

Suero Exp. N° 105

Dilución: 1 vol. Suero: 1,8 vol. ClNa 9 g/l ; C = 2,60 g/100 ml



Exp. n° 106 - Membrana n° 22 - Suero n° 106  
 Suero Exp. n° 106  
 Diluente: 100% suero: 1-1000

Tiempo hora, min.	Diferencia Niveles H-E cm	Nivel E cm
00'	1,70	15,70
10'	1,70	17,95
20'	1,70	18,95
30'	1,70	19,55
40'	1,70	19,65
1h 00'	1,70	19,75
1h 15'	1,70	19,75

$$19,75 \text{ cm} - 15,70 \text{ cm} = 4,05 \text{ cm}$$

$$4,05 \text{ cm} \times 0,86 = 3,48 \text{ cm}$$

$$3,48 \text{ cm} + 1,70 \text{ cm} = 5,18 \text{ cm H}_2\text{O}$$

Extrapolación membrana n° 28 - Suero Concentración proteica 7,28 g/100 ml

Exp.	c	p	$\frac{1}{\pi}$
-	g/100 ml	cm H <sub>2</sub> O	c/p
107	4,14	9,25	0,447
105	3,64	7,65	0,475
109	3,11	6,45	0,482
111	2,60	5,18	0,502

$$1/\pi_0 = 0,575 \frac{\text{g/100 ml}}{\text{cmH}_2\text{O}} \quad \text{correspondiente a}$$

$$\pi_0 = 1,19 \frac{\text{mmHg}}{\text{g/100 ml}}$$

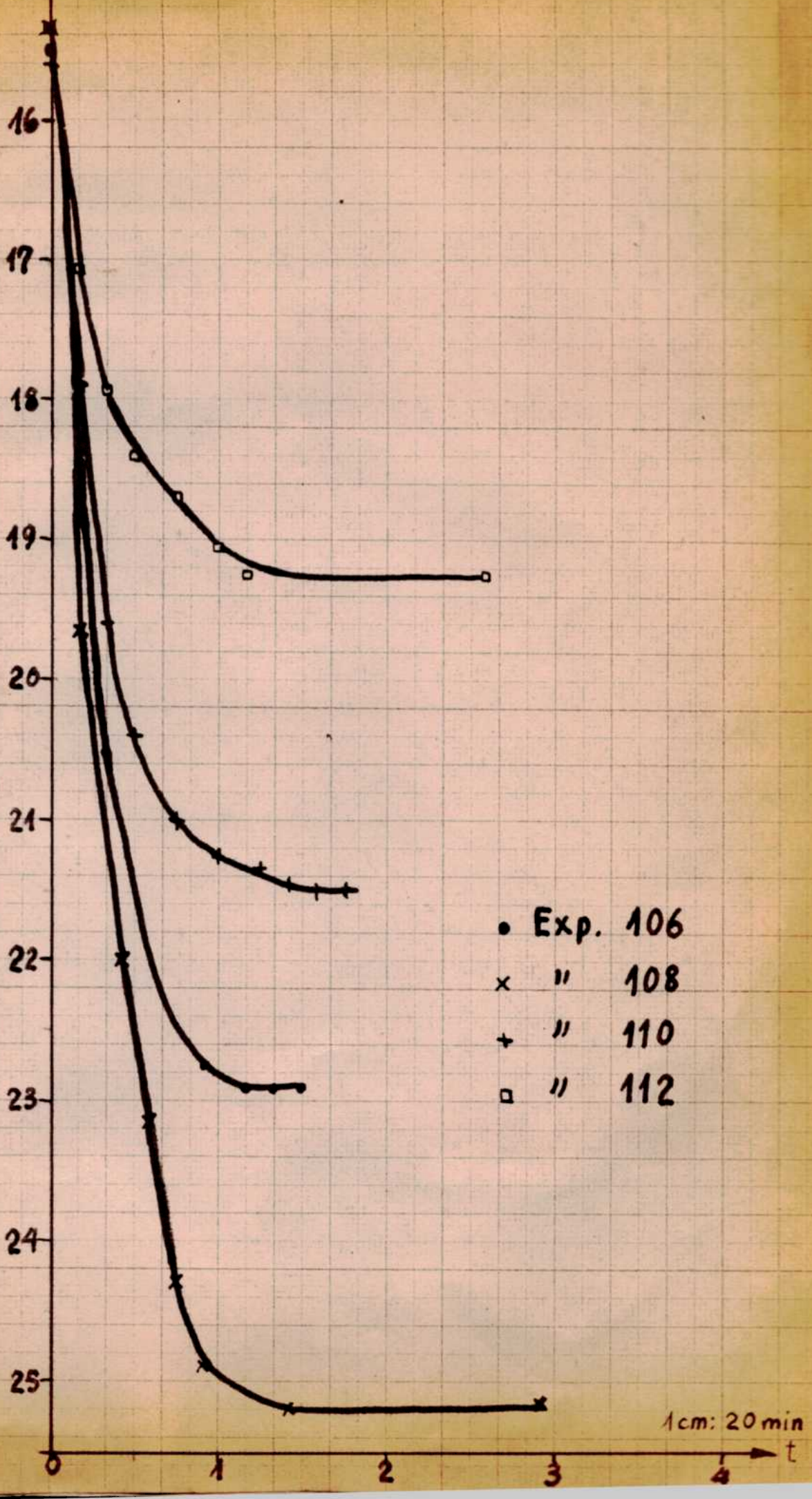
$$M = \frac{170.330}{1,19} = 145.000$$

Exp. N° 106 - Membrana N° 29 - Osmómetro N° 2

Suero Exp. N° 105

Dilución: 1 vol. suero: 1 vol. ClNa 9 g/l ; c = 3.64 g/100 ml

1cm: 0,4 cm



• Exp. 106  
x " 108  
+ " 110  
□ " 112

1cm: 20 min

Exp.  
Sicr  
Bil

Tiempo hora, min.	Diferencia Niveles H-E cm	Nivel E cm
00'	1,65	15,50
10'	1,70	16,45
20'	1,70	20,50
55'	1,70	22,75
1h 10'	1,70	22,90
1h 20'	1,70	22,90
1h 30'	1,70	22,90

$$22,90 \text{ cm} - 15,50 \text{ cm} = 7,40 \text{ cm}$$

$$7,40 \text{ cm} \times 0,86 = 6,45 \text{ cm}$$

$$6,45 \text{ cm} + 1,70 \text{ cm} = 8,15 \text{ cm H}_2\text{O}$$

Exp. N° 108 - Membrana N° 29 - Osmómetro N° 2

Suero Experiencia N° 105

Dilución: 1 vol. Suero: 0,75 vol. gNa g/l ;  $\sigma = 4,14$  g/100 ml

Tiempo hora, min.	Diferencia Niveles H-E cm	Nivel E cm
00'	1,60	15,35
10'	1,60	19,65
25'	1,60	22,00
35'	1,65	23,15
45'	1,65	24,30
55'	1,65	24,90
1h 45'	1,65	25,20
2h 55'	1,65	25,15

$$25,15 \text{ cm} - 15,35 \text{ cm} = 9,70 \text{ cm}$$

$$9,70 \text{ cm} \times 0,86 = 8,35 \text{ cm}$$

$$8,35 \text{ cm} + 1,65 \text{ cm} = 10,00 \text{ cm H}_2\text{O}$$

Exp. N° 110 - Membrana N° 29 - Osmómetro N° 2

Suero Exp. N° 105

Dilución: 1 vol. suero: 1,33 vo. ClNa 9 g/l ; O 3,11 g/100 ml

Tiempo hora, min.	Diferencia Niveles H-E cm	Nivel E cm
00'	1,70	15,60
10'	1,70	17,30
20'	1,70	19,00
30'	1,70	20,70
45'	1,70	21,40
1h 00'	1,75	21,25
1h 15'	1,75	21,35
1h 25'	1,75	21,45
1h 35'	1,75	21,50
1h 45'	1,75	21,50

$$21,50 \text{ cm} - 15,60 \text{ cm} = 5,90 \text{ cm}$$

$$5,90 \text{ cm} \times 0,36 = 5,07 \text{ cm}$$

$$5,07 \text{ cm} + 1,75 \text{ cm} = 6,82 \text{ cm H}_2\text{O}$$

Exp. N° 112 - Membrana N° 29 - Osmómetro N° 2

Suero Experimento N° 105

Dilución: 1 vol. Suero: 1,8 vol. ClNa 9 g/l ; O 2,60 g/100 ml

Tiempo hora, min.	Diferencia Niveles H-E cm	Nivel E cm
00'	1,55	15,35
10'	1,55	17,05
20'	1,60	17,95

	30'	1,60	18,40
	45'	1,60	18,70
1h	00'	1,60	18,05
1h	10'	1,60	18,25
2h	35'	1,60	18,25

$$18,25 \text{ cm} - 15,35 \text{ cm} = 3,90 \text{ cm}$$

$$3,90 \text{ cm} \times 0,86 = 3,35 \text{ cm}$$

$$3,35 \text{ cm} + 1,60 \text{ cm} = 4,95 \text{ cm H}_2\text{O}$$

Extrapolación - Membrana 29 - Suero concentración proteica 7,28 g/100 ml

Exp.	c	p	$1/\pi$
-	g/100 ml	cm H <sub>2</sub> O	c/p
108	4,14	10,00	0,414
106	3,64	8,15	0,447
110	3,11	6,82	0,456
112	2,60	4,95	0,525

$$1/\pi_0 = 0,630 \frac{\text{g/100 ml}}{\text{cm H}_2\text{O}} \text{ correspondiente a: } \pi_0^{0.2} = 1,10 \frac{\text{mmHg}}{\text{g/100 ml}}$$

$$M = \frac{170.330}{1,10} = 157.000$$

Obtención del resultado final:

$X_i$	$d_i$	$X_i - X$	$d_i^2$
132.000	-	5.000	$25 \times 10^6$
137.000	-	0	0
120.000	-	12.000	$144 \times 10^6$
174.000	-	2.000	$4 \times 10^6$
145.000	-	8.000	$64 \times 10^6$
157.000	-	20.000	$400 \times 10^6$

Valor medio: 137.000

Error cuadrático de la media  $s_{\bar{x}} = \frac{637 \times 10^6}{6 \times 5} = 4.500$

Error más probable de la media:

$$r_{\bar{x}} = 0,6745 \times 4.500 = 3,040$$

Valor final del peso molecular medio: 137.000  $\pm$  3.000

## 6) DISCUSION

En cuanto a la preparación de membranas, debe hacerse presente que la obtención de membranas de buena calidad es dificultosa, habiendo requerido un entrenamiento intensivo para lograrlas sin orificios que produjeran pérdidas groseras, y con la debida rigidez mecánica y permeabilidad. Una vez alcanzado entrenamiento en la tarea, no parece una dificultad importante, siempre que se posea un colodio de propiedades adecuadas, tal como el E.D.H. debe contemplarse como rutinaria y así lo indicaba también Scatchard, la pérdida de una buena cantidad de ellas por no ser satisfactorias.

El método de Bull, con la técnica desarrollada en este trabajo, ha demostrado permitir equilibraciones, a veces en menos de una hora, apareciendo como apropiado para rápidas determinaciones de presión osmótica de sueros. El trabajo a 25°C aparece como una ventaja notable, en cuanto a sencillez.

Los resultados del peso molecular obtenido, para diversas series de experiencias, presentan una concordancia entresí que puede considerarse satisfactoria, teniendo en cuenta los pesos moleculares grandes que corresponden a las proteínas.

Con respecto a los trabajos de Papjak y otros, los valores obtenidos





BIBLIOGRAPHIA

- 1) Randall J.; Butler J.: Progress in Biophysics and Biophysical Chemistry.
- 2) Scatchard G.; Batchelder A.; Brown A.: J.Clin.Invest. 23, 453 (1944).
- 3) Bull H.: J.Biol. Chem.: 137, 143 (1941).
- 4) Bull H.: J. Am. Chem. Soc.: 68, 742 (1946).
- 5) Schmidt J.: The Chemistry of Aminoacids and Proteins.
- 6) Adair G.; Robinson L.: Biochem.J.: 25, 1364 (1930).
- 7) Adair G.: Proc. Roy. Soc. A 120, 573 (1928).
- 8) Adair G.: " " " " 126, 16 (1930).
- 9) Adair G.: " " " " 103, 627 (1925).
- 10) Mark H.; Greenberg D.: J. Biol. Chem.: 27, 197 (1930).
- 11) Scatchard, G.; Batchelder A.; Brown A.: J. Am. Chem. Soc.: 68, 2320 (1946).
- 12) Brown W.: Biochem. J. 2, 591 (1915).
- 13) Zdzay J.: J. Phys. Chem.: 42, 657 (1938).
- 14) Popjak G.; Carty E.: Biochem. J. : 40, 789 (1946).
- 15) Weichselbaum : Am. J. Path.: 16, 40 (1946).
- 16) Adair G.: Proc. Roy. Soc. A 109, 392 (1925).
- 17) Fuoss R.; Loeb, D.: J. Phys. Chem.: 47, 39 (1943).
- 18) Scatchard G.: J. Am. Chem. Soc.: 68, 2610 (1946).
- 19) Scatchard G.: " " " " : 68, 2715 (1946).
- 20) Cain; Edsall: Proteins Aminoacids and Peptides.
- 21) Mark H. Physical Chemistry of High Polymeric Systems.
- 22) Transactions of Faraday Soc. Symposium. The Properties and Functions of Membranes, Natural and Artificial.
- 23) Osley J.; Scatchard G.; Brown A.: J. Physical and Colloid Chem. 51, 1 (1947).
- 24) Rice H.; Peters J. J. Clin. Invest.: 16, 93 (1937)

