

Tesis de Posgrado

Ultracentrifugación y difusión : contribución al estudio de la tiroglobulina de cerdo, influencia de la concentración

Lajmanovich, Simón

1941

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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Lajmanovich, Simón. (1941). Ultracentrifugación y difusión : contribución al estudio de la tiroglobulina de cerdo, influencia de la concentración. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0260_Lajmanovich.pdf

Cita tipo Chicago:

Lajmanovich, Simón. "Ultracentrifugación y difusión : contribución al estudio de la tiroglobulina de cerdo, influencia de la concentración". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1941.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0260_Lajmanovich.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

LABORATORIO DE INVESTIGACION Y DESARROLLO

**Contribución al estudio de la tiroglobulina de corte.-
Influencia de la concentración.**

Elis: 260.

ELISA

Por el encargo del Instituto de Química:

Stela Lajmanovich.

- 1971 -

Este trabajo ha tenido como objetivo fundamental mi familiarización con algunas de las técnicas físico-químicas actualmente en uso para el estudio de macromoléculas, a través de un problema relativamente simple y parcialmente ya abordado con anterioridad en los laboratorios del profesor The Svedberg en Upsala.-

Ha sido realizado en su integridad en el departamento de Físico-Química de la Universidad de Wisconsin, U.S.A., bajo la dirección del profesor J.W. Williams, como becaria de la Fundación Rockefeller.-

Es para mí un placer el dejar aquí mi agradecimiento al profesor J.W. Williams y al Dr. H.P. Lundgren quienes con sus consejos y ayuda técnica hicieron posible la realización del trabajo.-

Al profesor Dr. Alfredo Serbelli, por quién me fué ofrecida la beca, mi reconocimiento por la confianza depositada y por el honor que me dispensa al acompañarme en la presentación de esta tesis.-

Me complazco asimismo en agradecer a la Fundación Rockefeller y a la Universidad de Wisconsin las facilidades de todo orden que me han brindado.-

Introducción

Como bien dice M.R. Leopieau¹ la determinación de pesos moleculares está ligada en la historia de la química a tres nombres inmortales: Dalton, Avogadro y Rosult, que caracterizan a tres épocas fundamentales.-

La primera comienza con Dalton en 1803 y continúa con Berzelius, Gerhardt, etc. Dalton parte de la vieja hipótesis atómica; para él, la materia está constituida por partículas de extrema pequeñez, diferentes para cada sustancia simple. A estas partículas de propiedades características dotadas de una masa fija, Dalton las llamó átomos.-

Dentro de esta concepción las leyes de Lavoisier, Froust y la de las proporciones múltiples del mismo Dalton, encuentran explicación satisfactoria; además otra ley, la de los equivalentes, resulta evidente; de acuerdo con la teoría atómica "las cantidades características que se equivalen y se reemplazan" son las masas atómicas, y por lo tanto una primera tabla de coeficientes o pesos atómicos relativos pudo establecerse para las diferentes sustancias simples tomando el hidrógeno como base.-

Para criticar este método nada mejor que las propias palabras de Avogadro "...Dalton de acuerdo a suposiciones arbitrarias y que le parecieran completamente naturales acerca del número relativo de moléculas en las combinaciones, ha tratado de establecer las relaciones entre las masas de las moléculas de los cuerpos simples.-"

(1) M.R. Leopieau: Détermination des poids moléculaires; Mémoires de M.N. Avogadro etc.

(2) Serbiamo recuerda que Avogadro llamaba "moléculas elementales" a los átomos, "moléculas constituyentes" a las moléculas de los elementos y "moléculas integrantes" a las moléculas de las combinaciones.- (La nueva elatación actualmente en uso se debe a un químico francés, Gerardin (1833)).-

La incertidumbre desapareció, por lo menos para los gases, cuando Avogadro en 1811 indudablemente influenciado por la sorprendente simplicidad de las leyes de Boyle y Gay-Lussac, enunció su célebre hipótesis: "Volumenes iguales de gases diferentes, a la misma temperatura y bajo la misma presión, contienen el mismo número de moléculas".-

De esta hipótesis conduce directamente a la determinación de pesos moleculares es por demás conocida; digamos tan solo que tomado el de un elemento como unidad arbitraria, la relación de densidades nos da directamente el peso molecular buscado en la escala elegida.-

Las contradicciones a que dió lugar la aplicación del principio sirvió para clarificar y diferenciar definitivamente entre los conceptos de átomos y moléculas.-

De la hipótesis surge también en forma inmediata que "el peso molecular expresado en gramos (molécula gramo) de cualquier gas ocupa en las mismas condiciones de temperatura y presión, el mismo volumen y por supuesto contiene el mismo número de moléculas".- En condiciones "normales" dicho volumen es de 22,414 cm³ y el número de moléculas en cuestión se conoce como número N de Avogadro.-

La tercera época comienza cuando Raoult en 1878 descubre las leyes experimentales de la crioscopia y sienta los fundamentos de un nuevo método de determinación de pesos moleculares de sustancias orgánicas disueltas.-

Finalmente Van't Hoff se encargó de descubrir las relaciones existentes entre el comportamiento de los gases y de las soluciones diluidas;.. dice Van't Hoff... "La presión osmótica de las soluciones se encuentra sujeta a las dos leyes fundamentales que gobiernan la presión en el estado gaseoso:

1ª- Ley de Raoult para las soluciones.- La presión osmótica es proporcional a la concentración si la temperatura permanece constante.-

2ª- Ley de Gay-Lussac para las soluciones.- La presión osmótica es proporcional a la temperatura absoluta si la concentración es invariable.

Y agrega luego una tercera proposición que llama:

3ª- Ley de Avogadro para las soluciones.- "La presión ejercida por los gases a una temperatura determinada, si un mismo número de moléculas ocupa un volumen determinado, es igual a la presión osmótica que ejerce en las mismas circunstancias la gran mayoría de las sustancias disueltas en un líquido cualquiera.- (Gran mayoría de sustancias comprende a todas aquellas que dan descenso crioscópico llamado normal por Raoult.-)".

Van't Hoff mostró como las leyes crioscópicas de Raoult podían ser inmediatamente deducidas de las leyes de los gases teniendo en cuenta las analogías anotadas.-

Resumiendo, los trabajos de Van't Hoff terminan por establecer definitivamente, la existencia en los gases y en las soluciones diluidas de una serie de propiedades dependientes tan solo del número de partículas.- Era lógico pues que la misma teoría, teoría cinética, que daba cuenta de las propiedades de los gases encontrara amplia aplicación en la teoría de las soluciones.-

Ahora bien, las leyes de Raoult y los razonamientos de Van't Hoff son igualmente aplicables a toda clase de moléculas; cabe preguntarse con Perrin si habrá o no un límite de tamaño para el conjunto de átomos que verifican estas propiedades, e más concretamente ¿se podría pensar en determinar el peso relativo de partículas coloidales mediante la aplicación de dichas leyes?.- Esto equivale a considerar al

movimiento browniano de las soluciones como un reflejo ultramicroscópico de la energía cinética molecular, es decir a saber que las partículas suspendidas deben comportarse como moléculas disueltas, ejerciendo en particular presiones osmóticas y difundiendo a través de los líquidos.-

Einstein teóricamente y Perrin, Svedberg, etc. experimentalmente le dan bases definitivas al concepto de la aplicabilidad de las leyes de las gases a las soluciones coloidales.-

Sin embargo la determinación de pesos moleculares en soluciones coloidales por los métodos clásicos tropieza con dificultades experimentales a veces insalvables; en efecto, a medida que el peso de la partícula aumenta, la presión osmótica, disminuye apreciablemente, etc., para concentraciones razonables, se hacen menores y menores y sus medidas se hacen más y más imprecisas.-

Por otra parte a medida que la masa de la partícula se hace mayor, su peso se hace más y más importante hasta llegar a no poder ser despreciado frente a la energía térmica, y la hipótesis fundamental de Einstein acerca del carácter perfectamente irregular del movimiento browniano, deja de ser válida.- Se establece entonces una distribución de concentración de partículas a lo largo de la solución, dependiente de la agitación térmica (difusión) y de la fuerza gravitatoria (sedimentación).- la expresión matemática que se obtiene se conoce bajo el nombre de ley de distribución.- $\log. Q/h = K_n(D - d)gh/RT$ De su análisis surge que puede ser usada como un nuevo método de determinar pesos relativos de partículas (K_n) midiendo sus concentraciones Q_1 y Q_2 a distintas alturas h .- D y d son las densidades de las partículas y solvente respectivamente y " g " la aceleración de la gravedad. Esto-

ricamente la fórmula fué usada a la inversa; mediante el uso de suspensiones de goma-guta de tamaño y peso conocido y determinando su distribución por recuento microscópico a distintas alturas, Perrin en 1908, en una experiencia clásica, obtuvo un nuevo valor de N en concordancia notable con el primitivo e históricamente el primero, obtenido en forma cinética para a partir de la llamada ecuación de Clausius-Maxwell (1870) $\pi N v^2 = v/L\sqrt{E}$ donde L es el camino libre cuando el volumen gaseoso es " v " y E el diámetro molecular¹.

Si seguimos aumentando aún más el peso de las partículas llegaremos al caso común de suspensiones gruesas donde la energía térmica es despreciable respecto de la fuerza de gravedad; es evidente que en este caso el peso de las partículas también puede ser determinado por medida de su velocidad de caída, mediante la aplicación de la ley de Stokes que, y eso es muy importante, solo es explícitamente aplicable a partículas esféricas.-

Si revocamos lo dicho, surge que es suficiente aumentar el peso de las partículas calcáicas para encontrar nuevas métodos aplicables para la determinación de sus pesos moleculares. Y para una partícula calcáica dada, su peso sólo puede ser aumentado aumentando el valor de la aceleración que actúa sobre la misma, y la centrífuga nos proporciona precisamente la manera práctica de aumentar dicha aceleración.-

En otras palabras, recurriendo a la centrifugación controlada puede tratar de determinarse el peso de partículas que por su tamaño corresponderían a la categoría de calcáicas, mediante la aplica-

(1) Para detalles véase J. Perrin "Los átomos" 3a Edición pag. 89.-

ción, bien de la ley de distribución o bien de las leyes de sedimentación .- Y aquí se hace indispensable intercalar el nombre de The Svedberg y colaboradores que convirtieron en realidad el concepto de centrifugación controlada.-

Continuamos pues en definitiva con tres métodos para la determinación de pesos moleculares de coloides¹:

1.º- Medidas de difusión (aplicación de la fórmula de Einstein) en condiciones tales que la energía térmica de las partículas sea el único factor determinante de la misma.- Su aplicación presupone el conocimiento en forma explícita del coeficiente de fricción.-

2.º- Medidas de distribución de partículas bajo la acción de campos centrífugos del orden de 5.000 g; los valores obtenidos con pesos moleculares medios y, como veremos, independientes de la forma de la partícula.-

3.º- Medidas de velocidad de sedimentación de partículas bajo la acción de campos centrífugos intensos hasta del orden de 500,000 g; el campo centrífugo debe ser no solamente lo suficientemente intenso para provocar la sedimentación de las partículas, sino también para sedimentarlas en un tiempo lo suficientemente corto como para que la difusión no llegue a ser muy apreciable; también aquí el coeficiente de fricción debe ser conocido al objeto de calcular pesos moleculares.-

Veremos como la combinación de los métodos uno y tres permitió a The Svedberg independizarse del coeficiente de fricción y por lo tanto de la forma de las partículas.-

(1) Habría que agregar el método clásico de medidas de viscosidades combi-
nadas que no siempre es aplicable, el método químico que da pesos mo-
leculares mínimos y algunos métodos aisladamente aplicables a algu-
nos casos (Fibras monomoleculares, medida de viscosidades, etc.).-

El desarrollo teórico-técnico de los tres métodos y su aplicación a diversos grupos de sustancias coloidales (naturales y artificiales) y en especial proteínas se debe casi exclusivamente a la magnífica labor desarrollada por el Departamento de la Universidad de Upsala, Suecia, bajo la dirección del profesor Tho Svedberg.-

ANEXOS

ULTRACENTRIFUGACIÓN.-

Si bien es cierto que el problema presentado desde un punto de vista general aparece de una sencilla solución, de ahí a la realización práctica de una centrífuga que precisamente pudiera reducir todo su funcionamiento a esa solución sencilla que se buscaba, han mediado largos años de esfuerzos llenos de dificultades teóricas y técnicas.-

Los primeros intentos de usar campos centrífugos para determinar tamaños de partículas se deben a Dumasny (1913). Usaba centrífugas comunes de laboratorio y sus resultados fueron bastante desalentadores; según Svobberg las corrientes de convección fueron la principal causa de error.-

El primer estudio serio sobre las posibilidades que tenía la centrífuga al objeto anotado, fué el emprendido por Svobberg y Nichols en 1923 en la Universidad de Wisconsin, quienes por medio de una pequeña centrífuga eléctrica de eje vertical estudiaron las condiciones que debía reunir el instrumento para poder dar sedimentaciones libres de convección. La sedimentación la seguían ópticamente por observación directa y también mediante fotografías.-

En 1925 Svobberg y Rind (1) sentaron por primera vez las condiciones fundamentales que debía reunir el instrumento: 1) la célula donde la sedimentación tiene lugar deberá ser de forma sectorial con el eje de rotación como centro; 2) la célula será de dimensiones pequeñas (uno a dos cm^3 de volumen) y 3) deberá eliminarse el calor producido en los ejes y el debido a la fricción del aire, etc. Así llegaron a obtener un instrumento, siempre movido eléctricamente, que producía sedimentaciones correctas a 10,000 r.p.m. (correspondientes a 5,000 g) .-

Sin embargo resultaba evidente que esta máquina no podía ser aplicada al campo de las proteínas más que parcialmente, como instrumento para medidas de equilibrios de sedimentación, pues estaban todavía muy lejos de los valores de los campos centrífugos requeridos para la sedimentación de proteínas.-

De ahí que Svedberg y colaboradores trataran no sólo de perfeccionar la centrífuga eléctrica para estudios de equilibrios de sedimentación, sino también de obtener un nuevo tipo de centrífuga capaz de cumplir con las condiciones impuestas por Svedberg y Rinde a velocidades del orden de 40,000 a 60,000 r.p.m.

La primera "ultracentrífuga" de alta velocidad fue construída en 1925-1926, movida por turbinas a aceite (dadas las dificultades existentes de construir un motor eléctrico que soportara la fuerza centrífuga producida). La velocidad alcanzada fue de 45,000 r.p.m. (100,000 g).- A partir de este momento los perfeccionamientos mecánicos que se sucedieron fueron innumerables hasta llegar dignos al tipo "standard" actual de ultracentrífuga a turbinas a aceite que puede funcionar regularmente entre 20,000 y 70,000 r.p.m. dando campos centrífugos que alcanzan, para rotores de tamaños normales, aproximadamente a 350,000 g.-

Ence relativamente pocas años una vieja idea de usar turbinas a aire que se creyó inaplicable para centrifugaciones controladas fue desarrollada principalmente en los Estados Unidos de N.A. por Deans, Fichels y Bauer.- Estos últimos autores entre todo (12) han desarrollado una centrífuga analítica movida a turbinas a aire con la cual pueden obtener campos centrífugos del orden necesario para la sedimentación de proteínas sin alejarse de las condiciones impuestas por Svedberg y Rinde.-

RIFRACCIÓN.-

El estudio de los antecedentes experimentales de la medida de constantes de difusión, es esencialmente el estudio de los "métodos de observación" que por otra parte son comunes a las tres técnicas consideradas: difusión, sedimentación y equilibrios de sedimentación.-

Los primeros experimentos de difusión fueron realizados por Thomas Graham en 1830; consistían en introducir cuidadosamente una capa de la solución debajo del solvente y determinar luego las concentraciones del soluto a distintas alturas mediante la extracción de muestras.-

Desde está vezular las desventajas e imprecisión del método, que está lejos de llenar las condiciones requeridas en una diffusión no perturbada.-

En 1867 Veigt (2) sugirió el uso de un método de observación basado en la variación del índice de refracción con la concentración de la sustancia disuelta.-

En 1893 Wiener (3) investigó el fenómeno de curvatura de la luz al atravesar un gradiente de índice de refracción y finalmente Thevert (4) y (5) aplicó el principio anterior para la medida de constantes de difusión.-

Estos métodos se basaban siempre en la observación de la desviación que sufría la imagen de un diafragma (cuya posición podía graduarse a distintas alturas) debido al gradiente de índice de refracción; y esto no es otra cosa que la aplicación de un viejo método desarrollado por Tessler (1854-57) para fines totalmente diferentes.-

Basándose en el mismo principio, pero realizando las difere-
las posiciones del diafragma simultáneamente, mediante las líneas de
una escala, Laur (6) desarrolló el método que actualmente se conoce
con "Método de la escala de Laur".-

Es evidente que cualquier otra propiedad que varíe en for-
ma conocida con la concentración puede ser usada en forma análoga a
la del índice de refracción; p.ej. la absorción de la luz; Tiselius
y Gross (7) aplicaron este método para estudiar difusión de protei-
nas; pero los resultados no fueron muy satisfactorios; en cambio en
las técnicas de ultracentrifugación el método de absorción se usa
extensamente y a veces con ventaja sobre el de refracción.-

El caso de difusión describe pertenece a la llamada "di-
fusión libre" donde el gradiente de concentración del soluto varía
entre la concentración inicial y caso a cualquier tiempo.-

Otro caso de difusión sería el de dos regiones de concen-
traciones diferentes y uniformes, separadas por una región donde la
concentración varía regularmente. Experimentalmente este segundo ca-
so fue realizado ingeniosamente por Hartweg y Anson (8) separando
ambas soluciones por un vidrio poroso y calibrando el aparato con
una sustancia de constante de difusión conocida.-

NEVA KUNDA SOBRE LA TEORIA DE LOS NUBES

SERIA ELEMENTAL DE LA SEDIMENTACION POR CENTRIFUGACION.¹

En este caso la fuerza centrífuga es, como dijimos, lo suficiente potente intensa para provocar la sedimentación de las partículas a una velocidad notable.-

Vamos a considerar el caso más sencillo de una sedimentación ideal donde no hay interacción de las partículas coloidales (coluciones muy diluidas) ni efecto de carga (efecto Debye-Hückel), donde la difusión es despreciable durante el tiempo de la experiencia y donde la sedimentación tiene lugar libre de convección.-

En estas condiciones, después de un período inicial de aceleración, sólo actúan sobre las partículas la fuerza centrífuga aplicada, equilibrada por la fuerza viscosa de fricción.- La primera para una molécula gruesa está dada por:

$$M(1-V\rho)_{\theta} w^2 x$$

- donde:
- M peso molecular de la partícula en suspensión
 - V volumen específico parcial del soluto
 - ρ densidad del solvente
 - w velocidad angular de la centrífuga
 - x distancia de la partícula al centro de rotación
 - θ temperatura

Por otra parte la fuerza de fricción es:

$$f \cdot dx/dt$$

donde f es el coeficiente de fricción molar ($f = 6\eta rH$ para el caso de partículas esféricas) y t el tiempo.-

El coeficiente de fricción puede expresarse como $f = f_{\theta} \eta_{\theta}$ donde η_{θ} es la viscosidad del solvente a la temperatura considerada y f_{θ} un factor dependiente exclusivamente del tamaño y forma de la partícula.

(1) Para una teoría más detallada y completa véase el libro de Svedberg y Pedersen "The Ultracentrifuge" Oxford Press.-

Igualando ambas ecuaciones se obtiene:

$$N(1-\sqrt{\rho})_{\theta} v^2 \cdot x = f \cdot dx/dt \quad (I)$$

Si suponemos ahora un campo de aceleración unitaria ($v^2/x=1$) y llamamos $\frac{dx}{dt}$ la velocidad correspondiente (dx/dt) de la partícula, la fórmula se transforma en:

$$N(1-\sqrt{\rho})_{\theta} = f \cdot S \quad (II)$$

comparando (I) y (II) resulta:

$$S = \frac{1}{v^2 \cdot x} \cdot \frac{dx}{dt}$$

a $\frac{dx}{dt}$ se la conoce con el nombre de constante de sedimentación y generalmente se expresa como S_{20} significando que está referida a agua a 20 grados centígrados; en este caso la fórmula (II) se expresa:

$$f_{20} \cdot S_{20} = N(1-\sqrt{\rho})_{20} \quad (II')$$

donde ρ significa densidad del agua y f_{20} coeficiente de fricción molar en agua a 20°C ($f_{20} = f_0 \cdot \gamma_{20}$) (γ coeficiente de viscosidad del agua).

Finalmente de (I) y (II') se obtiene:

$$S_{20} = \frac{dx}{dt} \cdot \frac{1}{v^2 \cdot x} \cdot \frac{\gamma_{\theta}}{\gamma_{20}} \cdot \frac{(1-\sqrt{\rho_0})_{20}}{(1-\sqrt{\rho})_{\theta}} \quad (III)$$

S_{20} es por lo tanto la velocidad que adquiriría una partícula de peso molecular M , volumen específico parcial \bar{V} , etc., bajo una aceleración de $1 \cdot g/s^2$ en agua a 20°C.-

En la fórmula (III) dx/dt , \bar{V} y \bar{V} se determinan experimentalmente y $\rho, \rho_0, \gamma_{\theta}, \gamma_{20}$ y \bar{V} se hallan generalmente tabulados.-

Llevando el valor así calculado de S_{20} a (II') sería posible calcular \bar{f} si se conociera la constante de fricción molar f por perfecta relacionada con la constante de difusión D por la conocida fórmula de Einstein:

$$f = R \cdot T / D \quad (IV)$$

que llevada a (II') nos da:

$$M = \frac{RT \rho_{20}}{\rho_{20}(1 - \bar{v})\rho_{20}} \quad (V)$$

que es una de las fórmulas fundamentales de Svedberg.-

Es decir se puede determinar el peso molecular mediante la medida de la constante de sedimentación y constante de difusión del soluto en cuestión.-

Es importante recordar que (V) es independiente de cualquier hipótesis sobre la forma de la molécula, a condición de que la asimetría de esta no llegue a producir orientaciones durante la sedimentación. (esto es poco probable aún en moléculas muy asimétricas debido a la desproporción existente entre la fuerza centrífuga orientadora y la energía térmica que tiende a desorientarlas).-

De todos los factores que figuran en las fórmulas anteriores es indudable que el más sujeto a error o discusión es el del volumen específico parcial de la proteína, debido al efecto de solvatación; sin embargo, para el caso normal de soluciones diluidas, Lansing y Krcmar(9) muestran que aún solvataciones enormes tendrían una influencia muy pequeña sobre \bar{v} ; de igual manera la influencia sobre \bar{v} de las iones adsorbidos es también despreciable. Es decir que normalmente el valor de \bar{v} referido a peso de proteína seca puede usarse en (V) sin introducir mayores errores.

Analizemos ahora rápidamente las condiciones que le hemos impuesto a nuestra sedimentación ideal para ver en que forma podemos acercarnos a ella.-

1.- Uso de soluciones diluidas.- Condición indispensable si queremos evitar las interacciones moleculares. (el efecto de concentración es precisamente lo que nos proponemos estudiar experimentalmente para el caso de la tiroglobulina).-

51.- Restricción del efecto Dunham.- En toda superficie de separación, con o sin membrana semipermeable, entre un electrolito común y un electrolito coloidal, (como en los casos de sedimentación, difusión, electroforesis, etc.) se establece un equilibrio que da lugar a la formación de una pila de concentración de fuerza electromotriz E dada por:

$$E = E_0 \frac{T}{\Delta} \ln (1 + A/B) \quad (VI)$$

donde Δ es la concentración del ión coloidal y E la concentración inicial del electrolito simple (supuesto mono-valente).- De la fórmula surge inmediatamente que cuando la concentración total del electrolito aumenta, la fuerza electromotriz de la pila de concentración, en otras palabras el efecto Dunham, se hace despreciable.-

Es decir el llamado efecto de carga que tendería a dar sedimentaciones lentas y difusiones rápidas puede prácticamente eliminarse agregando al medio cantidades relativamente altas de electrolito. En la práctica soluciones electrolíticas de una fuerza iónica del orden de 0.1 son suficientes.-

52.- Difusión despreciable.- Este efecto es imposible de evitar, aunque en muchos casos las superficies de separación son tan mates que no vale la pena considerarlo. Sin embargo en la mayoría de los casos no puede despreciarse y la posición teórica de la superficie de separación debe ser calculada, lo cual solo es posible si la sedimentación es lo suficientemente rápida para que aparezca solvente puro en un tiempo pequeño en relación al tiempo total de centrifugación y si las observaciones se hacen durante el período de tiempo en que todavía no hay en la mayor parte de la célula de sedimentación, variaciones de concentración con la distancia al centro de rotación.- En estas condiciones es posible demostrar que la posición de la superficie ideal de separación corresponde al punto donde la concentración de la

proteína es igual a la mitad del valor que tiene en la parte no afectada por la difusión¹.-

En el caso del método de observación llamado de la escala en que la difusión de la superficie de separación aparece en forma de una curva normal de distribución el punto de concentración $C = C_0/2$ correspondiente, como veremos, directamente al máximo de la misma.-

42.- Sedimentación libre de convección.- Se consigue mediante la forma sectorial de la célula de sedimentación que evita el reflejo y adhesión de las partículas contra las paredes laterales y también los inconvenientes de convección debidos a variaciones de concentración con el tiempo en distintas alturas de la célula.-

DEFINICION FUNDAMENTAL DE LA FORMULA PARA EQUILIBRIO DE SEDIMENTACION.-

Hemos dicho que cuando difusión y sedimentación sean de un orden tal que ninguno de ellos puede desprenderse respecto del otro, se llega con el tiempo a un estado de equilibrio dependiente de ambos factores.-

La deducción de la formula fundamental puede ser hecha de diferentes maneras pero preferiremos el razonamiento primitivo de Svedberg por su sencillez.-

En el equilibrio, la cantidad de soluto dn_1 que atraviesa la unidad de superficie hacia la periferia de la célula, debido a la fuerza centrífuga, en la unidad de tiempo, debe ser igual a la dn_2 que difunde en sentido contrario debido al gradiente de concentración existente.-

(1) La concentración C_1 en la parte no afectada por la difusión, después de un tiempo t no es igual a la concentración primitiva C_0 , debido a la variación de la fuerza centrífuga con la distancia al centro de rotación y a la forma sectorial de la célula; la relación matemática (véase Svedberg y Kinde (1)) es:

$$C_1 = C_0 (x_0/x)^2 \quad (VII)$$

donde x_0 es la distancia del centro de rotación al menisco (superficie límite de separación al tiempo cero) y x distancia de la superficie límite de separación al tiempo t .-

Es decir:

$\frac{dx_1}{dt} = D \left(\frac{dx}{dt} \right)_{\text{seg.}}$ donde D concentración del soluto y reemplazando $\left(\frac{dx}{dt} \right)_{\text{seg.}}$ por el valor de (I) resulta:

$$\frac{dx_1}{dt} = C.N(1 - v\rho)v^2 \cdot x/T \quad (\text{VIII})$$

Por otra parte la constante de difusión D se define como la cantidad de soluto que difunde a través de la unidad de superficie en la unidad de tiempo bajo la unidad de gradiente de concentración; en símbolos para nuestro caso:

$\frac{dx_2}{dt} = D \left(\frac{dc}{dx} \right)$ y reemplazando D por su valor de (IV) resulta:

$$\frac{dx_2}{dt} = \frac{R_2 T}{2} \cdot \frac{dc}{dx} \quad (\text{IX})$$

igualando (VIII) y (IX) se obtiene:

$$C.N(1 - v\rho)v^2 \cdot x/T = \frac{R_2 T}{2} \cdot \frac{dc}{dx}$$

o también:

$$N(1 - v\rho)v^2 \cdot x \cdot dx = R_2 T \cdot \frac{dc}{C} \quad (\text{IX}')$$

integrando ahora entre las distancias al centro de rotación x_1 y x_2 correspondientes a las concentraciones C_1 y C_2 se obtiene:

$$\frac{1}{2} N(1 - v\rho)v^2 (x_2^2 - x_1^2) = R_2 T \cdot \ln(C_2/C_1) \text{ de donde}$$

se obtiene finalmente:

$$N = \frac{2 R_2 T \ln(C_2/C_1)}{(1 - v\rho)v^2 (x_2^2 - x_1^2)} \quad (\text{X})$$

que es la segunda de las fórmulas fundamentales para la determinación de N .

Al hablar de los métodos de observación veremos las transformaciones que sufre esta fórmula cuando se expresa C_2 y C_1 en función de las variaciones de índice de refracción observadas.-

UTILIZACIÓN DE LAS LEYES CLÁSICAS DE LA DIFUSIÓN PARA EL CÁLCULO DE τ

Fick en 1855 propuso dos relaciones, conocidas como primera y segunda ley de Fick para la difusión, derivadas por analogía con las fórmulas de Fourier para la conducción del calor.

$$1^{\text{a}} \text{ Ley de Fick} \quad \frac{dn}{dt} = -D \cdot \frac{dc}{dx} \quad (\text{XI})$$

$$2^{\text{a}} \text{ Ley de Fick} \quad \frac{dn}{dt} = -D \cdot c^2 \cdot \frac{c}{x^2} \quad (\text{XII})$$

donde n número de moléculas por unidad de volumen (concentración molar) y q es el número de moléculas que difunden a través de la unidad de superficie en un tiempo dt bajo un gradiente de concentración (dc/dx) .- D es una constante para una determinada especie molecular, en un solvente determinada y a una temperatura determinada; se llama constante de difusión y es en particular (teóricamente) independiente de la concentración.- El signo negativo indica simplemente que la difusión tiene lugar de la solución más concentrada a la más diluida.-

También aquí se supone que no existe efecto de carga e igual que en el caso de la sedimentación puede ser anulado por el dializado de la solución a difundir (supuesta coloidal) contra la solución electrolítica que se ha de utilizar como solvente.-

Las fórmulas (XI) y (XII) no son independientes sino que la (XII) puede ser deducida de la (XI).- Desde Fick hasta la fecha se han dado diferentes caminos para llegar a (XII); cinéticos, termodinámicos, etc. que no entraremos a detallar y que pueden encontrarse en cualquier buen tratado de Física-química.-

(1) Para un tratamiento teórico completo véase Williams y Gady(11).-

La ecuación diferencial (XII) posee un infinito número de soluciones; pero existen condiciones experimentales limitantes que hacen posible la obtención de soluciones definidas.-

En el caso de la llamada difusión libre se debe cumplir que para $t = 0$ la concentración para valores negativos de x debe ser cero y para valores positivos, constante e igual a c_0 .-

La solución general de la ecuación (XII) es bastante compleja y puede verse en el trabajo citado de Williams y Gady (10). Para el caso particular de la difusión libre (que hemos utilizado experimentalmente) en la que se comienza la experiencia con una concentración uniforme c_0 en una parte de la célula y solvente puro en la otra, y se investiga la concentración c a una distancia x después de un tiempo t , la integración conduce a la siguiente ecuación: (las dimensiones de la célula deben ser tales que durante el experimento parte de la solución y del solvente hayan permanecido inalteradas).

$$c = c_0/2 \left(1 - \frac{x}{\sqrt{\pi}} \int_0^y e^{-y^2} dy \right) \quad (\text{XIII})$$

donde: $y = x/2 \sqrt{D \cdot t}$

o también $\left| \frac{dc}{dx} \right| = \frac{c_0}{2\sqrt{D \cdot t}} e^{-\frac{x^2}{4Dt}} \quad (\text{XIV})$

que es una ecuación del tipo de las curvas de distribución de Gauss.-

MÉTODOS DE OBSERVACIÓN

En definitiva lo que se trata de medir en cualquiera de los métodos descritos es una variación de la concentración del soluto en función de una distancia; variación más o menos brusca y definida en el caso de sedimentación (idealmente es una verdadera superficie de discontinuidad) o más o menos gradual en el caso de equilibrios de sedimentación y difusión. Por lo tanto cualquier propiedad observable¹ que varíe en forma conocida con la concentración podría utilizarse como método de observación:

De tales propiedades han dado lugar a los métodos ópticos actualmente en uso

- 1.- La absorción de la luz.
- 2.- Refracción de la luz (utilizada por nosotros).

En el método de absorción una imagen de la celda se proyecta sobre una placa fotográfica por medio de un objetivo de larga distancia focal y pequeña apertura. El método se basa en la diferencia de absorción de la luz, para una longitud de onda determinada, entre soluto y solvente.- La placa se analiza luego mediante un micro-fotómetro estudiándose por comparación con una escala "standard" la relación entre ensucamientos y concentraciones².

(1) Más exactamente y especialmente en el caso de sedimentación, es fundamental que el método sea fotográfico para asegurar la obtención de estados sucesivos de la sedimentación en forma prácticamente instantánea con respecto a la velocidad de sedimentación.-

(2) Para una exposición detallada de la técnica y cálculo véase "The Ultracentrifuge" de Svedberg y Pedersen, loc. citada.-

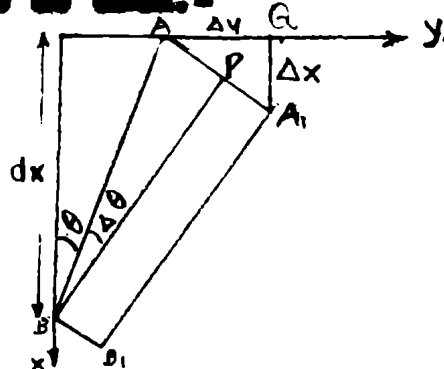
Los métodos de refracción¹ se basan en la relación lineal encontrada experimentalmente, que existe entre dn/dx (gradiente de concentración) y dn/dx (gradiente de índice de refracción). El desarrollo de su teoría se debe principalmente, como dijimos, a Wiener.-

Aun cuando desde un punto de vista teórico la discusión del método es bastante engorrosa y no cuenta de crítica, prácticamente pueden utilizarse fórmulas deducidas de hipótesis más o menos sencillas.-

TEORÍA DE LA CURVATURA DE LA LÍNEA DE UNO DE LOS INDICES QUE GRADIENTE

$\frac{1}{n} \frac{dn}{dx}$ ES CONSTANTE .-(Demostración dada por Lam., Véase el trabajo citado, en base a la teoría de Huygens de las ondas elementales).

Sea "y" la dirección principal del haz de luz y "x" la del aumento del índice de refracción. "A" y "B" son dos puntos cercanos sobre una misma superficie de onda.-



El índice de refracción en "A" es n y en "B" es $n + dn$.-

Cuando la onda secundaria que parte de "A" alcanza "A₁" la que parte de "B" llega a "B₁" y tenemos la nueva superficie de onda A₁B₁ girada respecto de la anterior de un ángulo $\Delta\theta$ en radianes

θ es el ángulo entre la superficie de onda y el eje de las "x" o también entre la tangente a la trayectoria y el eje de las "y".-

(1) Para un análisis detallado de los mismos véase: Dr. Lam "Measurements of concentration gradients in sedimentation and diffusion by refraction methods" Wypsal, 1937.-

La altura correspondiente a una variación dn en el índice de refracción la llamamos dy .

Δx y Δy son diferenciales para la propagación de la luz en las direcciones "x" e "y".

AA_1 y BB_1 representan los caminos recorridos por la luz en el mismo tiempo Δt en los medios de índices n y $n+dn$.

Si llamamos ΔL el camino que en el mismo tiempo recorrería la luz en el vacío, tendremos que:

$$\frac{\Delta L}{\Delta t} = c ; \frac{AA_1}{\Delta t} = c_1 \text{ y } \frac{BB_1}{\Delta t} = c_2$$

donde c, c_1 y c_2 son las velocidades de la luz en el vacío y en los medios de índices n y $n+dn$ respectivamente.

Recordando que $n = c/c_1$ y $n+dn = c/c_2$ se podrá escribir:

$$\frac{AA_1}{\Delta L} = \frac{c_1}{c} = \frac{1}{n} \quad \text{por lo tanto} \quad AA_1 = \Delta L/n$$

y también $\frac{BB_1}{\Delta L} = \frac{c_2}{c} = \frac{1}{n+dn}$ por lo tanto $BB_1 = \Delta L/n+dn$

Además para ángulos pequeños podemos escribir

$$\Delta \theta = AF/AB$$

y como $AB = \Delta x / \cos \theta$ y $AF = AA_1 - BB_1 = \Delta L(1/n - 1/n+dn)$ resulta despreciando los términos en dn^2 etc.,

$$\Delta \theta = \Delta L/n^2 \cdot dn/dx \cdot \cos \theta \quad (IV)$$

por otra parte el ángulo $\angle AA_1 = \theta + \Delta \theta$ (por lados perpendiculares)

luego $\Delta y = AA_1 \cos(\theta + \Delta \theta) = \Delta L/n \cdot \cos(\theta + \Delta \theta)$ (V)

y como podemos escribir que $\cos(\theta + \Delta \theta) = \cos \theta + \cos \theta \cdot \Delta \theta$ resulta

combinando la (V) con la (IV) y despreciando los términos en $\Delta \theta^2$

$$\Delta \theta = \frac{1}{n} \frac{dn}{dx} \Delta y \quad (VII)$$

y si suponemos una película de espesor "a" el ángulo de giro del rayo será:

$$\theta_1 - \theta_0 = a/n \cdot dn/dx \quad (\text{XVII}')$$

similantemente se puede obtener:

$$\Delta\theta = 1/n \cdot dn/dx \cdot \Delta x / \tan\theta \quad (\text{XVIII}) \text{ y reduciéndonos}$$

al caso de rayos para inclinados respecto de la dirección principal del haz de luz, podemos escribir:

$$\theta \cdot \Delta\theta = 1/n \cdot dn/dx \cdot \Delta x \quad (\text{XVIII}')'$$

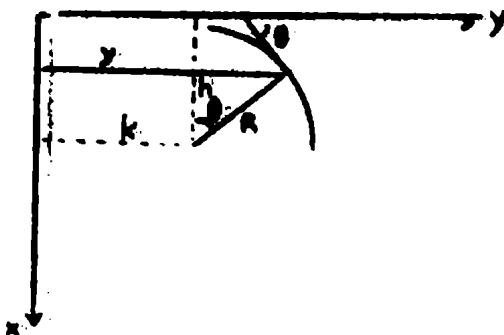
integrando esta ecuación entre los límites x_1 y x_0 , la proyección del camino recorrido por la luz sobre el eje de las "x" será:

$$x_1 - x_0 = \frac{1}{2} \frac{dx}{n \frac{dn}{dx}} (\theta_1 + \theta_0)(\theta_1 - \theta_0)$$

reemplazando θ_1 y $\theta_1 - \theta_0$ por sus valores de (XVII') se obtiene:

$$x_1 - x_0 = \theta_0 + a^2/n \cdot dn/dx \quad (\text{XIX})$$

Por otra parte si tenemos un círculo cualquiera referido a un sistema de coordenadas análogo al usado, y correspondientemente llamamos θ al ángulo entre la tangente a la curva y el eje de las "y", es simple que:



$$h - x = R \cdot \cos\theta \quad \text{o sea que} \quad \Delta x = R \cdot \sin\theta \cdot \Delta\theta$$

y si nos reducimos al caso de ángulos θ pequeños se puede escribir

$$\Delta x = R \cdot \theta \cdot \Delta\theta \quad \text{comparando esta ecuación con la (XVIII)'}$$

resulta evidente, a condición que $1/n \cdot dn/dx$ sea constante, que el camino recorrido por la luz es un arco de círculo de radio:

$$R = n / \frac{dn}{dx}$$

Es importante recordar que las fórmulas que anteceden solo valen para rayos poco inclinados respecto del eje principal "y", lo cual condiciona en cierto modo el dispositivo óptico de observación: apertura pequeña y distancias focales largas.-

EFECTO DE LA ESCALA (LAMB, 1928) DETERMINACIÓN DE LA FÓRMULA FUNDAMENTAL.-

Sea en la figura N° 1, P_1 el plano de la escala con una línea a la altura X_1 ; P_2P_3 de espesor "a" representa la célula donde se halla el gradiente a medir. P_4 es el plano principal objeto del objetivo; la placa fotográfica está en P_5 . Desde X_1 se han dibujado dos rayos, el curvado o real y el recto que es el que se obtendría si no hubiera gradiente; W_1 y W_2 son los ángulos con que los rayos dejan la célula para incidir sobre el punto principal y I es el desplazamiento sobre la placa fotográfica que sufre la línea X_1 debido al gradiente entre P_2P_3 ; "L" es la distancia óptica entre P_1 y P_4 .-

$$I = BS - AS - n \cdot \text{tang} W_2 - n \cdot \text{tang} W_1$$

el signo en que está tomada la diferencia fija de paso nuestra convención; para la obtención de I habrá que restar de la posición de las líneas de la escala experimental la de la escala de referencia.

La igualdad anterior puede escribirse para ángulos pequeños:

$$I = n(w_2 - w_1) \text{ para } n/L = G \text{ (cambio lateral de la escala)}$$

luego
$$I = G \cdot L \cdot (W_2 - W_1) = G(w_2 L - w_1 L)$$

recordando que la distancia óptica L es: $L = a_1 + a/n + a_2$ donde "n" es el índice de refracción de la solución.

será: $w_1 L = w_1 a_1 + w_1 a/n + w_1 a_2$ y como en nuestro caso $w_1 a_1 = BE$,

$w_1 a/n = GE'$ y $w_1 a_2 = GI$ (ángulos pequeños) y por otra parte $BE + GE' + GI =$

$= X_0 - X_1$

Reemplazando resulta:

$$v_1 L = X_0 - X_1$$

Hacemos en la misma forma para v_2 obtendremos:

$$DF = a_1 \alpha \quad \text{y como } \alpha = \alpha/\beta \text{ y también } \alpha = v_2/\gamma$$

resulta

$$\alpha = n\beta \quad \text{y } v_2 = n\gamma \text{ de donde}$$

$$\alpha = v_2 - n(\gamma - \beta) \quad \text{pero } (\gamma - \beta) \text{ es lo que}$$

hemos llamado $(\theta_1 - \theta_0)$ (ángulo de desviación que sufre el rayo luminoso debido a la inhomogeneidad del medio), luego

$$\alpha = v_2 - n(\theta_1 - \theta_0) \text{ y como según la eq. (XVII')}$$

$$\theta_1 - \theta_0 = a/n \cdot dn/dx \text{ resulta}$$

$$\alpha = v_2 - a \cdot dn/dx \text{ es decir:}$$

$$DF = a_1 v_2 - a_1 a \cdot dn/dx$$

Por otra parte $F'H$ es precisamente la $X_1 - X_0$ de la ecuación (XIX) y como en nuestro caso es $\theta_0 = \beta$ y $\beta = \alpha/n = v_2/n = a/n \cdot dn/dx$

resulta:

$$F'H = a v_2/n = a^2/n \cdot dn/dx$$

Por otra parte $HI = a_2 v_2$

Finalmente sumando los valores obtenidos de DF , $F'H$ y HI

se obtiene: $DF + F'H + HI = X_0 - X_1 - a_1 v_2 + a v_2/n + a_2 v_2 - (a_1 + a/n) a \cdot dn/dx$
de donde

$$L v_2 = X_0 - X_1 + (a_2 + a/n) a \cdot dn/dx$$

Llevando ahora los valores de $v_1 L$ y $v_2 L$ a la fórmula de "E"

resulta:

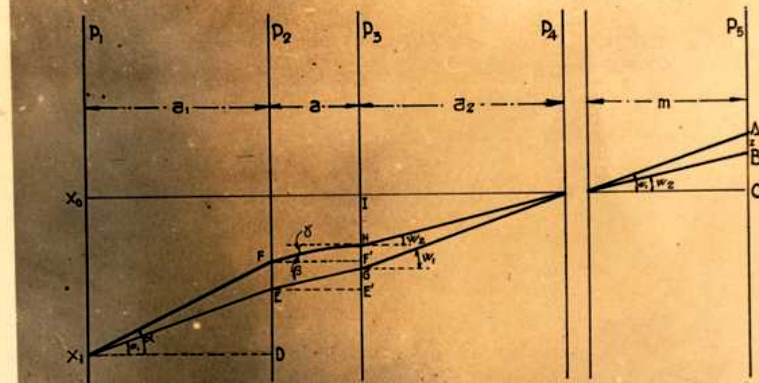
$$E = G(a_2 + a/n) a \cdot dn/dx$$

Si hacemos $(a_2 + a/n) = b$ (distancia óptica del centro de la célula a la escala) tendremos finalmente:

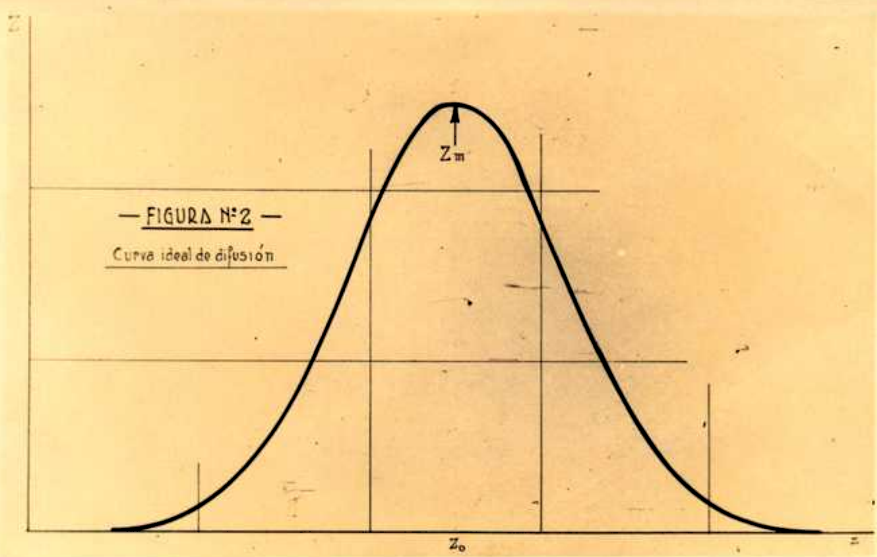
$$E = G \cdot a \cdot b \cdot dn/dx \quad \text{(IX)}$$

que es la relación que buscábamos.-

El desplazamiento "E" de las líneas de la escala es proporcional al espesor de la célula "a" a la distancia óptica "b" de la escala al centro de la célula y al gradiente dn/dx a distintas alturas de la célula. (Referidas generalmente al centro de la misma).-



— FIGURA N°1 —
 Método de la escala de Lamm



— FIGURA N°2 —
 Curva ideal de difusión

Evidentemente cuanto menos inclinado y más delgado sea el haz de luz que contribuye a la formación de la imagen de cada línea de la escala más representativas serán las desplazamientos "Z" de alturas definidas en la célula.-

Para medir el desplazamiento "Z" en fotografía la escala con y sin el gradiente (pero con el resto de las condiciones absolutamente idénticas); se acostumbra a llamar a la primera escala "normal" y a la segunda, escala de "referencia".- Se leen ambas escalas, línea por línea en un microscopio comparador y la diferencia de lecturas de líneas homólogas x_1 y x_2 da directamente los valores de Z ; este valor de Z es característico de una cierta altura real "x" en la célula representada por la línea de la escala normal " x_1 ". El factor de proporcionalidad es por supuesto el aumento lateral "F" de la célula (con la cámara enfocada sobre la escala).-

$$\text{Siendo } F = m/(L - b) = G \cdot L/(L - b)$$

$$\text{o también } L/F = L/G \cdot L/(L - b) \text{ es decir } dx = \frac{L}{G} dz$$

Finalmente si se representa gráficamente los valores de Z en función de las posiciones x_1 expresadas en las lecturas arbitrarias del comparador se obtiene para el caso de difusión y sedimentación una curva de distribución del tipo indicado en la figura N° 2 (curva ideal).

El área debajo de la curva es $\int Z dx$ o en otras unidades proporcional a $\int Z dx$

$$A(Z, z) = \int Z dx = F \int Z dx = F U_0 b \int \frac{L}{G} dz = F U_0 b (n_2 - n_1)$$

do que $n_2 - n_1 = \alpha C_0$ donde C_0 es la concentración real de proteína,

$$\text{resulta que: } C_0 = \frac{1}{\alpha} \cdot A/U_0 b. \quad (IX')$$

es decir que del diagrama I, 2 es posible por medida directa de su área determinar la concentración de la proteína responsable de la desviación ξ observada .

A continuación veremos como se usan dichos diagramas en los distintos métodos.-

DEFINICIÓN.- Recordando al hecho que dn/dx y dn/dt son proporcionales (resultado experimental) podemos escribir:

$c = \alpha (n_1 - n_0)$ donde "c" es la concentración del soluto y "n₁" y "n₀" los índices de refracción de la solución y del solvente respectivamente.

De donde la ecuación (XIV) toma la forma:

$$dn/dx = X = (n_1 - n_0) / 2 \sqrt{\pi Dt} \cdot e^{-x^2 / 4Dt} \quad (XIV')$$

Por transformaciones algebraicas de la ecuación (XIV') (vease el trabajo citado de Lamm) se pueden obtener distintas expresiones utilizables para el calculo de ξ .

Si se representa gráficamente dn/dx en función de "x". el área A debajo de la curva será evidentemente $(n_1 - n_0)$ y la ordenada máxima X_m :

$$X_m = A / 2 \sqrt{\pi Dt} \quad (XXI)$$

y $Dt = X_m^2 / 2$ donde X_m es la abscisa correspondiente al punto de inflexión y que en cálculo estadístico se conoce como desviación "standard".

Recordando ahora que $Z = Gab \cdot dn/dx$ y que $x = z/\sqrt{b}$ se obtendrá reemplazando en la formula (XIV') que en el diagrama (Z, S):

$$Z = Gab(n_1 - n_0) / 2 \sqrt{\pi Dt} \cdot e^{-z^2 / 4Dt b^2} \quad \text{y el área bajo la curva será por lo tanto:}$$

$$A(Z, S) = Gab(n_1 - n_0) \sqrt{\pi} \quad \text{o también}$$
$$A(Z, z) = Gab \cdot A \cdot \frac{GL}{L-b}$$

y reemplazando valores en la expresión de $(dn/dx)_{\max} = X_m$ en la ecuación (XXI)

$$X_m / Cab = A(X, n) / \sqrt{2ab} \sqrt{\pi Dt} \cdot (L-b) / L \quad \text{de donde}$$

$$D = A^2(X, n) / 4\pi t X_m^2 \cdot 1 / \sqrt{2} \cdot (L-b)^2 / L^2 \quad \text{(XXII) fórmula}$$

fundamental mediante la cual se puede calcular la constante de difusión al tiempo "t" por medida directa del área correspondiente a la curva (X, n) (Fig. N° 2) conociendo las constantes ópticas $(L-b)/L$ y g .

Otro método para el cálculo de "D" se basa en tratar la curva experimental como curva de distribución que es, y calcular su desviación "standard" ($\sigma = \Sigma_1$) siguiendo los métodos usados en estadística (véase trabajo citado de Lamm), y luego mediante la expresión $Dt = \sigma^2 / 2$ calcular "D".-

Si con el dato obtenido de σ se reducen las coordenadas de la curva experimental a una curva normal "standard" (ideal) se podrá por comparación tener una idea cualitativa de la desviación de la curva experimental del comportamiento ideal requerido por la teoría. (indicando en general la presencia dentro de la solución de más de un componente).-

ADVERTENCIA.- Se trata de averiguar que punto de la curva de la figura N° 1 representa la posición ideal de la superficie de separación a un tiempo "t". si no hubiera ocurrido la difusión concomitante.

Recordando la fórmula (XIV') podemos escribir para x o (punto de partida de la difusión).

$$(dn/dx)_0 = (n_1 - n_0) / 2\sqrt{Dt} \quad \text{fórmula idéntica a la}$$

(XXI); es decir la abscisa correspondiente a X_m en el diagrama (X, x) corresponde a la posición de la superficie ideal de separación buscada, o lo que es equivalente la abscisa X_0 correspondiente a Z_m en el diagra-

na (Z, s).

Finalmente para transformar los valores arbitrarios del compensador (s) en distancias absolutas en la célula es indispensable conocer, no sólo el factor de aumento del sistema óptico, sino también la correspondencia de por lo menos un punto de la célula con un punto de la placa fotográfica; para ello la célula compensadora del rotar se halla provista de un pequeño orificio, cuya distancia al centro de rotación x_0 se conoce perfectamente, a través del cual se obtendrá la imagen de algunas líneas de la escala; a la posición (s_1) del punto medio de esta imagen se le hace corresponder la distancia x_0 .- El resto del cálculo es elemental:

Sea " x " la distancia al centro de rotación buscada y " F " el factor de proyección de la célula a la placa fotográfica; luego

$$x - x_0 = (s_1 - s_0)/F \quad (\text{XIII})$$

el signo negativo se debe necesariamente a que el índice x_0 se halla en general a una distancia mayor del eje de rotación que la célula propiamente dicha.-

Conocidas los distintos valores de " x " para diferentes " t " la fórmula (III) se puede aplicar directamente.-

EQUILIBRIO DE SEDIMENTACIÓN:- La fórmula (IX') que vimos al estudiar la teoría del equilibrio de sedimentación, puede escribirse aplicada a un punto a la distancia " x " del eje de rotación:

$$\left(\frac{dc}{dx}\right)_x = c_x M(1 - v\rho) \omega^2 x / RT \quad \text{o también recordando las}$$

relaciones existentes entre (dc/dx) , (dn/dx) y " Z "

$$Z_x / \omega^2 x = c_x M(1 - v\rho) \omega^2 x / RT \quad \text{o también}$$

$$Zx_x = Z_x M(1 - v\rho) \omega^2 / RT \omega^2 x \quad \text{fórmula que aplicada a}$$

los puntos x_2 y x_1 correspondientes a las concentraciones c_2 y c_1 y dividiendo miembro a miembro da:

$$\frac{z_2 c_2}{z_1 c_1} = \frac{z_2}{z_1} \quad \text{de donde}$$

$$c_2/c_1 = z_2 z_1 / z_1 z_2 \quad \text{que llevado a la fórmula (X)}$$

da Finalmente:

$$M = \frac{\frac{z_2 x_1}{z_1 x_2}}{(1 - \sqrt{\rho}) \sqrt{z_2^2 - x_1^2}} \quad (\text{XIV})$$

donde todos los factores son conocidos excepto "z" que se mide del gráfico (X,s) y "x" que se calcula igual que en el caso de sedimentación con una fórmula análoga a la (XIII)

SUMARIO PARTE

EXPERIMENTOS REALIZADOS CON TIROGLOBULINA DE CERDO.-

Esta proteína fué sometida al análisis ultracentrífugo en dos oportunidades en la Universidad de Upsala, Suecia; en la primera ocasión Heidelberger y Svedberg (11) primero y Heidelberger y Pedersen (12) después, estudiaron su estabilidad y determinaron su peso molecular; y más tarde Lundgren (14) se ocupó de su purificación y del análisis ultracentrífugo de sus productos de disociación en condiciones variables (estudios que continúa actualmente en la Universidad de Wisconsin).-

Los resultados obtenidos por Heidelberger y Svedberg muestran que la tiroglobulina de cerdo tiene una constante de sedimentación S_{20} 19.2×10^{-13} y que es estable en una amplia zona de pH (desde 4.8 hasta 11).-

Más tarde Heidelberger y Pedersen (1935) realizando medidas de equilibrios de sedimentación encuentran para esta proteína un peso molecular de alrededor de 650.000 y consiguen el hecho de que la tiroglobulina contiene siempre componentes de peso molecular variable en proporción que alcanza hasta el 25%; y además que el peso molecular determinado por equilibrio de sedimentación baja considerablemente por dilución, por debajo de concentraciones de 0.5% de proteína.-

Finalmente, experimentos de difusión realizados por Palsen (15) le asignan a esta proteína una constante $D_{20} - 2.65 \times 10^{-7}$. Este dato combinado con la constante de sedimentación citada da para la tiroglobulina un peso molecular de 650.000.-

Los propensos realizar con dicha proteína un estudio sistemático de sus constantes de sedimentación, pesos moleculares determinados por medidas de equilibrios de sedimentación y constantes de difusión, en función de la concentración de tiroglobulina.-

También, aunque como se verá más adelante no pudo llegarse a resultados concluyentes, tratamos de utilizar los diagramas obtenidos para comprobar dentro de que límites de error la fórmula (IX') resulta válida y en particular si la distancia de la celda a la escala influye sobre dichos valores (teóricamente no debía).-

La primera parte fue realizada con todo éxito, obteniéndose resultados, que para las concentraciones correspondientes, concuerdan con los datos existentes en la bibliografía.-

PARTE EXPERIMENTAL

PREPARACION DEL MATERIAL UTILIZADO.-

La tiroglobulina fué preparada de acuerdo a la técnica utilizada por Lundgren¹ y que consiste en:

A las glándulas tiroideas de cerdo se les separa toda la grasa y tejido conjuntivo posible, manteniéndolas a cero grados con hielo y se lavan luego con solución de cloruro de sodio al 1% a objeto de eliminar la mayor cantidad de sangre posible.-

Las glándulas pasadas por una máquina de picar como bien fina se macera en frío (0°) con solución de cloruro de sodio al 1% durante 24 horas (aproximadamente dos litros de solución para un litro de glándulas picadas); se filtra luego por un paño de trama abierta y se repite la extracción con otro litro de solución de cloruro de sodio.-

Después de una hora el líquido se decanta y se lleva la solución a pH 5 con sulfúrico diluido que se va agregando lentamente. El precipitado, constituido principalmente por nucleoproteínas y otras sustancias insolubles en medio ácido, se separan por centrifugación.-

El sobrenadante se lleva nuevamente a pH 7 con amoníaco diluido y se le agrega un volumen igual de solución saturada de sulfato de amonio, tan lentamente como sea posible y agitando continuamente. (Todas estas operaciones es conveniente realizarlas en frío). La tiroglobulina precipita con sulfato de amonio a media saturación.-

El precipitado se centrifuga y se reprecipita varias veces hasta obtenerlo totalmente libre de hemoglobina; operando rápidamente esto se consigue en dos o tres veces.-

(1) Comunicación privada.

Una variante del método que da muy buenos resultados consiste en precipitar la tiroglobulina a pH 6 con sulfato de amonio al 40% de saturación.-

Finalmente la solución acuosa se filtra por un filtro esterilizante y se dializa a pH 6, con agua primara y con el buffer a utilizar después.-

DESCRIPCIÓN DE LA CENTRÍFUGA.

Descripción general de la centrífuga "tipo Svedberg".¹ La centrífuga consiste de las siguientes partes fundamentales: la centrífuga en sí, el sistema de circulación de aceite y de hidrógeno, el sistema de observación y los controles (control de temperatura, presión, velocidad, etc.).

La centrífuga en sí consta de un rotor de acero especial de forma ovalada con eje de rotación horizontal provisto en sus extremos de dos pequeñas turbinas (El rotor que funciona en la Universidad de Wisconsin, Figura N° 3, tiene en realidad dos turbinas molinas en cada extremo), accionadas por aceite a presión.- El rotor gira en el interior de una caja de acero en una atmósfera de hidrógeno a presión reducida.-

El sistema de circulación del aceite está más o menos esquematizado en la figura N° 4.- Las turbinas a aceite son alimentadas por un compresor centrífugo A a través de un enfriador de aceite B y una válvula reguladora C ; la mayor parte del aceite vuelve por la cámara superior de drenaje D al fondo del depósito E ; el aceite que lubrica los cojinetes vuelve por la cámara inferior F ;

(1) Para una descripción detallada véase el libro de Svedberg y Pedersen, loc. citada.-

aceite nuevo se puede hacer llegar cuando es necesario desde la cisterna \underline{I} .

Para la lubricación propiamente dicha el aceite va desde el fondo del enfriador o refrigerante hacia el recipiente de seguridad \underline{P} a través del filtro \underline{M} y pasando por la válvula reguladora \underline{Q} (en el tablero).- El aire en \underline{P} se hace escapar al principio de la operación abriendo \underline{L} .

Los indicadores \underline{N} en la centrífuga y \underline{N}' en el tablero dan la presión de aceite que llega a las turbinas y el indicador \underline{R} la presión de aceite que va a los cojinetes.-

A la caja se le hace el vacío a través de los caños \underline{J} , de la trampa \underline{G} , y de la cámara \underline{L} .

La temperatura en los cojinetes y en la caja propiamente dicha se controla en termocouplas adecuadas y la del aceite mediante termómetros a resistencia.-

La válvula de seguridad \underline{P} evita que el rotor pueda seguirse acelerando indefinidamente por encima de una cierta presión crítica.-

Sistema de observación.- Varía ligeramente según el método utilizado. Nos limitaremos a esquematisar el correspondiente al método de la escala que fué el utilizado preferentemente.-

En la figura N^o 5 \underline{L} es una lámpara de mercurio, \underline{M} un filtro para aislar algunas líneas intensas del espectro del mercurio, \underline{N}' la imagen de la escala real \underline{N} a través de la lente de proyección \underline{A} , y \underline{Q} la célula de sedimentación, \underline{Q} el objetivo y \underline{P} la placa fotográfica donde se enfoca \underline{N}' a través de \underline{Q} y \underline{Q} ; \underline{V} y \underline{V}' son las ventanas de cuarzo de la caja de acero donde el rotor está contenido; \underline{R} es el

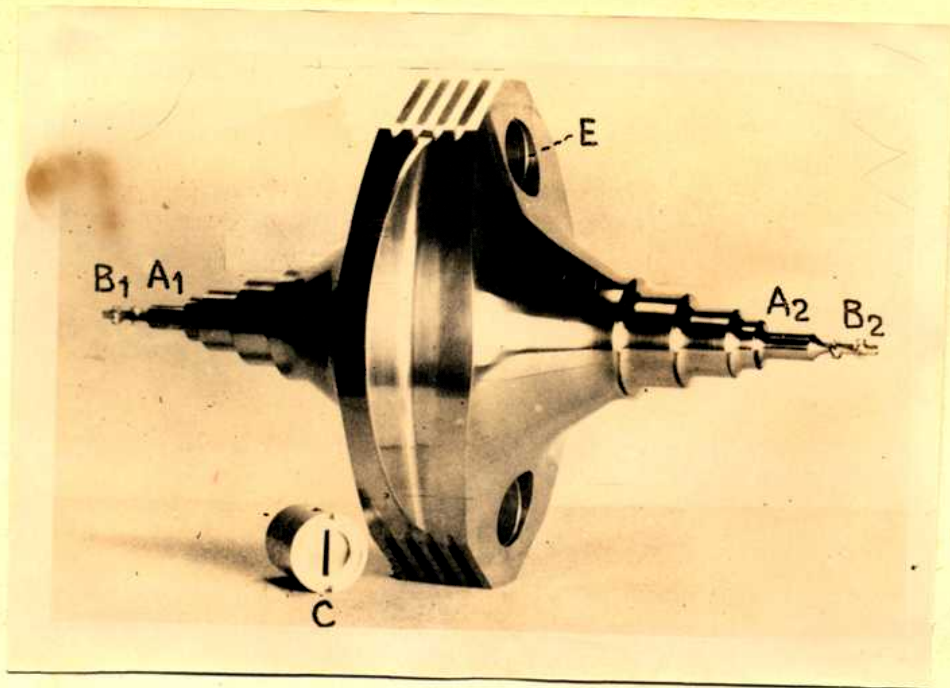
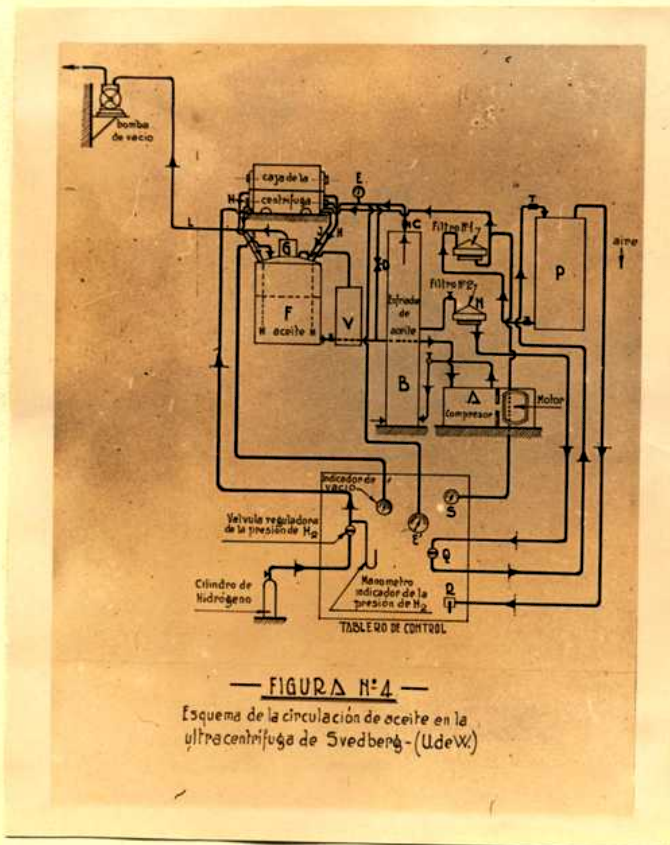


Figura N: 3.
Rotor de la ultracentrifuga de la Universidad de Wisconsin
A₁B₂ espigas del eje que apoyan en los cojinetes
B₁B₂ turbinas gemelas
C célula
E orificio donde va colocada la célula



— FIGURA N:4 —
Esquema de la circulación de aceite en la
ultracentrifuga de Svedberg (UdeW)

perfil de un stroboscopio para la medida y control de la velocidad del rotor.-

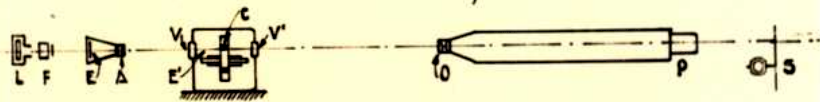
En las figuras 2^o 6, 7 y 8 están reproducidos distintos detalles de la ultracentrífuga "tipo Svedberg" que funciona en el departamento de Físico-Química de la Universidad de Wisconsin.-

DETERMINACION DE LA CONSTANTE DE SEDIMENTACION S_{20} .

Debe hacer notar que para el calculo de S_{20} , siempre que no se usen intervalos de tiempo muy largos (generalmente del orden de 10 minutos), no se hace necesario la utilización de la forma integrada de la ecuación (III) sino que la expresión aproximada,

$$S_{20} = \frac{x_2 - x_1}{\frac{x_2 + x_1}{2} \cdot \omega^2 \Delta t} \cdot \frac{\eta_{\theta}}{\eta_{20}} \cdot \frac{(1 - \nu \rho_0)_{20}}{(1 - \nu \rho)_{\theta}}$$

es suficiente.- De los factores tabulados que figuran en la fórmula solo $\frac{\eta_{\theta}}{\eta_{20}}$ varía notablemente con la temperatura; de ahí que para cada par de valores de "x" se deba usar el correspondiente $\frac{\eta_{\theta}}{\eta_{20}}$ (columna "3") y se cambie el resto del factor de corrección $(1 - \nu \rho)_{20} / (1 - \nu \rho)_{\theta}$ solo se aplica al valor promedio de "3".-



— FIGURA N°5 —

Sistema de observación de la ultracentrífuga

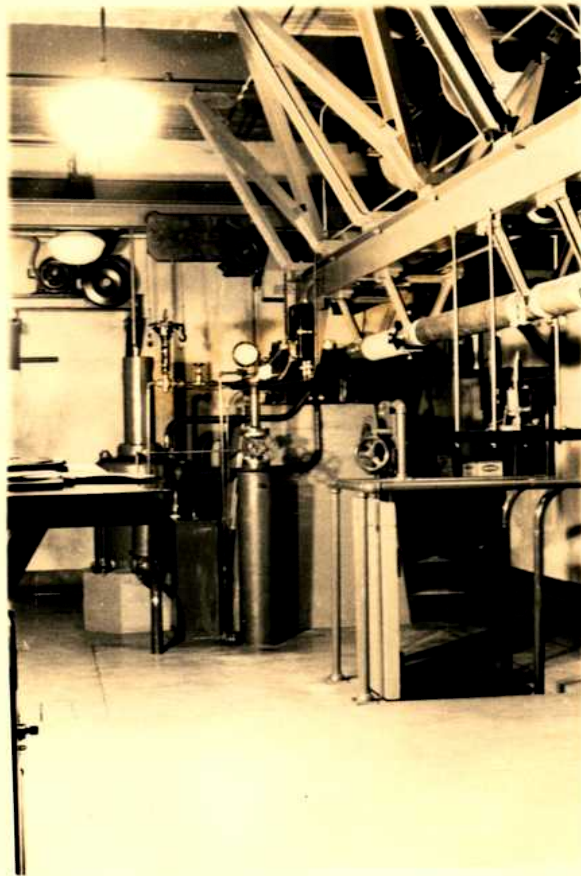


Figura N° 6
Vista general de la centrífuga
con el sistema optico etc.-

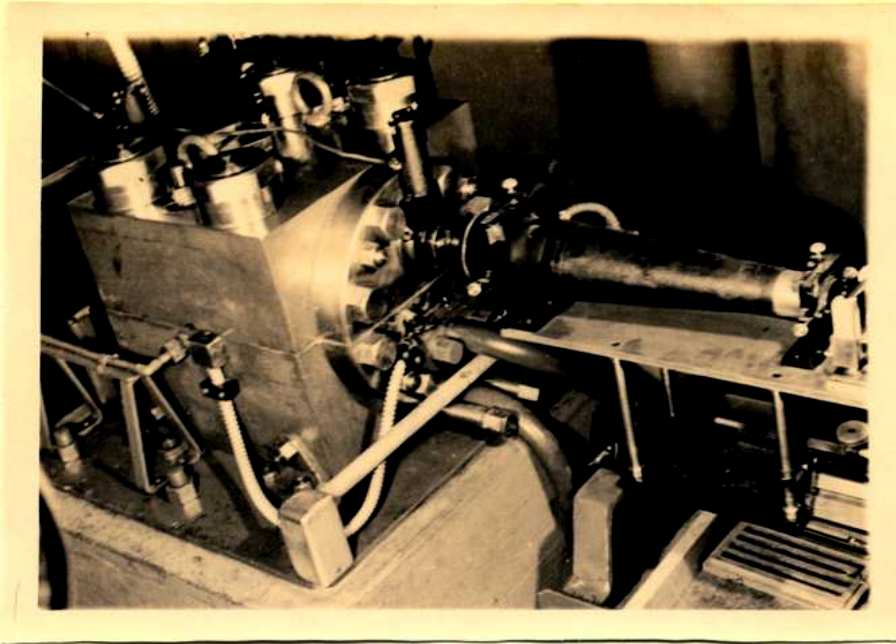


Figura N° 7
Parte del sistema de proyección y caja
que contiene el rotor.

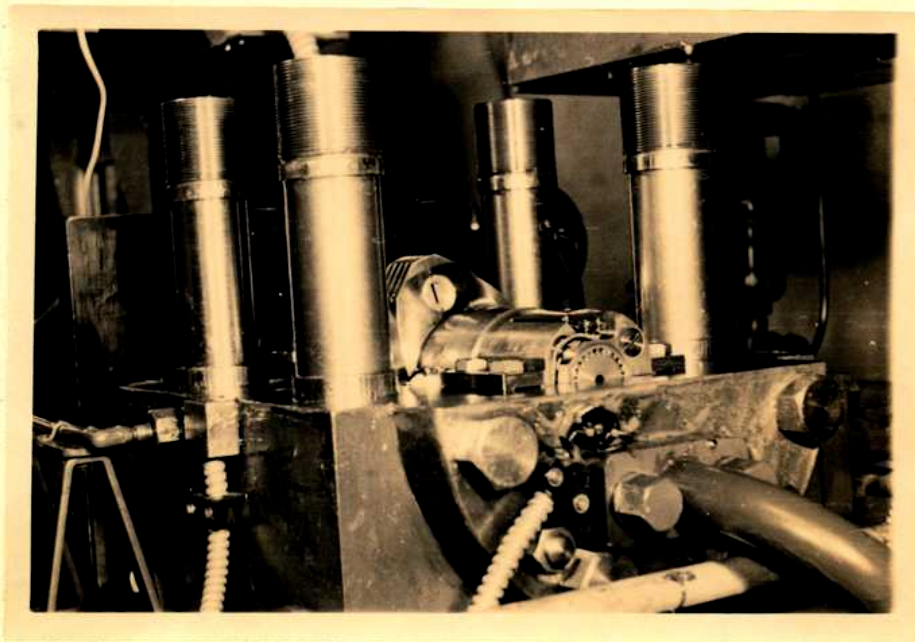


Figura N° 8
Caja de la centrifuga donde se ha levantado
la mitad superior, lo que permite ver parte
del rotor y la célula.

GRABO N° 1

Experiencia N° 1

Concentración de tiroglobulina (Kjeldahl): 3.99 gr.%

Buffer (PO₄H₂K - Na₂CO₃ - ClNa) de pH 7.4

40.000 r.p.m.; método de la escala; exposición cada 10 minutos.-

Expos. N°	Distancia de la superficie de supe. soluto/solvente al centro de rotación. "x" cm.	$\frac{x_2 - x_1}{2}$ cm	$S \times 10^{13}$	$S_{20} \times 10^{13}$
-----------	---	--------------------------	--------------------	-------------------------

1	5.781			
2	5.858	.077	12.35	
3	5.938	.070	12.91	
4	6.011	.083	12.94	
5	6.095	.080	12.88	13.94
6	6.158	.085	12.86	
7	6.263	.085	12.42	
8	6.383	.090	13.25	
9	6.441	.088	12.77	
10	6.575	.098	13.16	

GRABO N° 2

Experiencia N° 2

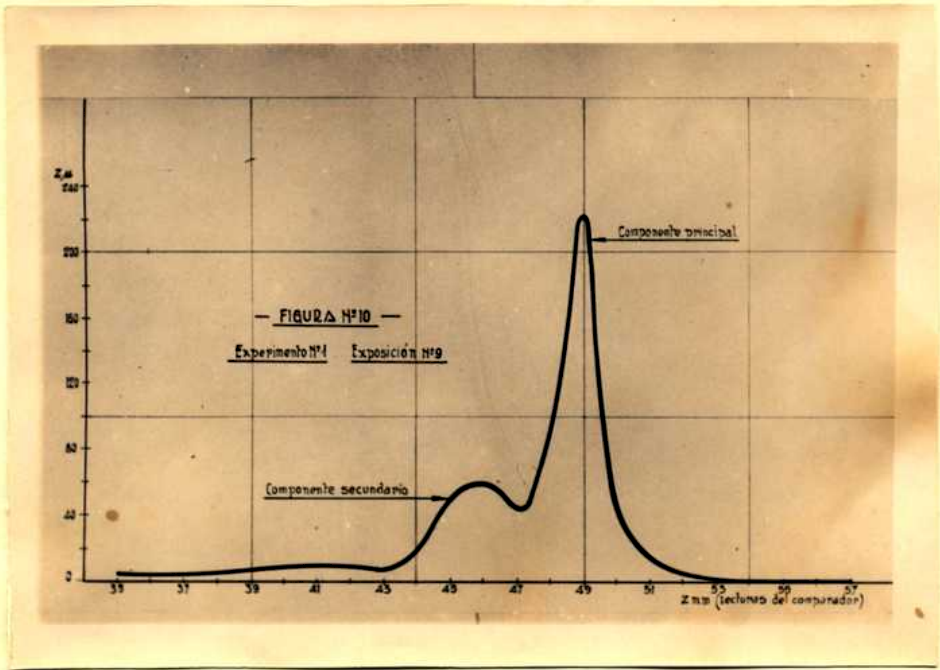
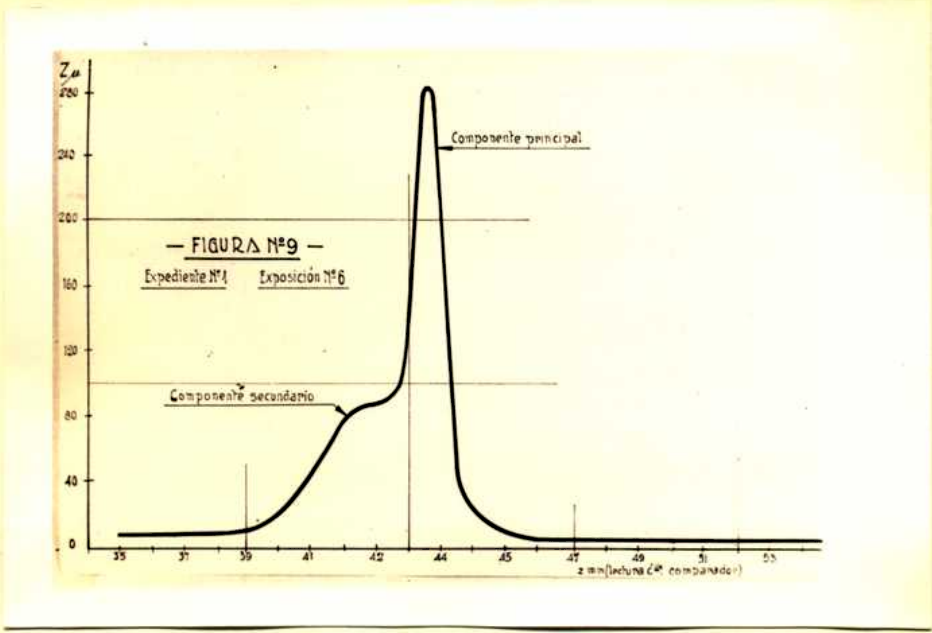
Concentración de tiroglobulina (Kjeldahl): 1.65 gr.%

Buffer (PO₄H₂K - Na₂CO₃ - ClNa) de pH 7.4

40.000 r.p.m.; método de la escala; exposición cada 10 minutos.-

Expos. N°	Distancia de la superficie de supe. soluto/solvente al centro de rotación. "x" cm.	$\frac{x_2 - x_1}{2}$ cm	$S \times 10^{13}$	$S_{20} \times 10^{13}$
-----------	---	--------------------------	--------------------	-------------------------

1	5.958			
2	5.958	.100	14.86	
3	6.057	.099	14.48	
4	6.158	.101	14.55	
5	6.260	.102	14.42	
6	6.368	.108	14.98	16.42
7	6.477	.109	14.90	
8	6.598	.113	15.18	
9	6.704	.114	15.05	
10	6.818	.114	14.75	
11	6.940	.122	15.55	



CUADRO N.º 3

Experiencia N.º 3
 Concentración de la tiroglobulina (Kjeldahl): 1.12 gr.5
 Buffer (PO₄H₂K - Na₂O.H₂ - ClNa) de pH 7.4
 40.000 r.p.m.; método de la coala; especificación a intervalos variables.-

Expec. N.º Distancia de la superficie de super. soluble/solvente al centro de rotación. $x_2 - x_1$ $s \times 10^{13}$ $s_{20} \times 10^{13}$

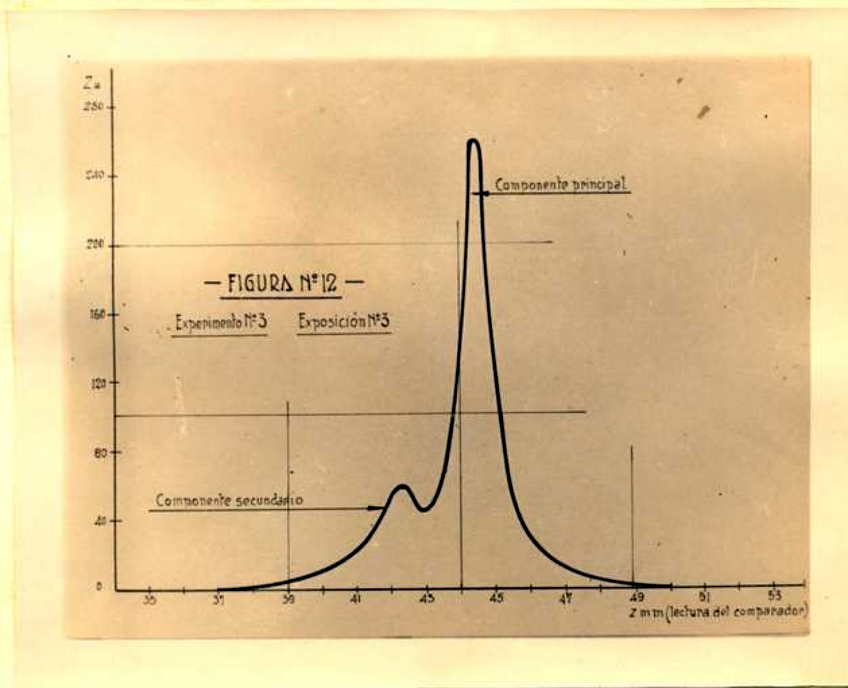
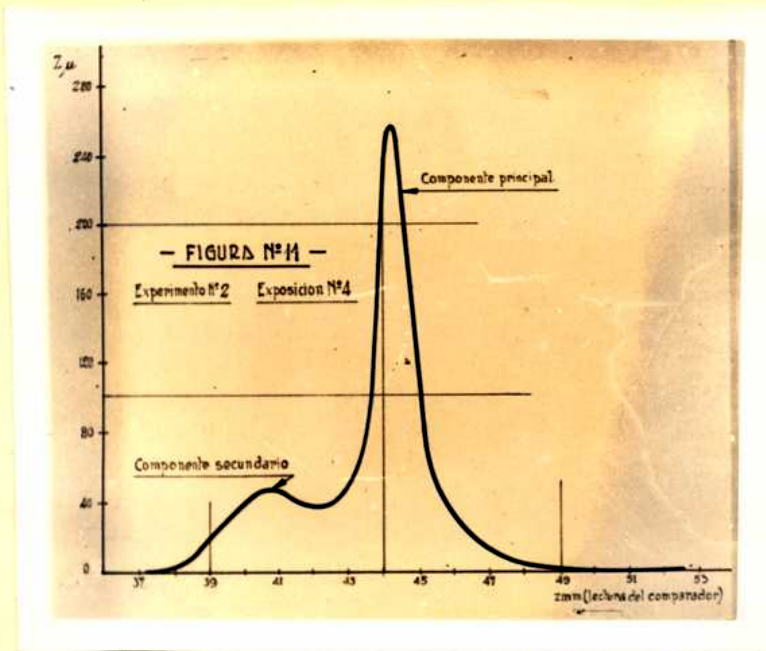
	"x" cm.			
1	5.866	- -	- -	
2	6.056	.190	15.26	
3	6.170	.182	15.15	17.12
4	6.445	.297	15.80	
5	6.749	.303	15.79	

CUADRO N.º 4

Expec. N.º Distancia de la superficie de super. soluble/solvente al centro de rotación. $x_2 - x_1$ $s \times 10^{13}$ $s_{20} \times 10^{13}$

	"x" cm.			
1	5.851	- -	- -	
2	6.053	.194	16.47	
3	6.080	.184	16.32	
4	6.250	.186	17.85	
5	6.365	.196	16.35	18.16
6	6.410	.194	16.09	
7	6.733	.216	14.85	
8	6.860	.263	16.40	

Algunas de las curvas (X,s) correspondientes a los cuadros anteriores se han reproducido en las Figuras N.º 9, 10, 11, 12, 13. Al hablar de los métodos de observación ya vimos como se utilizan dichas curvas para el cálculo de "x".-



En las figuras citadas se aprecia perfectamente la presencia de un componente secundario que comprueba la no monodispersidad de la tireoglobulina usada.-

Finalmente los resultados obtenidos para λ_{220} se han representado gráficamente en la figura N° 14 donde aparece claramente el efecto notable que la concentración tiene sobre la velocidad de sedimentación de esta proteína. Este efecto de concentración no es particular para la tireoglobulina sino que ha sido observado en muchos otros casos, especialmente en moléculas grandes y asimétricas.-

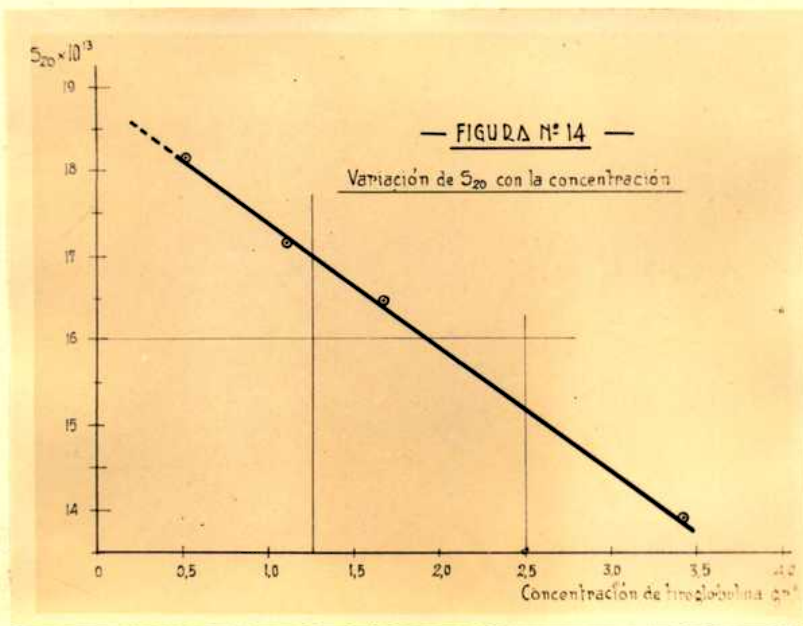
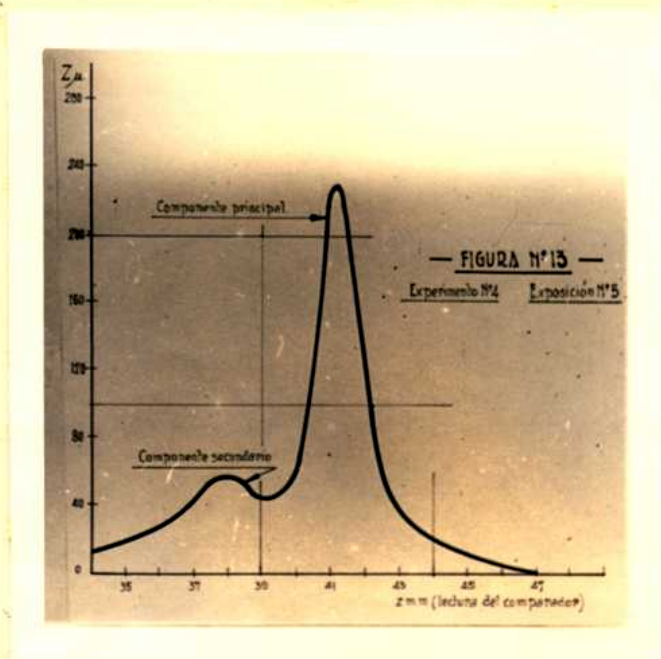
SEDIMENTACION DEL FIBRO BLANCO POR MEDIO DE EQUILIBRIO DE SEDIMENTACION

La centrífuga para equilibrios de sedimentación es mucho más sencilla que la de velocidad y en ella el rotor de eje vertical se halla directamente acoplado a un motor eléctrico de velocidad variable .-

El rotor gira en una atmósfera de hidrógeno (a presión atmosférica) dentro de una caja contenida en un termostato mantenido generalmente a 25°C.-

El sistema óptico de observación es fundamentalmente idéntico al descrito para la ultracentrífuga.-

La figura N°15 muestra el aspecto del rotor y la figura N°16 el termostato y la mayor parte del sistema óptico.-



GRABO N° 1

Experiencia N° 1.- (Figura N° 17)

Concentración de la tiroglobulina (Kjeldahl) : 2.17 gr %.

Buffer (PO₄H₂K - Na₂O.H₂ - ClNa) de pH 6.5

3.000 r.p.m. ; método de la oscila; duración del experimento 10 días; temperatura 25°C.; exposición N° 13.-

Distancia al centro de rotación. "r" cm.	"r" mm.	$\frac{\log \frac{R_2 r_1}{R_1 r_2}}{R_2^2 - R_1^2}$	$\frac{2R_1 R_2 r_1 r_2}{(R_1 - R_2)^2}$	Peso medio $\frac{100 \cdot r}{10^3}$	Peso medio promedio
5.300	.204	-----	4.78×10^6	519	441.000
5.250	.206	.11188		412	
5.200	.209	.10074		401	
5.150	.209	.10073		393	
5.100	.210	.09887		385	
5.050	.208	.09130		378	
5.000	.208	.07563		369	
4.950	.208	.06790		361	

El cálculo se efectuó como se vé por aplicación directa de la fórmula (XIV).

GRABO N° 2

Experiencia N° 2.- (Figura N° 18)

Concentración de la tiroglobulina (Kjeldahl): 1.0 gr %

Buffer (PO₄H₂K - Na₂O.H₂ - ClNa) de pH 6.5

3.000 r.p.m. ; método de las oscila; duración del experimento 10 días; temperatura 25°C.; exposición N° 13.-

Distancia al centro de rotación "r" cm	"r" mm.	$\frac{\log \frac{R_2 r_1}{R_1 r_2}}{R_2^2 - R_1^2}$	$\frac{2R_1 R_2 r_1 r_2}{(R_1 - R_2)^2}$	Peso medio $\frac{100 \cdot r}{10^3}$	Peso medio promedio
4.875	.204	-----	4.78×10^6	---	423.000
4.825	.202	.1007		396	
4.775	.202	.1032		397	
4.725	.202	.1079		399	
4.675	.202	.1054		399	

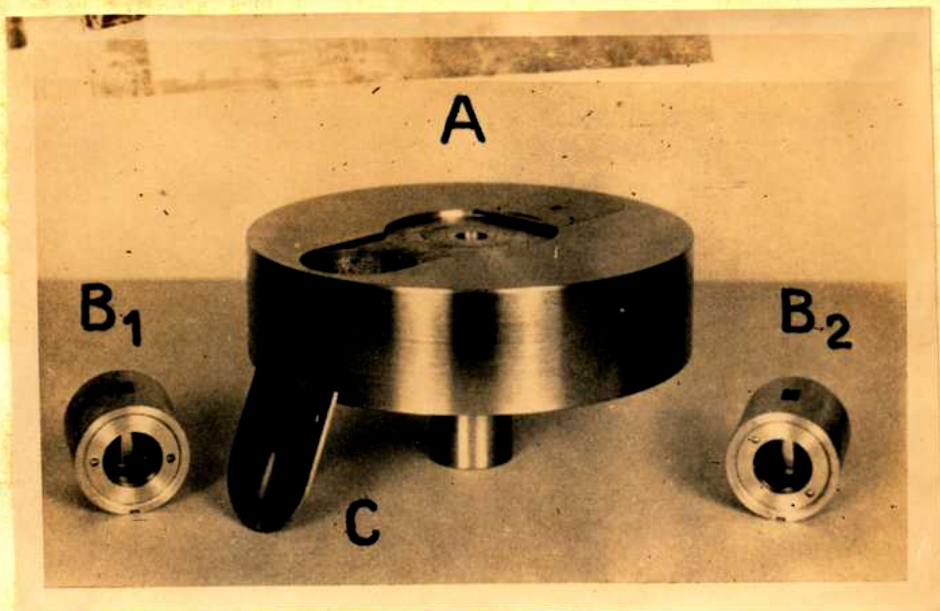


Figura N° 15
Rotor de la centrifuga para equilibrios de sedimentación
(del libro de Pedersen y Svedberg, loc. citada)

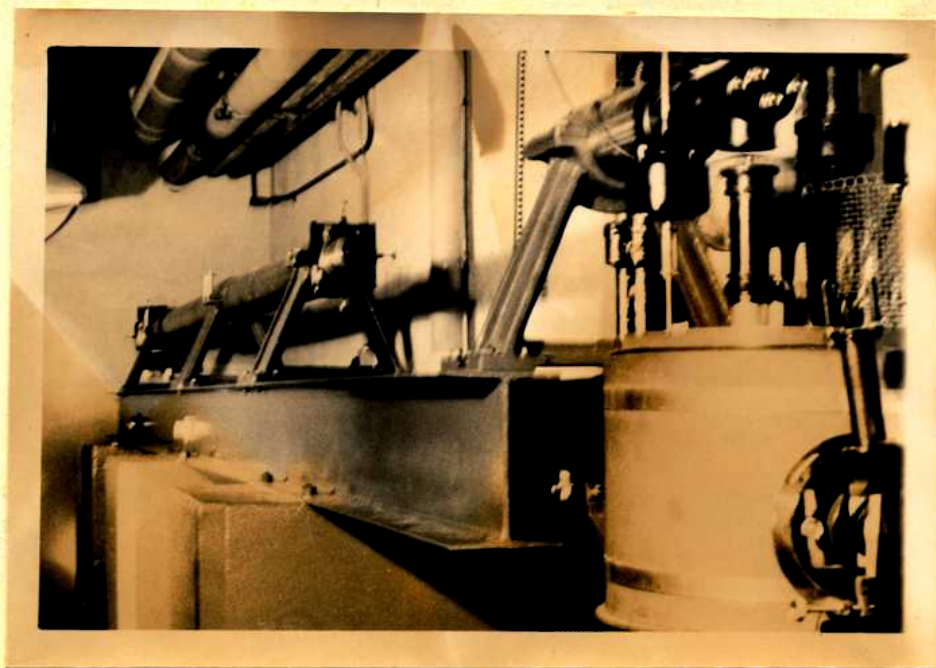


Figura N° 16
Termostato y sistema optico de la centrifuga para
equilibrios de sedimentación.

GRANDE N° I

Experiencia N° 1.-(figuras N° 19 y N° 20)

Concentración de la tiroglobulina (Kjeldahl): 0.55 gr.5

Buffer (PO4H-K - Na2HPO4 - ClNa) de pH 6.5

3.000 r.p.m. / método de la oscila; duración del experimento, 10 días; temperatura 25°C; exposición N° 12 y exposición N° 14

Distancia al cen- "r" mm. $\frac{\log \frac{r_2}{r_1} \cdot \frac{r_2}{r_1}}{r_2^2 - r_1^2}$ $\frac{4.6200r}{(1 - \nu^2)^2} \times 10^{-5}$ peso milos. Peso milos promedio

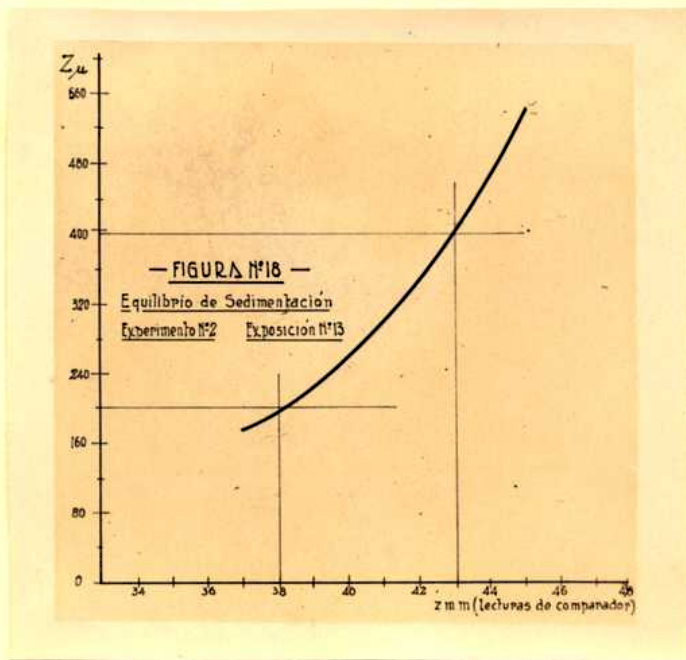
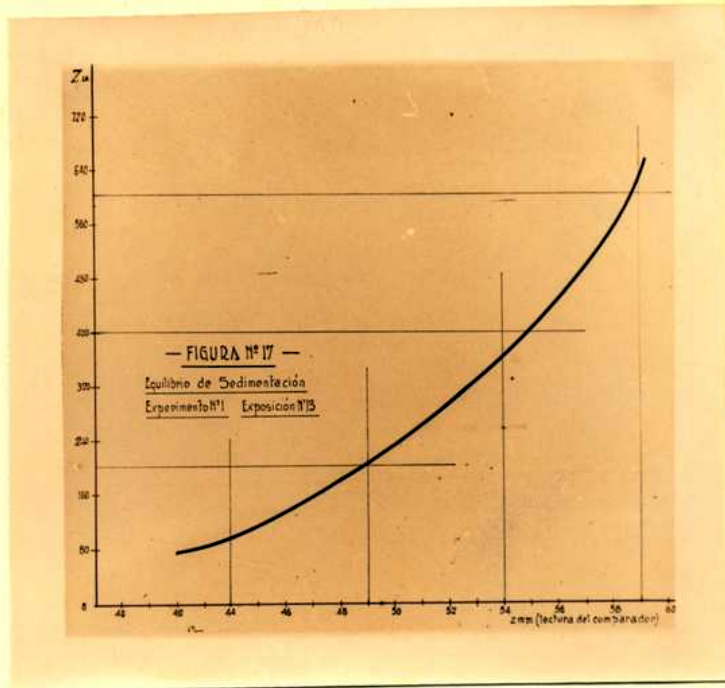
Expos. N° 12				
4.800	.170	-----	4.78×10^6	---
4.850	.198	.18808		613
4.900	.234	.17973		648
4.950	.277	.16010		670
5.000	.344	.15062		729
5.050	.409	.14100		674
.....				694.000
Expos. N° 14				
4.800	.208	-----	4.78×10^6	---
4.850	.246	.14107		676
4.900	.297	.12824		613
4.950	.348	.16093		729
5.000	.422	.15072		703
5.050	.511	.15701		731

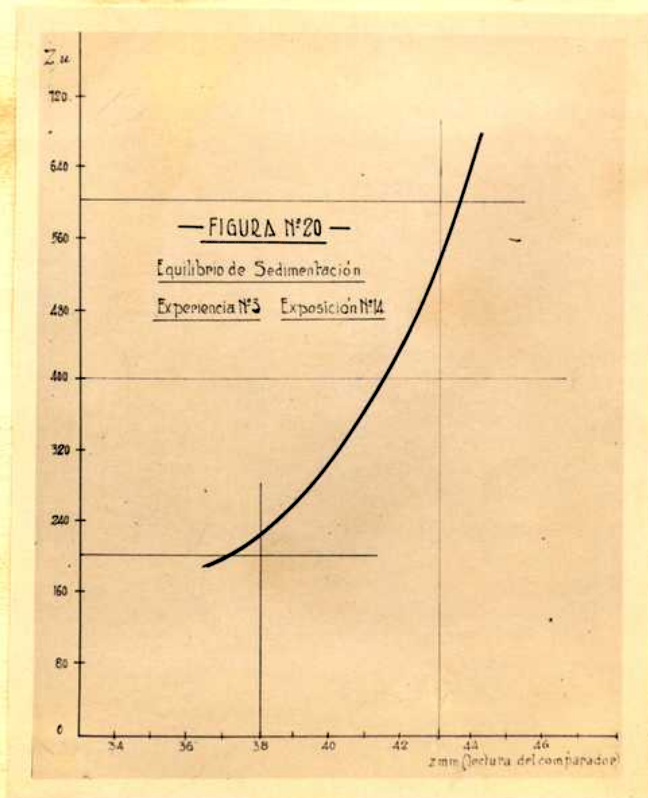
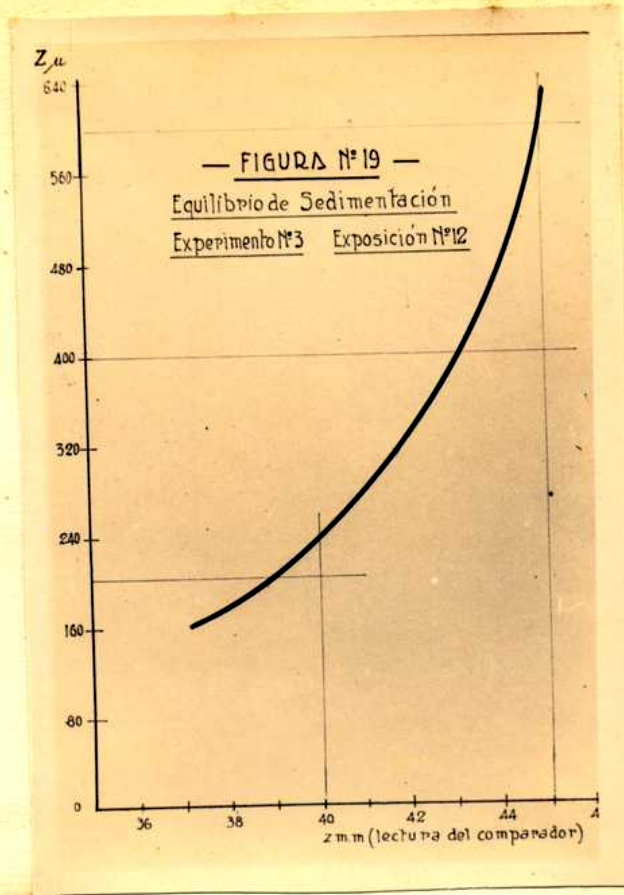
Por los datos experimentales que anteceden puede verse que los resultados que se obtienen por métodos de equilibrios de sedimentación son en general mucho menos uniformes que los de sedimentación.-

DETERMINACION DE LA CONSTANTE DE DIFUSION "D₂₀".-

Heusé utilizando la célula descrita por Lam¹ (1957) que presenta sobre la primitiva de Svedberg la ventaja de utilizar no solo cantidades mucho menores de solución (un cm³), sino que también, siendo de paredes plano paralelas, elimina el efecto de lente cilíndrica de la

(1) loc.citad.-





primera que hacía bastante trabajosa la comparación de las escalas. En la figura N°11 puede verse un esquema de la misma.-

Como en los casos anteriores se utilizó como método de observación el de la escala de Iamm.-

GRÁFICO N°11

Experiencia N°1
 Concentración de la tiroglobulina (Kjeldahl): 2.17 gr. %
 Buffer (PO₄H₂K - H₂O-H₂ - ClNa) de pH 6.3
 Método de observación de la escala; temperatura 25°C.-

Expos. N°	"A" cm ²	X x 10 ⁴ cm	"t" seg.	"D" x 10 ⁷	Factor de corr. (vis. con. y temp)	"D ₂₀ " x 10 ⁷
3	25.54 ± 20	910	60.600	3.43	0.911	3.12
4	24.47 ± 20	870	75.040	3.28		2.90
5	24.30 ± 20	760	91.900	2.89		2.63
6	26.48 ± 20	663	127.000	2.78		2.53
7	26.50 ± 20	633	140.910	2.78		2.53
8	22.61 ± 15	584	170.200	2.79		2.54

GRÁFICO N°12

Experiencia N°2
 Concentración de la tiroglobulina (Kjeldahl): 1.12 gr. %
 Buffer (PO₄H₂K - H₂O-H₂ - ClNa) de pH 6.3
 Método de observación de la escala; temperatura 25°C.-

Expos N°	"A" cm.	X x 10 ⁴ cm	"t" seg'	"D" x 10 ⁷	Factor de corr. (vis. con. y temp)	"D" x 10 ⁷
3	15.35 ± 20	660	37.300	3.12	0.911	2.84
4	21.20 ± 12	566	53.500	2.96		2.70
5	24.44 ± 12	485	75.300	2.69		2.45
7	37.44 ± 8	384	125.040	2.70		2.46
8	36.69 ± 8	355	144.400	2.74		2.50

(2) El área está expresada en forma de dos factores debido a las diversas escalas utilizadas en los gráficos.-

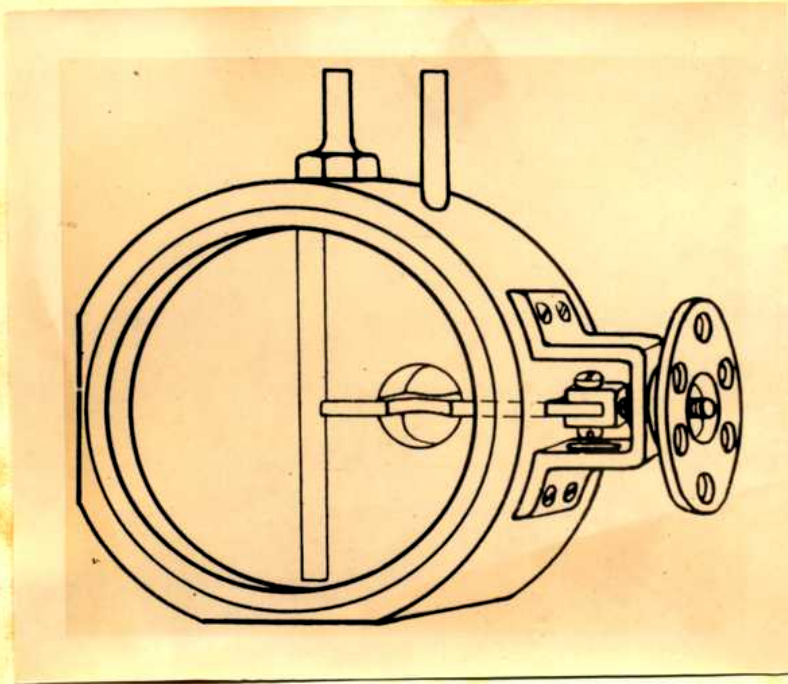
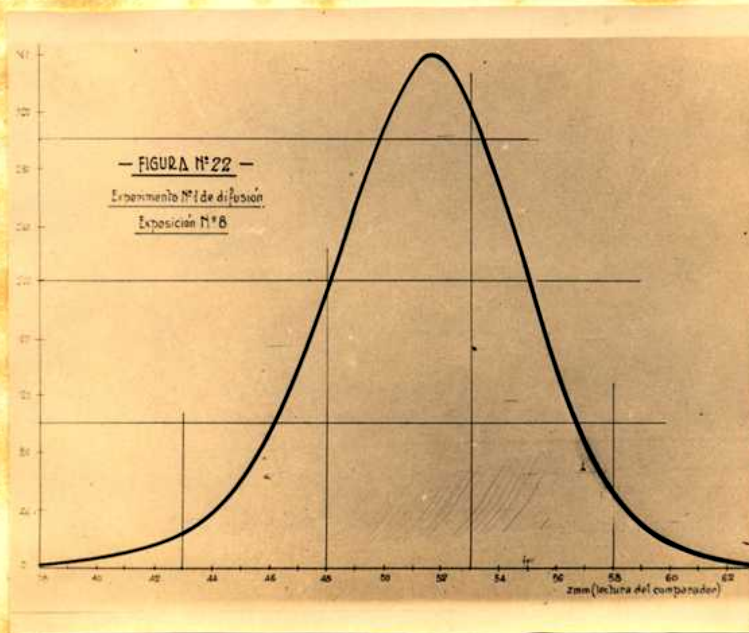
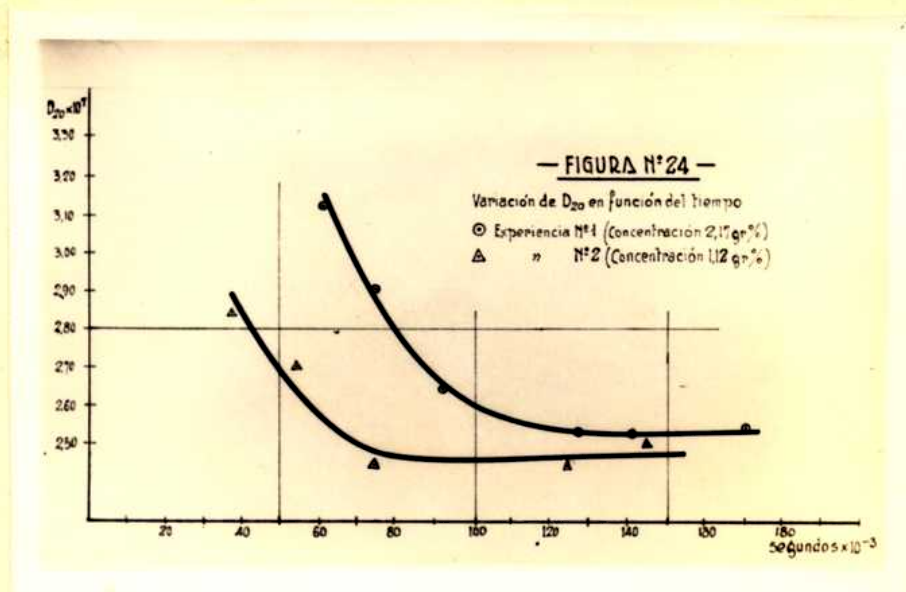
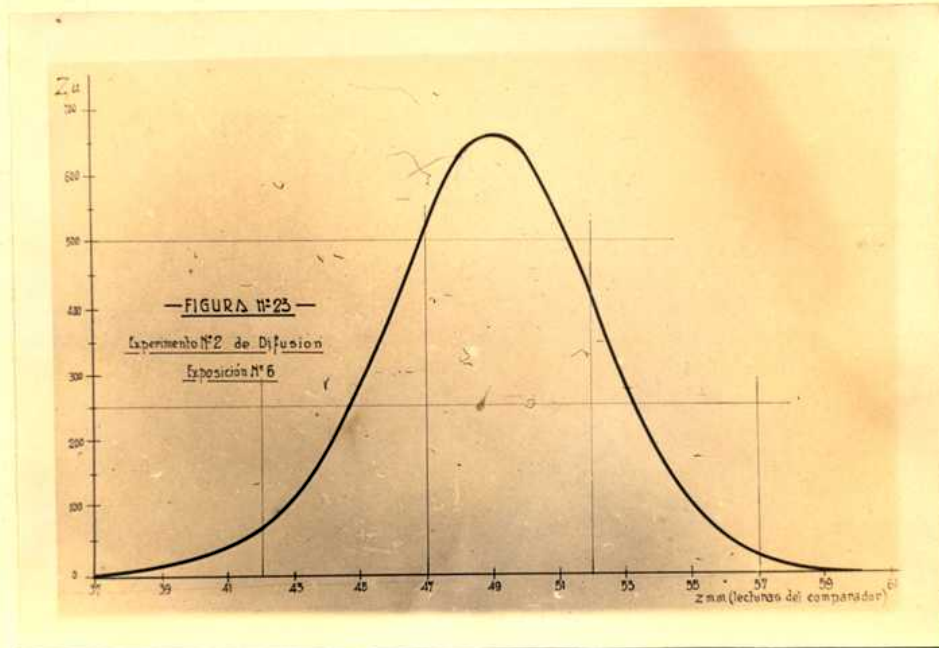


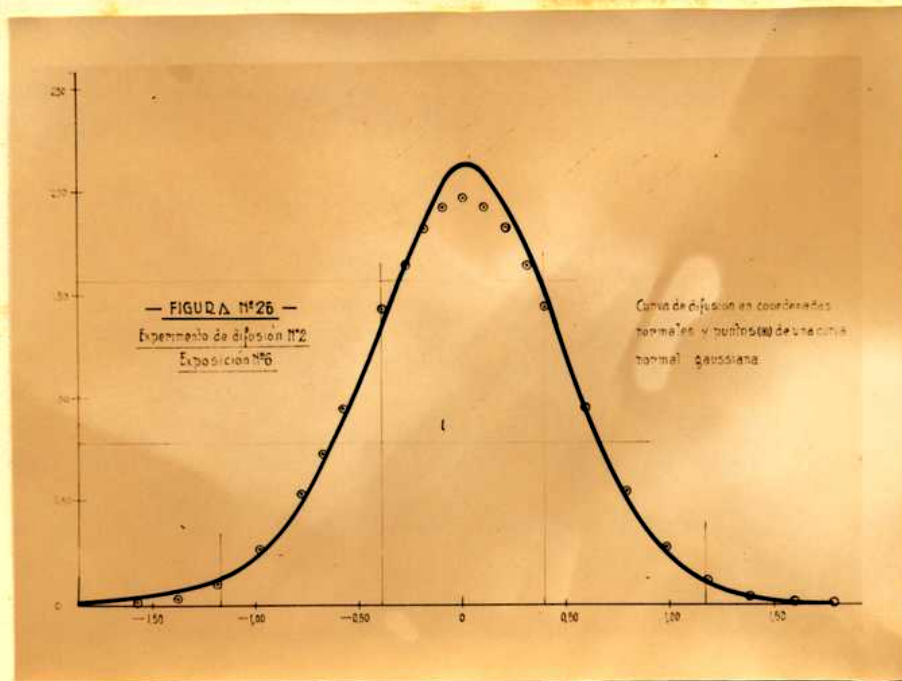
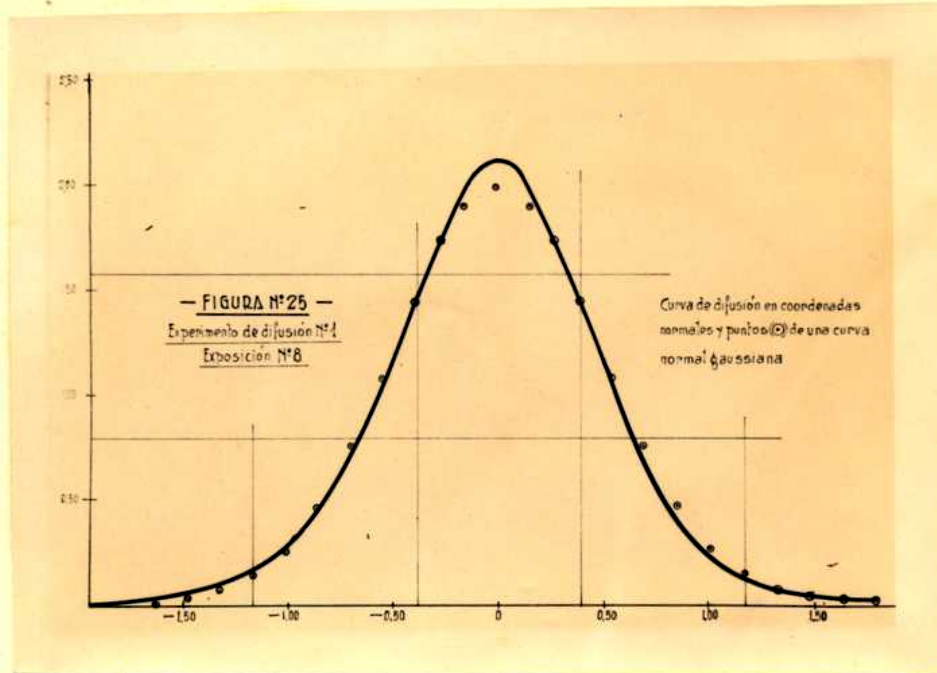
Figure N° 21
Esquema de la célula de difusión de Lamm (de Svedberg y
Rinde Ind. Eng. Chem. An. Ed. 10, 113-29 1934)





En las figuras N°22 y N°23 tenemos dos curvas experimentales clásicas de este tipo de experimentos.-

En la figura N°24 se ha representado la variación " D_{20} " en función del tiempo para ambos experimentos.-



DIFUSION DE LOS RESULTADOS.-

En primer lugar debemos consignar, como ya anticipamos, que respecto de la confirmación de la fórmula (IX') se no pudo llegar a ningún resultado definitivo; la interpretación de los resultados de las áreas de los dos componentes en términos de concentraciones, fueron tan contradictorias y sujetas a factores relativamente tan inciertos (superposición de áreas, líneas-bases mal definidas, etc.) que no fué posible deducir nada definitivo. Todos los que han tenido oportunidad de trabajar en ultracentrifugación conocen las dificultades experimentales de obtener líneas-bases buenas en los diagramas, lo cual si bien resulta secundario para el cálculo de " S_{20} " es en cambio fundamental para la determinación del área.-

Estos resultados indicarían por lo menos, que en sistemas de más de un componente, sobre todo cuando como en este caso las áreas interfieren, hay que tener mucha cautela en aventurar datos sobre concentraciones de los distintos componentes en base a las áreas medidas (caso de mezclas de proteínas de constante de sedimentación vecina o casos de estudios de cinética y equilibrios de disociación).-

El análisis de los cuadros y diagramas correspondientes a los experimentos de sedimentación muestran claramente que la tiroglobulina utilizada no es monodispersa (a pesar de las varias preparaciones y purificaciones independientes realizadas), pudiendo notarse la presencia de un componente secundario, en cantidad bastante elevada, con una constante de sedimentación bastante menor que la asignada habitualmente a la tiroglobulina (S_{20} del componente secundario alrededor de 13×10^{-13}).

La variación de la constante de sedimentación del componente principal con la concentración muestra que dentro de los límites de con-

concentraciones utilizadas, S_{20} disminuye con el aumento de "c" en forma aproximadamente lineal. La extrapolación de dicha recta para $c = 0$ conduciría a valores de S_{20} un poco más bajos que los obtenidos por Haidelberger y Svedberg(11).-

Los resultados obtenidos con la centrifuga para equilibrios de sedimentación son en general concordantes con los anteriores; se nota en efecto una notable disminución del peso molecular (\bar{M}) al aumentar la concentración. Este resultado es opuesto al obtenido por Haidelberger y Pedersen (13) en soluciones más diluidas; sin embargo conviene tener presente que corresponde a una zona de concentraciones ($c < 0.5$) que nosotros no hemos investigado. Lo que sí es evidente, es que para las concentraciones a que hemos trabajado no se puede atribuir la variación del peso molecular más a una simple disociación de la proteína, ya que dicho efecto debería mostrarse, al menos cualitativamente, en los diagramas de sedimentación donde la relación de áreas de ambas componentes es aproximadamente independiente de la concentración utilizada.-

La falta de homogeneidad de la proteína le da por supuesto un valor muy relativo al dato de peso molecular proveniente de experiencias de equilibrios de sedimentación, aún en soluciones muy diluidas.-

Finalmente los experimentos de difusión indican para esta proteína un marcado aumento de la constante D_{20} en función de la concentración.-

Es interesante hacer notar que el efecto de concentración puede reemplazarse por el efecto tiempo. Estos resultados están consignados en la figura N°24 donde puede verse que el valor límite a que tienden

ambas curvas para $t = \infty$ (que corresponde evidentemente a $c = 0$) es muy aproximadamente el mismo y sería el correspondiente al la difusión de una solución infinitamente diluida.

Este efecto del tiempo sobre D_{20} tampoco puede explicarse sobre la base exclusiva de un componente más liviano pues, como veremos enseguida, aún las últimas curvas, donde el valor de D_{20} parece haberse estabilizado, son decididamente polidispersas.-

En efecto, a objeto de comparar los diferentes métodos para el cálculo de D_{20} las expansiones $N^{\circ}8$ de la experiencia $N^{\circ}1$ y $N^{\circ}3$ de la experiencia $N^{\circ}2$ han sido también calculadas por el método de la desviación standard, tratando a la curva como curva de distribución.- Los resultados obtenidos 2.71×10^{-7} y 2.81×10^{-7} respectivamente, muestran que en general puede esperarse de este segundo procedimiento (preferido por muchos) resultados alrededor de un 10% más elevados que los obtenidos por el procedimiento de las áreas totales.-

Este método permite además comparar, mediante una conveniente transformación de variables, la curva experimental con una curva normal gaussiana y tener así una idea de la homogeneidad de la proteína utilizada. En nuestro caso como puede verse en las figuras $N^{\circ}23$ y $N^{\circ}26$ la solución es decididamente no monodispersa, cosa que por otra parte ya sabemos de nuestras experiencias de sedimentación.-

CONCLUSIONES.-

De los resultados experimentales presentados se desprende que:

- 1.- La tireoglobulina utilizada no es monodispersa.-
- 2.- La utilización del área de los diagramas de sedimentación para el cálculo de concentraciones, en caso de dos componentes con superposición de áreas, es poligrava.-

3.- La constante de sedimentación aumenta linealmente con la dilución. El valor así extrapolado daría $S_{20} = 18.8 \times 10^{-13}$

4.- Para concentraciones no menores del 0.2% los resultados de peso molecular por medidas de equilibrios de sedimentación muestra resultados concordantes con los de sedimentación.-

5.- La constante de difusión cae con el aumento de la dilución (a igualdad de tiempo) y también al aumentar el tiempo (para una dada concentración); para tiempos suficientemente largos tiende a un valor de $D_{20} = 1.50 \times 10^{-7}$ independiente de la concentración inicial.-

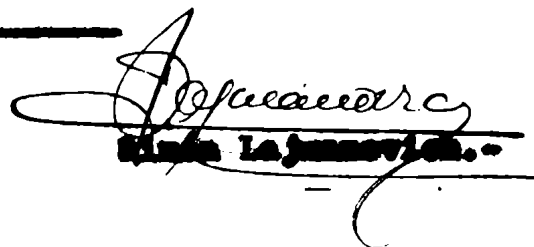
RESUMEN.-

1.- Mediante la utilización de la ultracentrífuga a aceite "tipo Svedberg" se ha estudiado las variaciones de la constante de sedimentación de la tireoglobulina sobre un amplio límite de concentraciones; S_{20} aumenta linealmente con la dilución.-

2.- Usando la centrífuga para equilibrios de sedimentación se determinó la variación del peso molecular de la tireoglobulina con la concentración; el peso molecular determinado, baja considerablemente al aumentar la concentración.-

3.- Experiencias de difusión realizadas con la citada proteína utilizando la célula de Lamm, indicaron que D_{20} aumenta con la dilución y el tiempo de difusión, tendiendo a un límite.-

4.- En capítulos previos a la parte experimental se describe sumariamente la teoría de los métodos utilizados.-


Simón Lajmanovich.-

BIBLIOGRAFIA

Libros generales consultados:-

Svedberg and Pedersen:- "The Ultracentrifuge"-1940.

Perrin:- "Les Atomes" Yema.Ed.

Schmid:- "Chemistry of the Amino Acids and Proteins".

Lamm:- "Measurements of concentration gradients in Sedimentation and Diffusion by refraction methods"-Upsala, 1937.-

Lanning:- "Détermination des poids moléculaires; Mémoires de N.N. Avogadro, etc... (Les Classiques de la découverte scientifique) 1938.-

Trabajos citados

- (1) Svedberg and Rinde:-J. Am. Chem. Soc. 26, 2677-93 (1904).
 - (2) Veigt:-Ann. Ges. Physik. u. Chem. 206-227 (1897)
 - (3) Wiener:-Ann. Ges. Physik. u. Chem. N.F. 20, 105 (1893)
 - (4) Thevert:-Ann. de Chim. et Phys. pag. 750 (1902)
 - (5) Thevert:-Ann. de Chim. et Phys. pag. 759 (1914)
 - (6) Lamm:-Z. Physik. Chem. A. 138, 513 (1928)
 - (7) Ficoline u. Gross:-Koll. Z. 66, 12 (1934)
 - (8) Barthrop and Anson:-J. of Gen. Physiol. 12, 933 (1939)
 - (9) Lanning and Kramer:-J. Am. Chem. Soc. 58, 1471-3 (1936)
 - (10) Williams J.W. and Gady:-Chem. Rev. 14, 171 (1934)
 - (11) Heidelberger and Svedberg:-Science 29, 414 (1934)
 - (12) Bauer and Fickels:-J. of Exper. Med. 25, 563-66 (1937)
 - (13) Heidelberger and Pedersen:-J. of Gen. Physiol. 12, 95-108 (1935)
 - (14) Lundgren:-Nature 134, 122 (1936)
 - (15) Polson:-Koll. Z. 77, 109-31 (1939)
 - (16) Svedberg:-Ind. and Eng. Chem. (An. Ed.) 12, 113-29 (1924)
-