

## Tesis de Posgrado

# Modificación del método de Harkins - Anderson y su aplicación al estudio de proteínas nucleares : determinación de espesores de films de proteínas

Sirotzky, Susana L.

1951

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:

Sirotzky, Susana L.. (1951). Modificación del método de Harkins - Anderson y su aplicación al estudio de proteínas nucleares : determinación de espesores de films de proteínas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_0676\\_Sirotzky.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0676_Sirotzky.pdf)

#### Cita tipo Chicago:

Sirotzky, Susana L.. "Modificación del método de Harkins - Anderson y su aplicación al estudio de proteínas nucleares : determinación de espesores de films de proteínas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1951.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_0676\\_Sirotzky.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0676_Sirotzky.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FISICAS Y NATURALES

MODIFICACION DEL METODO DE HARKINS-ANDERSON Y SU APLICACION AL ESTUDIO  
DE PROTEINAS NUCLEARES. DETERMINACION DE ESPESORES DE FILMS DE PROTEI-  
NAS.

Tesis presentada por

SUSANA L. SIROTZKY

TESIS: 000

para optar al título de Doctor en Química

1951

---

Deseo expresar mi agradecimiento al Dr. N. Mittelman por su constante ayuda y consejos, como así también a los Sres. Varela y J. Ciarrapico, cuya eficaz y valiosa colaboración técnica ha hecho posible el montaje y construcción del instrumental empleado en el presente trabajo.

*El trabajo ha sido realizado en el Laboratorio de Fisicoquímica*

I) CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE METODOS DE CARACTERIZACION DE FILMS DE PROTEINAS

A) Propiedades de films. Métodos de estudio.

Desde los primeros trabajos de Pockels y Rayleigh (1,2) realizados a fines del siglo pasado, ha existido un interés siempre renovado por el estudio de los films superficiales monomoleculares. Dicho interés se explica si se tiene en cuenta que con instrumentos relativamente sencillos puede obtenerse amplia información en lo que se refiere a dimensiones, forma, estructura de las moléculas, y, en algunos casos, peso molecular de la sustancia estudiada por este método.

Los films superficiales tienen efectos medibles sobre las propiedades mecánicas, eléctricas y ópticas de una superficie, lo que permite el empleo de diversos métodos para su estudio y caracterización. Ellos son:

1) Determinación de presiones superficiales: (3,4) consiste en la medición de la fuerza que se ejerce sobre una barrera que actúa confinando el film dentro de un área definida de la superficie.

2) Medición de potenciales superficiales: (3) Se entiende por potencial superficial la variación del potencial de contacto entre un líquido y el aire ocasionada por la presencia de un film. El dispositivo de medida consta de un electrodo móvil colocado sobre el film, un electrodo reversible sumergido en el líquido sobre el que se ha extendido el mismo (sustrato) y un circuito externo apropiado que permite la medida de la diferencia de potencial entre el aire y la solución (5, 6, 7, 8). El potencial superficial queda definido por la diferencia entre la f.e.m. de la célula con la superficie cubierta por un film y la f.e.m. obtenida con una superficie limpia de líquido.

3) Métodos ópticos: consisten en la medida de la elipticidad de la luz reflejada por superficies cubiertas por films. (9,10,11).

4) Determinación de viscosidad de films. Se determina la caída de presión superficial en función del tiempo, que tiene lugar cuando el film fluye a través de un pequeño canal (3).

Es de hacer notar la importancia cada vez mayor que tiene en biología el estudio de los sistemas bidimensionales, consecuencia de la gran extensión de interfaces existente en los seres vivos, debido al pequeño tamaño de la célula, unidad estructural básica de los organismos vivientes. (12) A este respecto ha sido llevado a cabo un considerable número de trabajos con el objeto de dilucidar como son afectados distintos sistemas biológicos por el proceso de extensión en interfases. Los estudios incluyen experiencias con films de proteínas, enzimas, hormonas, esteroides, sistemas inmunológicos y diversas investigaciones sobre la actividad fisiológica de films.

En el presente trabajo se estudian algunas propiedades de films de proteínas, por lo que todas las consideraciones que siguen se referirán especialmente a este tipo de films.

B) Medición de presiones superficiales. Balanzas superficiales. Balanza horizontal y vertical.

El método más valioso para el estudio de las propiedades de films monomoleculares es el que hace uso de las balanzas superficiales para la obtención de diagramas de presión superficial en función del área del film; entendiéndose por balanza superficial todo dispositivo que permita determinar la diferencia entre las tensiones superficiales del sustrato utilizado ( $\gamma_0$ ) y la correspondiente al mismo cuando su superficie se halla cubierta por el film en estudio ( $\gamma_f$ ) (13). Dicha diferencia de tensiones se denomina presión superficial y queda definida por

$$F = \gamma_0 - \gamma_f$$

La técnica original utilizada por Langmuir (14) para la medición de presiones superficiales consistía en el empleo de una cubeta rectangular provista de dos barreras, una fija y otra móvil, que separaban un área de superficie limpia de otra cubierta por el film. El área disponible para el film podía aumentarse o disminuirse a voluntad variando la posición de la barrera fija; el valor de la misma podía determinarse luego por lectura en una escala adosada a un lado de la cubeta. La presión superficial que debía ser determinada por la fuerza que era necesario aplicar para mantener la barrera móvil en su posición inicial, expresándose los resultados como áreas por molécula (en  $A^2$ ) para cada presión. Este principio es común a todos los tipos de balanza horizontal superficial usados en el presente. Los detalles más importantes que deben ser tomados en cuenta con el fin de obtener una buena precisión son los siguientes:

a) Las barreras empleadas para limitar el film deben impedir cualquier pérdida de sustancia por pasaje a través de los extremos de las mismas, y éstas deben ser lo suficientemente pesadas como para no desplazarse espontáneamente bajo la acción de la presión superficial.

b) Debe disponerse de un método suficientemente sensible para la medición de la fuerza que actúa sobre la barrera.

c) Todo el aparato debe hallarse tan limpio como sea posible, debiendo disponerse de algún dispositivo que permita determinar el grado de contaminación superficial.

d) Debe determinarse con la mayor precisión posible la cantidad de sustancia empleada para formar el film.

Este tipo de balanza ha sido modificado por Adam (3), Adam y Jessop (15) y Harkins y Myers (16).

Las objeciones que pueden hacerse a este método son las siguientes: Cuando se comprime el film es difícil evitar pérdidas por los extremos de

---

la barrera móvil; se han propuesto diversas modificaciones para salvar este inconveniente, pero el problema no ha sido totalmente resuelto.

La balanza en su forma standard es poco sensible, y las modificaciones que son necesarias para conferirle alta precisión hacen de ella un aparato cuyo costo y dificultades de construcción la hacen difícilmente accesible. Es difícil evitar el empleo de metales en su construcción, lo que la hace inapta para el estudio del efecto de los iones metálicos sobre las propiedades de films.

Es difícil adaptar este instrumento para la compresión continua de los films, lo que es de particular importancia en el estudio de ácidos grasos superiores y ciertos tipos de compuestos que exhiben un reordenamiento marcado durante la compresión.

El problema consistía entonces en hallar un método diferencial; es decir que diera directamente como el anterior la diferencia  $F$  entre las tensiones del líquido limpio y cubierto por film, y que no presentara los inconvenientes señalados. Resultó promisorio en este sentido los resultados obtenidos empleando una modificación del método de Wilhelmy (17) para la determinación de tensiones superficiales. Su uso fué iniciado por Dervichian (18), correspondiendo a Harkins y Anderson la elaboración teórica del mismo (19).

El método se conoce con el nombre de balanza vertical, ya que en él se mide el empuje vertical que actúa sobre una lámina parcialmente sumergida en el líquido cubierto por el film, y presenta, además de su simplicidad, las siguientes ventajas:

Puede evitarse fácilmente el contacto de metales con el film en estudio, empleando por ejemplo cubetas y barreras de cuarzo.

Puede adaptarse un dispositivo automático de operación y "recording", tal como ha sido hecho por Dervichian.

---

Puede modificarse el sistema de modo de permitir la compresión continua del film.

Descripción y teoría de la balanza vertical. (19)

El método de Wilhelmy para la determinación de tensiones superficiales consiste en medir directamente por medio de una balanza el empuje ejercido por la superficie del líquido sobre el perímetro de un cuerpo tal como un portaobjetos, colocado vertical y parcialmente sumergido en dicho líquido. Si  $w$  es el ancho de la lámina y  $t$  su espesor, su perímetro será igual a  $2(t+w)$ . Además, si  $\vartheta$  es el ángulo de contacto y  $\gamma$  la tensión superficial, la fuerza vertical debida a la acción de la tensión superficial sobre la lámina será  $2\gamma(t+w)\cos\vartheta$ . A su vez, el empuje de Arquímedes, es igual a  $-g\rho ltw$ ; donde  $g$  es la aceleración de la gravedad,  $\rho$  la densidad del líquido, y  $l$  la longitud de la lámina sumergida en el mismo. Si llamamos ahora  $W$  al peso total de la lámina seca y  $G$  al peso aparente de la lámina parcialmente sumergida, se tiene la siguiente ecuación, válida para el estado de equilibrio:

$$gG = gW + 2\gamma(t+w)\cos\vartheta - g\rho ltw \quad (1)$$

En muchos casos  $\vartheta = 0$ , y entonces la ecuación (1) puede escribirse en la forma siguiente

$$\gamma = \frac{g(G - W + \rho ltw)}{2(t+w)} \quad (2)$$

Como control de la precisión del método, Harkins y Anderson determinaron las tensiones superficiales de agua y benceno a 25°C, encontrando una buena concordancia con los datos tabulados. Con el fin de eliminar el término en el que figura  $l$ , se tomó como posición de cero la correspondiente a  $l = 0$ , es decir, aquella en que el borde inferior de la lámina se encuentra exactamente en la superficie del líquido.



Este método puede modificarse fácilmente de modo de permitir la determinación de presiones superficiales. Es necesario disponer para ello de una cubeta de dimensiones apropiadas, ya sea de cuarzo, vidrio Pyrex o metal, cuyas paredes se parafinan. El film queda limitado por las dos paredes laterales de la cubeta y una barrera de cuarzo o vidrio Pyrex en cada extremo; una de estas barreras puede desplazarse y permite comprimir el film. Sobre la cubeta va montada una balanza analítica a cadena en la que un platillo ha sido reemplazado por una varilla fina de aluminio que atraviesa el piso de la balanza y de la que cuelga la lámina de vidrio que se sumerge en el líquido.

En el dispositivo de Harkins-Anderson las desviaciones del fiel de la balanza podían leerse en una escala mediante la observación de la posición de un rayo de luz reflejado en un espejo de galvanómetro unido a aquél. La lectura inicial en la escala, o sea el cero de la misma, corresponde a la posición obtenida con la lámina parcialmente sumergida en el agua limpia, o en el sustrato de que se trate. Se deposita entonces mediante un método adecuado el film que se va a estudiar, comprimiendo luego por medio de una de las barreras. Esto origina una disminución de la tensión superficial, y por consiguiente el ascenso de la lámina y la desviación del fiel de la balanza. Esta desviación es proporcional a la presión superficial  $F = -\Delta\gamma = \gamma_0 - \gamma_F$ , como se deduce de las consideraciones siguientes.

De la ecuación (1) puede escribirse cuando  $\theta = 0$

$$g \Delta G = 2(t+w) \Delta \gamma - g \rho t w \Delta l \quad (3)$$

Por lo tanto, si el peso se mantiene constante ( $\Delta G = 0$ ) la variación de tensión superficial  $\Delta \gamma$  será proporcional a la variación de la longitud  $\Delta l$  a la cual está sumergida la lámina, la que puede ser medida directa-

---

mente por medio de un catetómetro (Caso I), o bien puede resultar conveniente montar, como ya se dijo, un espejo de galvanómetro en el fiel de la balanza y observar las desviaciones de este último por medio de un sistema de escala y espejo. Para pequeñas desviaciones del fiel se verifica experimentalmente que  $\Delta l$  es proporcional a  $\Delta S$ , la variación de lectura en la escala.

Se tiene entonces

$$g \Delta G = 2 (t+w) \Delta \gamma - k \Delta S \quad (4)$$

en que  $k$  es el factor de proporcionalidad.

Cuando la balanza es empleada en esta última forma, su calibración consiste en la determinación del factor de proporcionalidad  $k$ , mediante la lectura de las desviaciones  $\Delta S$  correspondientes a variaciones conocidas de  $\Delta G$  obtenidas mediante el agregado de pesas con la lámina parcialmente sumergida en agua ( $\Delta \gamma = 0$ ). En este caso es válida la relación

$$k = -g \Delta G / \Delta S \quad (5)$$

Harkins y Anderson encontraron que para el intervalo de desviaciones empleado se obtenía para  $k$  un valor constante, dentro de los límites de los errores experimentales. Con el valor de  $k$  pueden hallarse las disminuciones de tensión superficial producidas por la extensión o compresión de un film, manteniendo constante el peso aparente  $G$  ( $\Delta G = 0$ ) y leyendo las desviaciones  $\Delta S$  del fiel (Caso II). La ecuación que permite calcular  $\Delta \gamma$  es entonces

$$\Delta \gamma = k \Delta S / 2 (t+w) \quad (6)$$

Con láminas anchas de vidrio del espesor de un cubreobjetos pueden medirse presiones superficiales de 0.003 dina/cm; empleando láminas más delgadas pueden detectarse variaciones del orden de 0.001 dina/cm (13, 20).

Los dos métodos mencionados (Casos I y II), operan a  $\Delta G = 0$  ( $G$  cons-

tante) y miden en una u otra forma la desviación del fiel de la balanza. Otra posibilidad operativa, de la que no hemos encontrado referencia de su aplicación en la literatura, y que hemos desarrollado en este trabajo, consiste en mantener constante la altura  $l$  a la cual se halla sumergida la lámina ( $\Delta l = 0$ ), y variar  $G$  en forma de mantener constante la posición de equilibrio de la balanza. En ese caso, y si se cumple además que sea nulo el ángulo de contacto, la ecuación (3) se transforma en

$$\Delta X = \frac{y \Delta G}{2(t+w)} \quad (7) \text{ (Caso III)}$$

En caso contrario debe incluirse en las fórmulas el término en el que figura  $\cos \theta$ .

El procedimiento experimental impone la necesidad de poder variar en forma monótona la masa  $G$ , lo que se consigue mediante el empleo de una balanza chainomática.

Para asegurar la existencia de un ángulo de contacto nulo debe procederse a una limpieza rigurosa de las láminas, tratando además que el movimiento de las mismas sea siempre ascendente (Casos I y II), lo que corresponde a la compresión del film, ya que en esa forma se asegura el contacto entre una superficie fresca de vidrio con el líquido, en tanto que el movimiento en sentido contrario favorecería la contaminación de la lámina por el film existente en la superficie. En el Caso III deben limitarse las oscilaciones del fiel alrededor de la posición de equilibrio por medio de un dispositivo adecuado. La existencia de un ángulo de contacto nulo puede en general detectarse por simple observación del menisco.

Las ventajas de este tipo de balanza vertical sobre las balanzas horizontales comunes son las siguientes:

- 1) Para una dada precisión su costo es mucho menor.
  - 2) Es mucho más simple y puede ser instalada fácilmente, ya que con una
-

balanza común y un cubreobjetos pueden obtenerse resultados de alta precisión.

3) Es especialmente indicada, como ya ha sido señalado, para el estudio del efecto de pequeñas cantidades de iones metálicos sobre films.

4) Puede emplearse para la determinación de presiones superficiales de films solubles.

#### Curvas F-A obtenidas con estos métodos (Para films de proteínas).

Cuando se comprime un film de proteína la presión superficial ejercida por el mismo aumenta, y el trazado del gráfico de ésta (en dina/cm) en función del área ocupada por el film da origen a un tipo característico de curva. El estudio de dichas curvas revela la existencia de una zona a bajas presiones, en que la presión aumenta lentamente con la disminución de área, pasándose gradualmente a otra región en que F aumenta mucho más rápidamente para una dada compresión; la transición entre ambas zonas se produce generalmente entre 1 y 5 dinas/cm. La curva presenta luego un tramo lineal de pendiente negativa alta, existiendo además un punto de inflexión a una presión de 20 dina/cm aproximadamente.

Arbitrariamente, y con el solo objeto de facilitar su descripción, suele dividirse estas curvas en dos regiones (21, 22): una región de bajas presiones, correspondiente a valores de F inferiores a 1 dina/cm, y otra región de altas presiones para valores de F superiores al mencionado.

a) Región de bajas presiones: A presiones inferiores a 1 dina/cm los films de proteínas presentan todas las características de los films gaseosos, habiendo encontrado Bull para la ovoalbúmina,  $\beta$ -lactoglobulina y zeína que la presión superficial es una función inversa y continua del área del film, independientemente de la extensión de las áreas consideradas. Si se representa además el producto FA en función de F se obtiene u-

---

na relación lineal (20, 21, 22). Parece ser que Guastalla (23) fué el primero en observar que los films de proteínas pueden ser gaseosos en la región de bajas presiones, y también en calcular el peso molecular de algunas proteínas a partir de datos obtenidos mediante medida de presiones superficiales.

Un gas bidimensional difiere de los tridimensionales en que posee dos grados de libertad en lugar de tres. Puede demostrarse a partir de la teoría cinética (15, 31) que un film gaseoso que obedece las leyes de los gases ideales cumple la relación

$$FA = nRT \quad (8)$$

donde R es la constante de los gases; n el número de moles de gas, T la temperatura absoluta, F la presión superficial en dinas/cm y A el área del film en  $\text{cm}^2$ . Evidentemente n es igual a  $W/M$ , siendo W el peso del film en gramos y M el peso molecular de la sustancia que forma el film.

Para gases bidimensionales reales puede escribirse, en analogía formal con la ecuación de Van der Waals

$$(F + a/A^2) (A-b) = RT \quad (9)$$

a es una constante en la que están involucradas las fuerzas de atracción entre las moléculas, y b otra constante proporcional al área ocupada por las moléculas de gas. En efecto, se ha encontrado que un cierto número de films gaseosos exhiben un mínimo en la curva  $FA = f(F)$  (3), en la misma forma que los gases reales presentan un mínimo en la curva  $PV = f(P)$ , lo que indica la necesidad del empleo de una ecuación de Van der Waals superficial para describir el comportamiento de tales films. Sin embargo, para las proteínas estudiadas, excepto quizás en el caso de la zeína, no se han encontrado tales mínimos, lo que indicaría que las fuerzas de atracción entre las moléculas que forman el film son despreciables.

Bull propone para films de proteínas a presiones inferiores a una dina la ecuación empírica de estado

---

$$FA = \alpha F + \beta \quad (10)$$

siendo  $F$  la presión superficial en dina/cm y  $A$  el área ocupada por el film en  $m^2/mg$ .  $\alpha$  y  $\beta$  son constantes cuya naturaleza puede inferirse de las consideraciones siguientes (20).

Si  $a_0$  es la actividad del agua en el seno del líquido y  $a$  la correspondiente a la superficie limpia de agua, el aumento de área proveniente del traslado de un mol de agua del seno del líquido a la superficie está acompañado por una variación de energía libre

$$F = A_1 \gamma_0 - RT \ln a/a_0 \quad (11)$$

$A_1$  es el área ocupada por un mol de agua,  $\gamma_0$  la tensión superficial del agua,  $R$  la constante de los gases y  $T$  la temperatura absoluta. La correspondiente variación de energía libre para una superficie que contiene  $n_2$  moles de proteína extendida es

$$F_1 = A_1 \gamma_1 = RT \ln a_1/a_0 \quad (12)$$

siendo  $a_1$  la actividad del agua en la superficie que contiene la proteína extendida. Restando la ecuación (12) de la (11) se tiene

$$A_1 (\gamma_0 - \gamma_1) = FA_1 = RT \ln a/a_1 \quad (13)$$

donde  $F$  es la presión superficial.

Ahora bien, aproximadamente  $a/a_1 = N/N_1$ , siendo  $N$  la fracción molar del agua en la superficie limpia ( $N = 1$ ) y  $N_1$  la fracción molar del agua en la superficie que contiene el film. Por lo tanto

$$FA_1 = RT \ln N/N_1 = -RT \ln N_1 = -RT \ln (1-N_2)$$

o bien

$$FA_1 = -RT \ln (1 - n_2/n_1 + n_2)$$

Pero como  $n_1 \gg n_2$ , desarrollando en serie y ordenando se obtiene

$$n_1 A_1 F = n_2 RT$$

Evidentemente  $A_1 n_1$  es el área ocupada por el agua, pudiendo escribirse

$$n_1 A_1 = A + n_2 S_p$$

donde A es el área total de la superficie y  $S_p$  el área ocupada por un mol de proteína. Resulta así

$$(A - n_2 S_p) F = n_2 RT$$

o finalmente

$$FA = (n_2 S_p) F + n_2 RT \quad (14)$$

Esta ecuación es formalmente idéntica a la 10, siendo  $\alpha = n_2 S_p$  y  $\beta = n_2 RT$ . Si se representa gráficamente  $FA = f(F)$ , el valor extrapolado a  $F = 0$  da el valor límite  $\beta$  de FA en condiciones en que se cumplen las leyes de los gases ideales. Se tiene entonces

$$(FA)_{F=0} = \beta = n_2 RT = \frac{G_2}{M_2} RT$$

Es decir

$$\left( F \frac{A}{G_2} \right)_{F=0} = \frac{RT}{M_2} = \frac{8.31 \times 298 \times 10^7}{M_2} \left( \frac{\text{din} \cdot \text{cm}}{\text{g}} \right)$$

cuando A se expresa en  $\text{cm}^2$  y  $G_2$  en gramos. Si en cambio  $A'$  y  $G_2'$  representan los valores en  $\text{m}^2$  y  $\text{ng}$  respectivamente

$$F \left( \frac{A'}{G_2'} \frac{10^4}{10^9} \right)_{F=0} = \beta = \frac{8.31 \times 298 \times 10^7}{M_2}$$

$$F \left( \frac{A'}{G_2'} \right)_{F=0} = \frac{24.6 \times 10^2}{M_2}$$

Llamando  $A^I$  al área expresada en  $\text{m}^2/\text{ng}$  la expresión anterior se transforma en

$$(F A^I)_{F=0} = \beta = \frac{24.6 \times 10^2}{M_2} \quad (15)$$

Dividiendo la ecuación (14) por F se observa que  $n_2 S_p$  es el área del film gaseoso a presiones superficiales muy grandes, lo que permite calcular el área ocupada por las moléculas del film gaseoso en su estado no comprimido.

Trabajos más recientes de Bull (20) indican sin embargo que a presiones muy bajas las curvas  $FA = f(F)$  no son lineales, y que la linealidad respec-

vece nuevamente a presiones superiores a un cierto valor. La extrapolación de ambos tramos rectos conduce al mismo valor del peso molecular, de modo que las consideraciones anteriores continúan siendo válidas. El fenómeno se interpreta suponiendo que a muy bajas presiones  $S_p$  es función de la presión superficial.

b) Región de altas presiones. A medida que aumenta la compresión los films de proteínas experimentan cambios semejantes a los que se observan cuando se concentra gradualmente una solución diluida de proteína, es decir, la solución se va haciendo cada vez más viscosa hasta que finalmente gelifica. Del mismo modo, los films de proteínas no experimentan verdaderos cambios de fase al disminuir el área y aumentar la presión superficial, sino que pasan gradualmente del estado gaseoso a otro con propiedades de gel. Se ha encontrado asimismo que todas las proteínas estudiadas se comportan en forma muy similar en la región comprendida entre 1 y 20 dinas/cm, lo que se explica teniendo en cuenta que todas ellas se hallan formadas por aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos; como el peso molecular medio de estos aminoácidos no presenta grandes variaciones, se comprende que los residuos de aminoácidos de las distintas proteínas ocupen sustancialmente la misma área a altas presiones superficiales.

Gortor trató de caracterizar el área ocupada por un film a altas compresiones por lo que llamó área límite, obtenida por extrapolación a presión cero del tramo recto de la curva  $F = f(A)$ . El área límite resulta ser generalmente de alrededor de  $1 \text{ m}^2$  por mg de proteína. Aunque este método proporciona datos que son útiles para fines de comparación, pueden hacerse al respecto varias objeciones: 1) Las curvas  $F = f(A)$  son sólo aproximadamente lineales, de modo que la extrapolación de la parte "lineal" resulta ambigua; 2) Las áreas obtenidas son mucho mayores que las halladas

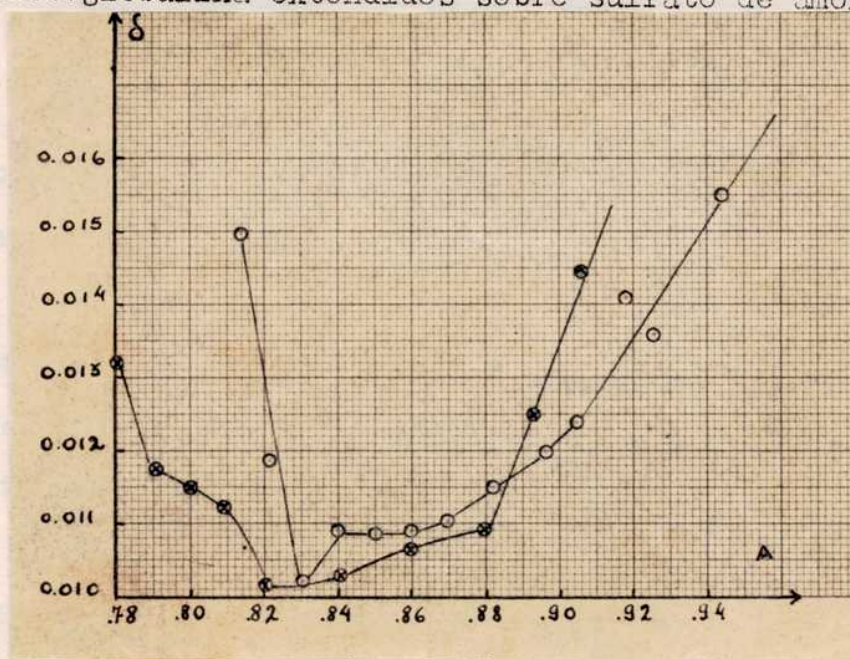
---



en experiencias de difracción de rayos X; 3) Dicha extrapolación no tiene ninguna justificación desde el punto de vista físico. Es por esto que diversos autores (25, 26, 27) han propuesto el empleo del coeficiente de compresibilidad para la caracterización de films en esta región. Dicho coeficiente queda definido por

$$\delta = \frac{1}{A} \frac{dA}{dF}$$

A se expresa en m<sup>2</sup>/mg y F en dina/cm. Cuando se traza el gráfico de  $\delta$  en función del área del film, se observa generalmente un mínimo bien definido que permite obtener sin ambigüedades el área y la presión correspondientes al punto de mínima compresibilidad. La figura adjunta muestra las curvas de compresibilidad para films de ovoalbúmina (círculos llenos) y para  $\beta$ -lactoglobulina extendidos sobre sulfato de amonio 35%. (22)



Parece lógico suponer que el área así obtenida corresponde a la menor área a la cual puede comprimirse el film sin que se produzca colapso parcial del mismo, lo que se ve apoyado por el hecho de que los valores así hallados muestran buena concordancia con los obtenidos por rayos x. Si se comprime el film a áreas menores que esta área crítica, los valores

obtenidos para la presión dependen del tiempo, siendo mucho más insegura su determinación.

En la Tabla adjunta figuran los datos de la presión en dinas por cm para el punto de mínima compresibilidad ( $F_m$ ); del área correspondiente a ese mismo punto ( $A_m$ ) y la compresibilidad mínima ( $\delta_m$ ) de films de varias proteínas extendidos sobre distintos sustratos(22).

Proteína	Sustrato	$A_m$ (m <sup>2</sup> /mg)	$F_m$ (dina/cm)	$\delta_m$
Hemoglobina de músculo	ClH pH 1	0.82	15	0.031
Hemoglobina de caballo	ClH pH 1	0.80	15	0.029
Hemoglobina de caballo	pH 6.8	0.75	18	0.015
Hemoglobina de vacuno	pH 6.8	0.75	18	0.015
Citocromo C oxidado	pH 10	0.78	10	0.043
Ovoalbúmina	SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> 35%	0.82	14.6	0.010
Ovoalbúmina	acetato N/100	0.71	15	0.028
$\beta$ -lactoglobulina	SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> 35%	0.83	16.7	0.010
Sucroalbúmina	acetato N/20	0.74	13	0.020
Zeína	SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> 2%	-	13	0.020

Puede observarse que el valor correspondiente al área en el punto de mínima compresibilidad es aproximadamente el mismo para las distintas proteínas estudiadas e igual a 0.78 m<sup>2</sup>/mg, en cambio el coeficiente de compresibilidad varía considerablemente de una a otra proteína y para la misma proteína extendida sobre distintos sustratos.

Con el dato del área mínima y conociendo la cantidad de sustancia depositada y su volumen específico puede calcularse el espesor del film; este último puede a su vez medirse por métodos independientes, lo que ha dado origen a nuevas direcciones de investigación en este campo.

### C) Medición directa de espesores de films.

Los métodos para la medición de espesores de films se basan en fenómenos de interferencia o en el estudio de los cambios de elipticidad que experimenta la luz reflejada en una superficie metálica cuando ésta es cubierta por un film. De lo dicho se desprende que debe disponerse de métodos que permitan la transferencia de los films del sustrato sobre el cual se hallaban extendidos a la lámina que se empleará para la medición del espesor.

El problema fué resuelto por Blodgett (28, 29) quien observó que el movimiento de una lámina a través de una superficie cubierta por un film mantenido a una cierta presión iba acompañado del depósito del mismo; de manera que repitiendo el movimiento ascendente y descendente de la lámina podían obtenerse films multimoleculares formados por un número conocido de monocapas. Para que el depósito sea uniforme el film debe mantenerse a presión superficial constante durante la operación (30). Esto puede obtenerse mediante el uso de balanzas superficiales que controlan automáticamente la presión mediante un dispositivo operado por un rayo de luz y una o más células fotoeléctricas, o bien, en forma menos precisa pero mucho más sencilla, empleando "pistones superficiales" (31). Puede usarse como tal cualquier aceite insoluble y no volátil que se extienda para dar una presión superficial definida cuando la cantidad de sustancia presente excede a la necesaria para formar un film monomolecular. En esas condiciones la presión ejercida es una característica de la sustancia para cada temperatura e independiente del área cubierta por el film.

El método consiste en tener dos porciones de superficie separadas por un hilo parafinado cuyo largo es mayor que el ancho de la cubeta en la cual está contenido el sustrato. Se extiende el film a depositar en una de las secciones, colgando en la otra una gota del aceite empleado como

---

pistón, la que se extiende inmediatamente para formar un film monomolecular, permaneciendo el sobrante en forma de pequeñas gotas. La tabla siguiente da las presiones ejercidas por algunas de las sustancias empleadas con este fin:

Fosfato de tricresilo	9.5 dinas/cm
Acete castor	16.5
Acido oleico	29.5

Puede usarse también aceites lubricantes oxidados que se extienden formando films uniformes que exhiben colores de interferencia, los que pueden calibrarse con una balanza superficial en forma de conocer la presión correspondiente a cada color (32).

Una vez depositado el film sobre la lámina pueden emplearse distintos métodos para la medida del espesor. Uno de ellos observa fenómenos de interferencia de la luz reflejada y fué desarrollado por Blodgett y Langmuir (33); su precisión no es muy grande, y la necesidad de construir en cada caso patrones de espesor que contienen alrededor de 50 capas de estearato de bario depositadas, hacen que el método sea largo y engorroso cuando hay que llevar a cabo gran número de determinaciones.

Rothen, interesado en la investigación de reacciones de interacción entre entidades biológicamente activas ideó un dispositivo (clipsómetro) que le permitía medir con precisión y rapidez el espesor de films delgados. El clipsómetro se basa en los trabajos realizados por Drude (34), quien demostró que un film de pocos Å de espesor que se encuentra cubriendo una superficie metálica puede ser detectado mediante el estudio de las variaciones de elipticidad de la luz reflejada por la misma. (11)

Si se hace incidir un haz de luz linealmente polarizada en forma tal que el plano de polarización forme un ángulo distinto de 0° o 90° con

el plano de incidencia, la luz reflejada es elípticamente polarizada. La forma y orientación de la elipse dependen del ángulo de incidencia y de las constantes ópticas del metal. Cuando se cubre la superficie metálica con un film delgado transparente se altera la relación  $\Psi'$  de los componentes que vibran en el plano de incidencia y perpendicular a él, como así también su diferencia de fase  $\Delta$ . Las fórmulas de Drude relacionan los parámetros  $\Psi$  y  $\Delta$  con el espesor óptico de la capa depositada, el ángulo de incidencia  $\phi$  y las constantes ópticas del metal  $\nu$  y  $\kappa$ , que quedan definidas por

$$\nu = \text{sen } \bar{\phi} \text{ tang } \bar{\phi} \cos 2 \bar{\Psi}'$$

$$\kappa = \text{tang } 2 \bar{\Psi}$$

donde  $\bar{\phi}$  es el ángulo de incidencia principal, o sea, el ángulo para el cual la reflexión metálica produce una diferencia de fase de  $90^\circ$ . El azimut principal  $\bar{\Psi}$  es la relación de los dos componentes después de la reflexión con este ángulo.

Las fórmulas de Drude expresan

$$2 \Psi - 2 \Psi' = \text{sen } 2 \Psi' \frac{4\pi}{\lambda} \frac{\cos \phi \text{ sen }^2 \phi \alpha'}{(\cos^2 \phi - \alpha)^2 + \alpha'^2} \left(1 - n_1^2 \cos^2 \phi\right) \left(1 - \frac{1}{n_1^2}\right) l$$

$$\Delta - \Delta' = \frac{4\pi}{\lambda} \frac{\cos \phi \text{ sen } \phi (\cos^2 \phi - \alpha)}{(\cos^2 \phi - \alpha)^2 + \alpha'^2} \left(1 - \frac{1}{n_1^2}\right) l$$

siendo  $\phi$  el ángulo de incidencia y  $\Psi'$  y  $\Delta'$  los valores de  $\Psi$  y  $\Delta$  en ausencia del film;  $n_1$  es el índice de refracción del film (35).

Se han ideado diversos métodos para el análisis de la vibración elíptica. El procedimiento empleado por Rothen se basa en que si un haz de luz elípticamente polarizado atraviesa una lámina de cuarto de onda, la vibración emergente es linealmente polarizada y puede ser extinguida por un Nicol analizador si las direcciones principales de la lámina de cuarto están orientadas en forma de coincidir con los ejes de la elipse. En ese

---

caso la tangente del ángulo formado por el plano de polarización de la luz linealmente polarizada y una de las direcciones principales de la lámina de cuarto de onda mide la elipticidad ( $\psi$ ); en tanto que la orientación ( $\beta$ ) de la lámina de cuarto indica la orientación de la elipse. La diferencia de fase  $\Delta$  está relacionada a los parámetros anteriores por medio del ángulo de incidencia  $\phi$  según las relaciones

$$\begin{aligned} \text{sen } \Delta &= \text{sen } 2\psi / \text{sen } 2\phi \\ \text{tang } \Delta &= \text{tang } 2\psi / \text{sen } 2\beta \end{aligned}$$

de manera que conociendo el índice de refracción del film puede hallarse el valor de  $\Delta$  aplicando las fórmulas de Drude (36).

Este procedimiento es engorroso y poco preciso, ya que las fórmulas sólo son válidas para muy pequeños espesores. Un método más práctico y preciso consiste en el empleo de una curva de calibrado, obtenida mediante el depósito de films de espesor conocido. Este método será descrito en detalle en la parte experimental correspondiente.

Las experiencias de Rothen se hallan dirigidas a la dilucidación de la naturaleza de las fuerzas que actúan en las reacciones de interacción entre sustancias que poseen actividad biológica, tales como sistemas inmunológicos y enzimáticos. Rothen supone que las fuerzas presentes en tales casos tienen un campo de acción mayor que las que actúan en sistemas integrados por moléculas sencillas. Para comprobar la existencia de estas acciones a distancia ha llevado a cabo una serie de experiencias interponiendo barreras inertes de estearato de bario o resinas sintéticas tipo FORNVAR por ej. entre un film de antígeno depositado sobre una lámina metálica y la solución de anticuerpo homólogo que se hace actuar sobre éste, habiéndose podido comprobar aún en estos casos la persistencia de una interacción. El elipsómetro se ha mostrado un auxiliar valioso para

---

la realización de este tipo de experiencias, difíciles de imaginar por otra parte en el campo tridimensional, pero con los datos acumulados hasta el presente resulta difícil decidir si las interpretaciones de Rothen son o no correctas (37, 38, 39).

D) Breve síntesis de los trabajos de caracterización de proteínas mediante el estudio de films mono y multimoleculares.

Como se ha mencionado anteriormente, las curvas de compresión muestran una marcha muy similar para las distintas proteínas, obteniéndose para todas ellas un área límite de  $1 \text{ m}^2/\text{mg}$  y un valor del espesor aproximadamente constante e igual a 10 Å. Este valor es mucho menor que el esperado, ya que varias proteínas (peso molecular  $\sim 35,000$ ) tienen moléculas esféricas en solución, siendo el diámetro de las mismas de alrededor de 45 Å, habiéndose además obtenido ese mismo valor del espesor con films de proteínas de peso molecular próximo a 200,000.

La explicación posible es que la forma de la proteína en la superficie no es esférica y que el film se forma por un desplegamiento de la molécula proteica nativa (22, 32, 40). Por otra parte, el hecho de que muchas proteínas sean solubles en el medio sobre el cual se extienden, en tanto que sus films son altamente insolubles (32, 41) está indicando que se producen cambios estructurales profundos durante el proceso de extensión.

El primer problema que se presenta en estos estudios es el de asegurar que toda la proteína se extiende para formar un film monomolecular, impidiendo el pasaje de una parte de la misma a la solución subyacente o la formación de agregados polimoleculares. El control de la extensión puede hacerse midiendo el espesor óptico de la monocapa por el método de Blodgett o Rothen y compararlo con el deducido de las curvas F-A (32). Para discriminar sobre la homogeneidad del film Hughes y Rideal emplean medi-

---

das de potencial superficial (42) y Zocher y Sticbel observación con ultramicroscopio (43).

Las técnicas de extensión empleadas tienden a salvar los inconvenientes mencionados, pudiendo citarse entre ellas las siguientes:

a) Gorter y Grendel (44) expulsan la solución de proteína contenida en una micropipeta de 0.005 ml mantenida horizontalmente en la superficie del sustrato.

b) Bull (21) opera en la misma forma pero emplea una pipeta de Blodgett (19).

c) Hughes y Rideal y Fosbinder (42, 45, 46) encontraron que las partículas sólidas de proteína se extienden rápidamente sobre una superficie limpia; su método consiste en colocar en una fibra de cuarzo revestida de parafina una pequeña cantidad de proteína, sumergiendo ésta a través de la superficie del sustrato; la cantidad de sustancia que ha pasado a la superficie se obtiene por pesada de la fibra en una microbalanza.

d) Langmuir y Shaefer (32) depositan por medio de una micropipeta la proteína a usarse sobre una lámina de níquel cuya longitudes igual al ancho de la cubeta, y su ancho igual a la profundidad de la misma; ésta es sumergida luego a velocidad constante. Recomendán particularmente este método para las proteínas que dan films tipo gel.

Los factores que influyen sobre la extensión son:

1) concentración de la solución de proteína empleada para depositar el film. Según Bull no debe ser mayor de 0.05% ya que en caso contrario no se obtiene extensión completa. (22)

2) cantidad total de proteína agregada en relación con el área disponible para la extensión (concentración superficial).

3) composición del sustrato empleado. En general se obtiene una buena extensión sobre soluciones buffer diluídas de pH próximo al punto isoelect-

---



trico de la proteína, y en soluciones altamente ácidas, como  $\text{ClH}$  0.1 N a 0.01 N, o de alcalinidad relativamente elevada. Para valores del pH distintos de los mencionados la extensión es mucho más lenta y no llega a completarse si se inicia la compresión antes de que aquella haya sido total. Los iones metálicos actúan favoreciendo la extensión; su acción depende de la valencia con que actúan (47, 48). La extensión de algunas proteínas que forman difícilmente films sobre soluciones acuosas ordinarias puede obtenerse luego de una leve digestión proteolítica (49, 50) o mediante el agregado al sustrato de ciertas bases o ácidos orgánicos, tales como tartrazina o espermidina (51).

Se encontró asimismo que la facilidad de extensión crece al aumentar la concentración de sales en la solución empleada como sustrato (21, 52, 53) mostrándose particularmente apropiadas las soluciones de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  en concentraciones de 10 a 35%.

4) La presencia de impurezas superficialmente activas conduce a la obtención de valores elevados para las áreas límites.

5) Tiempo transcurrido entre la extensión y el comienzo de las medidas realizadas. ( $\zeta$ ). Distintos autores dan valores muy dispares del tiempo necesario para que la extensión sea completa, variando los datos mencionados en la literatura entre 1 minuto (22) y 24 horas (54). En todo caso debe demostrarse que las áreas para una dada presión son independientes del tiempo.

Los estudios realizados con films de proteínas comprenden:

1) Trazado de diagramas F-A. Como ya ha sido mencionado, proporcionan un método rápido y simple para la determinación de pesos moleculares. Es interesante mencionar algunos de los trabajos realizados por H. Bull, quien determinó por este camino los pesos moleculares de la ovoalbúmina,  $\beta$ -lac-

toglobulina, sueroalbúmina, pepsina, insulina, etc., habiendo realizado asimismo experiencias con films mixtos de proteínas y detergentes. Los pesos moleculares obtenidos son correctos y pueden compararse bien con los obtenidos por presión osmótica, siempre que en el caso de la  $\beta$ -lacoglobulina e insulina haya en el sustrato una cantidad suficiente de ion  $\text{Cu}^{++}$  como para impedir la disociación superficial de las mismas. Salvo en el caso de la pepsina, los valores son independientes de  $\zeta$  y de la concentración superficial inicial.

2) Medida de potenciales superficiales. Aunque hasta el presente se carece de una interpretación adecuada de los resultados obtenidos, es un método de considerable importancia para el estudio de interacciones que tienen lugar entre las moléculas de un film y las de una sustancia inyectada por debajo del mismo.

3) Figuras de expansión. (55) Son un reflejo la cohesión con que están unidas entre sí las unidades que forman el film, ya que los films gaseosos dan un tipo de figura característico y fácilmente distinguible de las formadas por films con estructura de tipo gel.

4) Viscosidad de films. Señala Bull que si las viscosidades pudieran determinarse a bajas presiones, en que las interacciones entre las moléculas son despreciables, podría obtenerse información en cuanto al grado de simetría de las moléculas, en forma semejante a lo que sucede en estudios de viscosidad de soluciones diluidas de proteínas. El estudio de la velocidad de difusión superficial a bajas presiones proporcionaría datos sobre la forma de las moléculas en el film.

El alcance de los métodos mencionados se ve limitado por el hecho de no haber sido posible lograr la extensión de algunas proteínas; tal el caso por ej. de la protamina y gelatina (56) con las cuales parece ser que la

---

solubilización tiene lugar antes de que pueda llevarse a cabo la formación del film. Es difícil asimismo la obtención de films a partir de proteínas altamente insolubles, que poseen por lo tanto gran coherencia interna, como la keratina.

Estructura de films de proteínas. Se acepta generalmente que las proteínas están formadas por residuos de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos para formar cadenas polipeptídicas que pueden contener cientos de tales residuos. La disposición de las cadenas polipeptídicas en la molécula no ha sido aclarada, pero los estudios con rayos x revelan un alto grado de regularidad interna (57). Es un hecho notable, como ya ha sido mencionado, que cuando estas moléculas solubles y altamente organizadas se colocan sobre un sustrato apropiado se extienden para formar films insolubles cuyo espesor corresponde al de una cadena peptídica, independientemente de las dimensiones de la molécula original.

Se ha sugerido que las moléculas de proteína existen en la superficie en forma de cadenas de estructura  $\beta$ -keratínica y que a bajas presiones las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos se disponen horizontalmente sobre la superficie, orientándose normalmente a la misma durante la compresión (26). Bull en cambio afirma que aún a bajas presiones las cadenas laterales tienen un grado considerable de orientación normal a la superficie, y que además, debido a la estructura de la cadena  $\beta$ -keratínica, la mitad de los residuos están dirigidos hacia la fase acuosa y la otra mitad hacia la fase aire. Para que el film así formado sea estable su superficie superior debe tener carácter predominantemente hidrofóbico, en tanto que la superficie dirigida hacia el agua debe ser hidrofílica. Se ha sugerido que las moléculas de proteína nativa están formadas por capas o láminas paralelas de cadenas peptídicas (58, 59, 60, 61). Es razonable suponer que estas capas tienen la misma característica hi-

drofílica-hidrofóbica que los films. Por ejemplo, en una molécula nativa que contiene dos de tales capas de cadenas peptídicas, las superficies exteriores deben ser predominantemente hidrofílicas, formando un "sandwich" cuya parte central es de carácter hidrofóbico. Resulta difícil comprender la formación de monocapas de proteína si no se acepta esta estructura laminar para las moléculas nativas.

El proceso por el cual la molécula nativa se despliega y se extiende es todavía oscuro. Debe producirse un clivaje tanto por los planos hidrofílicos como por los hidrofóbicos, lo que conduce en algunos casos a la disociación de la molécula proteica (p. ej. en el caso de la  $\beta$ -lactoglobulina). Según esta teoría la única condición necesaria para que una molécula nativa se extienda para formar un film, es que existan en ella por lo menos dos planos de cadenas peptídicas. Los estudios de difracción de rayos x indican para la molécula de metahemoglobina la existencia de cuatro planos tales (61).

No ha sido posible decidir hasta el presente mediante estudios de films monomoleculares la disposición ni la secuencia de los residuos de aminoácidos en la cadena polipeptídica.

Estudios sobre proteínas nucleares. Las proteínas de los núcleos celulares se encuentran naturalmente en combinación con moléculas diversas de alto y bajo peso molecular habiendo sido ya señalado por Miescher (62) la existencia en el núcleo de un equilibrio dinámico entre ácido nucleico, protamina y sal. Repitiendo las palabras de Grienstein (63): "Este concepto de un equilibrio dinámico entre los componentes nucleares tiene tal vez una implicación mucho más amplia que la que el mismo Miescher intuyera pues en las peculiares propiedades de estas sustancias y en su mutua interacción está el origen de los fenómenos asociados al crecimiento

---

to colular y al proceso del ser viviente".

Las protaminas y las histonas constituyen los componentes proteicos más importantes de los núcleos colulares y su estudio data desde los clásicos trabajos de Kossel (64), quien demostró la existencia en los núcleos de eritrocitos de ganso de una proteína básica que llamó histona, y que sería el componente proteico más importante de los eritrocitos de las aves. Recientemente Stedman y Stedman (65) describen una nueva proteína que llaman "cromosomina" y que representaría el 33% de los núcleos de eritrocitos de pollo libres de lípidos (66). En 1944, Lajmanovich y Mittelman (67) aislaron una porción proteica, tipo histona, de los eritrocitos de pollo, que poseía la interesante propiedad de aglutinar eritrocitos de diversas especies, nucleados y no nucleados. Esta histona fué estudiada posteriormente desde el punto de vista de su caracterización fisicoquímica por N. Mittelman (68), quien describe la histona como monodispersa a pH 3.20, pero que deja de ser homogénea a pH superiores. Su pH isoelectrico es aproximadamente 10.5, obtenido por extrapolación de las curvas de movilidad en función del pH. El estudio de sedimentación de la histona en campos centrífugos intensos revela por lo menos dos componentes de  $S_{20}^0 = 5,0 \times 10^{-13} \frac{\text{cm}/\text{seg}}{\text{cm}/\text{seg}^2}$  y  $S_{20}^0 = 16,3 \times 10^{-13} \frac{\text{cm}/\text{seg}}{\text{cm}/\text{seg}^2}$ . El componente más veloz se asocia presuntamente a una nucleohistona y un cálculo aproximado basado en la suposición de que las constantes de difusión de la histona y nucleohistona sean del orden de las descritas por Carter y Hall (69) para la histona y nucleohistona de tino conduce a los valores de  $M = 19,000$  y  $M = 1,260,000$  para los pesos moleculares respectivamente de dichos componentes. Es nuestro propósito estudiar la extensión de la histona en filis monomoleculares y obtener un valor de su peso molecular por este método.

---

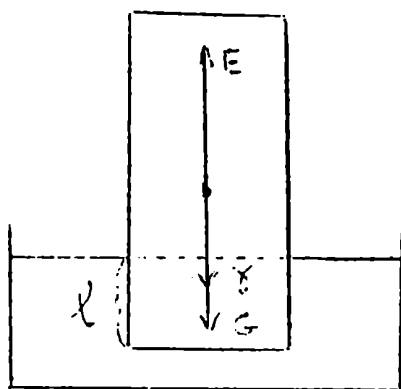
## II) PARTE EXPERIMENTAL

El presente trabajo experimental comprende:

- a) Montaje y contralor de una balanza vertical para la determinación de presiones superficiales. Modificación del método de Harkins-Anderson y su aplicación a la obtención de diagramas F-A y determinación de pesos moleculares de proteínas.
- b) Montaje de un dispositivo (clipsómetro) para la determinación de espesores de films. Determinación de espesores de films de proteínas.
- c) Estudio de propiedades superficiales de proteínas nucleares empleando los métodos mencionados anteriormente.

### a) MODIFICACION DE LA BALANZA VERTICAL DE HARKINS-ANDERSON

Dijimos ya en la parte general cual es el principio en que se funda la balanza vertical de Harkins-Anderson, basada a su vez en la balanza de Wilhelmy. De las 3 fuerzas actuantes sobre la lámina sumergida en el líquido en estudio, sólo una, el peso de la misma, es constante durante una experiencia de compresión. En el método de Harkins-Anderson la segunda fuerza, el empuje, es variable, ya que es decreciente simultáneamente con el área del film. Como también disminuye la tensión superficial durante la compresión es asimismo variable la tercera fuerza, la "presión superficial". La fórmula (3) de la página 6 da precisamente la relación



que debe ser satisfecha entre las tres variaciones  $\Delta \chi$ ,  $\Delta G$  y  $\Delta l$  cuando el ángulo de contacto  $\chi = 0$ . En el método de Harkins-Anderson las disminuciones de  $\chi$  impuestas por la compresión continua del film determinan un desequilibrio entre las tres fuerzas actuantes

sobre la lámina parcialmente sumergida, lo que motiva el ascenso de la misma ( $l$  disminuye) con lo cual disminuye  $E$  hasta alcanzarse un nuevo estado de equilibrio. Si la compresión es continua, los sucesivos estados de equilibrio están asociados a una disminución continua de  $l$  y de  $G$  (las relaciones entre  $G$ ,  $W$ ,  $l$  y  $\gamma$  están dadas por la (1)). Es evidente que si se dispone de una balanza a cadena para posibilitar la variación prácticamente continua de  $G$ , es teóricamente posible y prácticamente inmediato operar a  $l$  constante, compensando los desequilibrios producidos durante la compresión con las correspondientes disminuciones de  $G$ . Esta modificación en la forma de operar respecto de la balanza vertical de Harkins-Anderson que hemos desarrollado con el Dr. N. Mittelman, impone que las oscilaciones verticales de la lámina parcialmente sumergida sean prácticamente despreciables, lo que se obtuvo aplicando dos barreras sobre la escala que marca las oscilaciones del fiel. De este modo se puede observar cómodamente el establecimiento del equilibrio sin que resulte importante el posible depósito de film debido al ascenso y descenso de la lámina.

Se empleó para la construcción de la balanza una balanza analítica común a la que se hicieron las modificaciones necesarias para transformarla en una balanza a cadena. La Fig. 1 muestra el detalle de la instalación empleada.

Uno de los platillos de la balanza fué reemplazado por una plomada de aproximadamente su mismo peso  $P$ , de la que cuelga una delgada cadena de plata  $C$ , que atraviesa el piso de la balanza, y de la que va suspendida la pieza  $E$ , cuyo dibujo en planta puede verse en la Fig. 2.

La pieza fué construída en material plástico (Micaarta),  $E$  y  $E'$  son

---

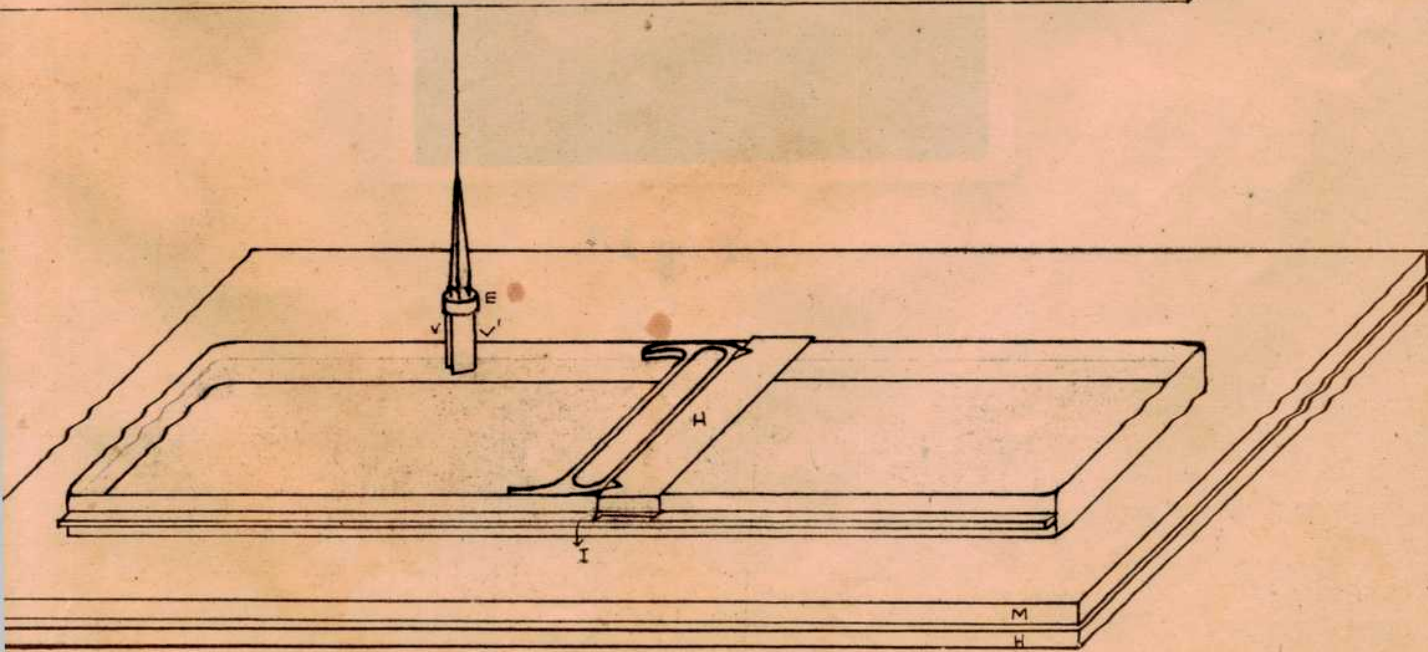
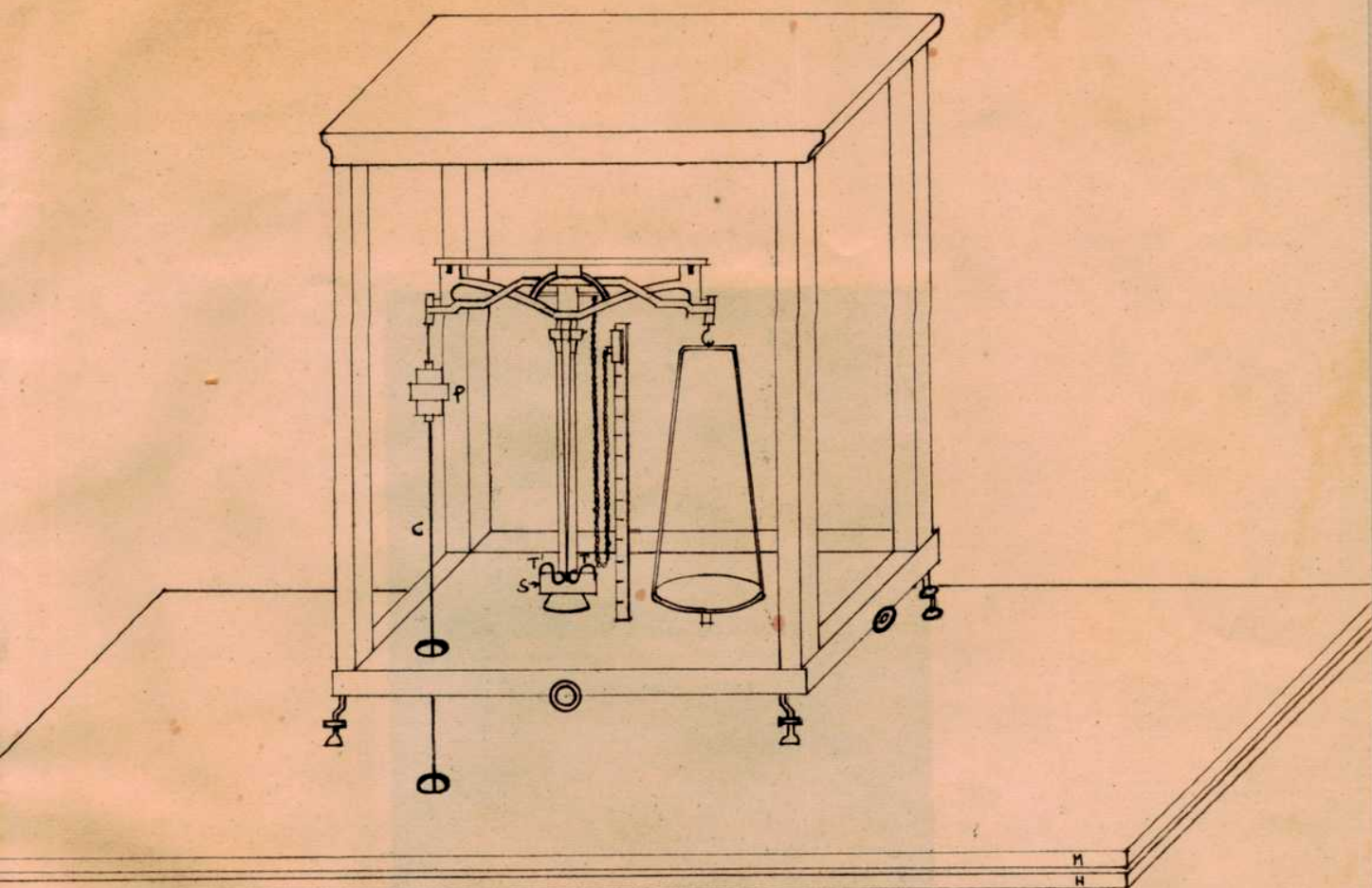






Fig. 1

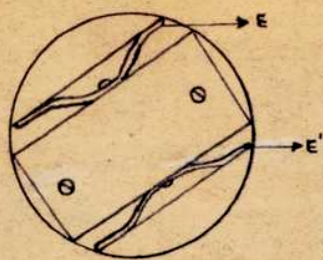


Fig. 2

dos cintas elásticas de bronce que sujetan por presión las láminas de vidrio V y V' que se sumergen en el sustrato sobre el que se va a extender el film. El sistema de suspensión asegura la posición correcta de las láminas en forma perpendicular a la superficie del sustrato. Con el fin de mejorar la sensibilidad se emplearon dos láminas de vidrio paralelas en lugar de una, ya que en

esa forma se obtiene una mayor variación de G para una dada disminución de  $\delta$  (fórmula 7).

Con el fin de eliminar las perturbaciones provenientes de las vibraciones del líquido, se montó la balanza sobre una mesa de hormigón H empotrada en la pared sobre la que se colocó una plancha de mármol M de 3 cm de espesor, separada de la anterior por discos de goma de aproximadamente 1 cm de espesor.

Las oscilaciones del fiel se limitaron por medio de las trabas T y T' en forma tal que la amplitud máxima permitida era de una división y media aproximadamente.

La cubeta empleada para contener el sustrato es de acero inoxidable, sus dimensiones son: 65 cm de largo, 15 cm de ancho y 5 cm de altura. A uno de los lados de la misma se adosó una escala de bronce dividida en milímetros. Dicha escala, que fué construída para este objeto, se sujeta con tornillos en los extremos de la cubeta, lo que permite desmontarla después de cada experiencia para proceder a la limpieza de aquélla.

Dado que el espesor de la chapa de acero empleada en la construcción de la cubeta es de pequeño espesor ( $\sim 0.5$  mm), no pudieron emplearse para la compresión del film barreras que descansaran sobre los bordes de la misma. Nuestros primeros ensayos se efectuaron con barreras de mica

parafinada, efectuando el cierre lateral con hilos parafinados (Guastalla). Si bien esta técnica puede ser utilizada satisfactoriamente en la región de bajas presiones ( $\sim 1$  dina/cm), cuando la presión superficial se hace mayor los riesgos de pasaje de film al otro lado de la barrera aumentan apreciablemente, no obteniéndose equilibrios estables para los sucesivos estados de compresión.

A causa de los resultados inciertos obtenidos con las barreras flotantes de mica y cierres laterales de hilos parafinados en nuestras condiciones de trabajo, decidimos apartarnos completamente de los modelos de barreras descritos en la literatura, para ensayar un modelo de barrera semejante a un "bote" que simultáneamente flota y ejerce presión lateral sobre las paredes de la cubeta. Para tal fin se empleó una barrera de lucite cuyos detalles pueden verse en la Fig 3.

El ahuecamiento central tiene por objeto conseguir que la barrera flote espontáneamente sobre la superficie del líquido. AB y A'B' son dos láminas elásticas de acero unidas a la pieza de lucite por los tornillos T y T' en forma que las distintas partes puedan desmontarse fácilmente para su limpieza. Como la distancia AA' es aproximadamente igual al ancho de la cubeta, BB' resulta mayor que el mismo debido a la forma de la pieza de lucite y de las láminas de acero, de manera que al colocar la barrera sobre la superficie del líquido, AB y A'B' presionan contra las paredes de la cubeta, impidiendo el pasaje de sustancia hacia la superficie no cubierta por film. Con el fin de evitar desprendimientos de parafina provenientes del roce de las láminas elásticas contra la cubeta se recubrieron aquéllas con un delgado tubo de goma, sellando los extremos B y B' con un pequeño tapón de parafina.

El desplazamiento de la barrera se llevó a cabo mediante la pieza R (Fig. 4) que desliza sobre los bordes de la cubeta; el índice I indica

---

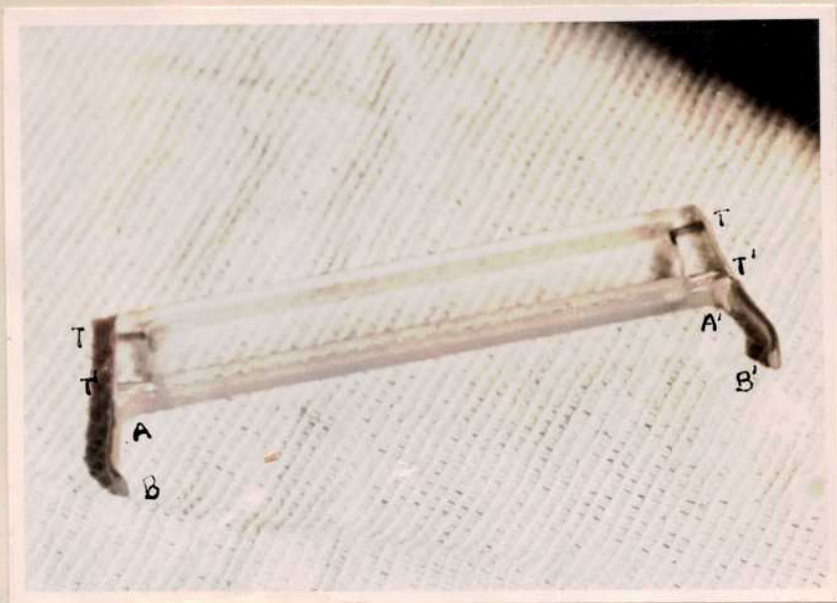


Fig. 3



Fig. 4

sobre la escala la posición de la barrera.

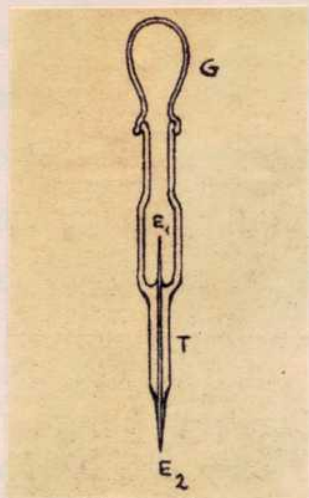


Fig. 5

El depósito de la proteína se llevó a cabo mediante una pipeta de Blodgett, tal como la que puede verse en la Fig. 5. La pipeta se llena mediante el bulbo de goma G. El volumen emitido es el comprendido entre los extremos E<sub>1</sub> y E<sub>2</sub> del capilar T. El calibrado de una de estas pipetas dió un valor de 0.0800 ± 0.0002 ml.

#### Sustancias empleadas.

A los efectos de controlar el ajuste y condiciones de trabajo de la balanza se utilizó una proteína cristalizada bien estudiada y apta para establecer comparaciones numéricas, como es el caso de la ovoalbúmina, que fué preparada y recristalizada en el Laboratorio de Fisicoquímica según el método de Cannan y Kekwick, y que nos fuera proporcionada por el Dr. N. Mittelman.

La albúmina de bovino era el producto comercial Armour (Fracción V).

Como sustrato se empleó una solución de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  al 5%. Se preparó una solución stock de sulfato de amonio al 35% de la que se tomaba en cada ocasión el volumen necesario, filtrándolo por carbón activado en proporción de 1 gramo por litro de solución, y diluía con la cantidad necesaria de agua en el momento de la experiencia.

En la operación de parafinado se empleó una solución de parafina Merck (P.F. 46-48°C) en benceno rectificado.

#### Obtención de diagramas F-A. Manera en que se condujeron las experiencias

La cubeta y las barreras se limpiaban rigurosamente cada dos o tres

experiencias, empleando para ello solvente industrial que eliminaba prácticamente toda la parafina. La cubeta se lavaba luego con potasa alcohólica, enjuagando finalmente con abundante agua, hasta observar un mojado uniforme de la superficie; una vez seca, la misma se calentaba suavemente por medio de un mechero hasta 30°C-40°C y se parafinaba pasando un algodón embebido en una solución ~ 10% de parafina en benceno. El calentamiento tiene por objeto favorecer la adhesión de la parafina.

Luego de colocado el sustrato en la cubeta, su superficie se renovaba por "barrido" mediante una lámina de celuloide cuyo largo era igual al ancho de aquélla.

La proteína se depositó en todos los casos a partir de soluciones acuosas de concentración adecuada mediante una micropipeta de Blodgett cuyo volumen emitido era de 0.077 ml, colocada horizontalmente sobre la superficie, en forma tal que su extremo tocara exactamente la misma.

El valor de  $G_0$  correspondía al valor de  $G$  obtenido con las láminas sumergidas en la solución limpia de sulfato de amonio, cuando la posición del fiel coincidía con la división central de la escala  $S$  (Fig. 1); luego del depósito del film y de cada compresión se variaba  $G$  por medio de la cadena de nodo de llevar nuevamente el fiel a esta posición de referencia. No volvía a arrestarse la balanza durante el resto de la experiencia.

Podían determinarse variaciones del orden de 0.02 a 0.05 dina/cm, correspondientes a variaciones de  $G$  de 0,2 a 0.5 ng).

Una vez extendido el film se esperó 5 minutos antes de iniciar la compresión, salvo en los casos en que se deseó estudiar la influencia del tiempo transcurrido entre ambas operaciones sobre la extensión.

La compresión se llevó a cabo mediante desplazamientos de 1 cm en la posición de la barrera ( $\Delta A = 15 \text{ cm}^2$ ), variaciones menores del área hubieran producido disminuciones del peso  $G$  inferiores a la sensibilidad

---

de la balanza en la primera región de la curva. Luego de cada compresión se esperó un tiempo suficiente como para permitir la estabilización de la balanza.

Los valores de F que figuran en los gráficos F-A se obtuvieron mediante la fórmula (7)

$$\Delta \gamma = \frac{F \Delta G}{2(t+w)}$$

para las dimensiones de las láminas utilizadas en cada caso. Las áreas en  $\text{m}^2/\text{ng}$  se obtuvieron dividiendo el área disponible para el film correspondiente a cada posición de la barrera por la cantidad total de sustancia empleada para formar el film.

El número de valores experimentales de F comprendidos entre 0 y 1 dina/cm obtenidos para el trazado de  $FA = f(F)$  variaban entre 8 y 10 puntos. En todos los casos se calcularon los mejores valores de  $\alpha$  y  $\beta$  de la ecuación  $FA = \alpha F + \beta$  mediante el método de cuadrados mínimos.

Resultados obtenidos: a) Con ovoalbúmina

La Tabla 1 muestra los valores obtenidos en una experiencia representativa de la serie llevada a cabo con ovoalbúmina (Experiencia No 35)

Tabla 1. Film de ovoalbúmina sobre sustrato de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  5%.  $\tau = 5$  min.  
 Concentración superficial inicial =  $0.42 \text{ ng}/\text{m}^2$ .  $\Delta \gamma = 102 \Delta G$ .  
 $A (\text{m}^2/\text{ng}) = 0.041$  L. T =  $20^\circ\text{C}$ .

A ( $\text{m}^2/\text{ng}$ )	$\Delta G$ (ng)	$\Delta \gamma$ (dina/cm)	Cum $\Delta \gamma$ (dina/cm)	FA
2.255	0.5	0.051	0.051	0.115
2.214	0.0			
2.173	0.0			
2.132	0.0			
2.091	0.0			

$A$ ( $m^2/ng$ )	$G$ (ng)	$\Delta \bar{X}$ (dina/cm)	$\text{Cum} \Delta \bar{X}$ (dina/cm)	$FA$
2.050	0.0			
2.009	0.5	0.051	0.102	0.205
1.968	0.0			
1.927	0.5	0.051	0.153	0.295
1.886	0.0			
1.845	0.5	0.051	0.204	0.376
1.804	0.5	0.051	0.255	0.460
1.763	0.5	0.051	0.306	0.539
1.722	0.5	0.051	0.357	0.615
1.681	2.5	0.255	0.612	1.028
1.640	4.0	0.408	1.020	1.673
1.599	6.0	0.612	1.632	
1.558	7.5	0.765	2.397	
1.517	9.5	0.969	3.366	
1.476	11.0	1.122	4.488	
1.435	15.0	1.530	6.018	
1.394	15.5	1.581	7.599	
1.353	16.0	1.632	9.231	
1.312	16.0	1.632	10.863	
1.271	16.5	1.683	12.546	

Con los datos obtenidos se trazaron los gráficos  $F = f(A)$  y  $FA = f(F)$  que figuran a continuación (Figs. 6 y 7).

El cálculo de cuadrados mínimos para los valores de  $F$  comprendidos entre 0 y 1 dina/cm arrojó los siguientes valores



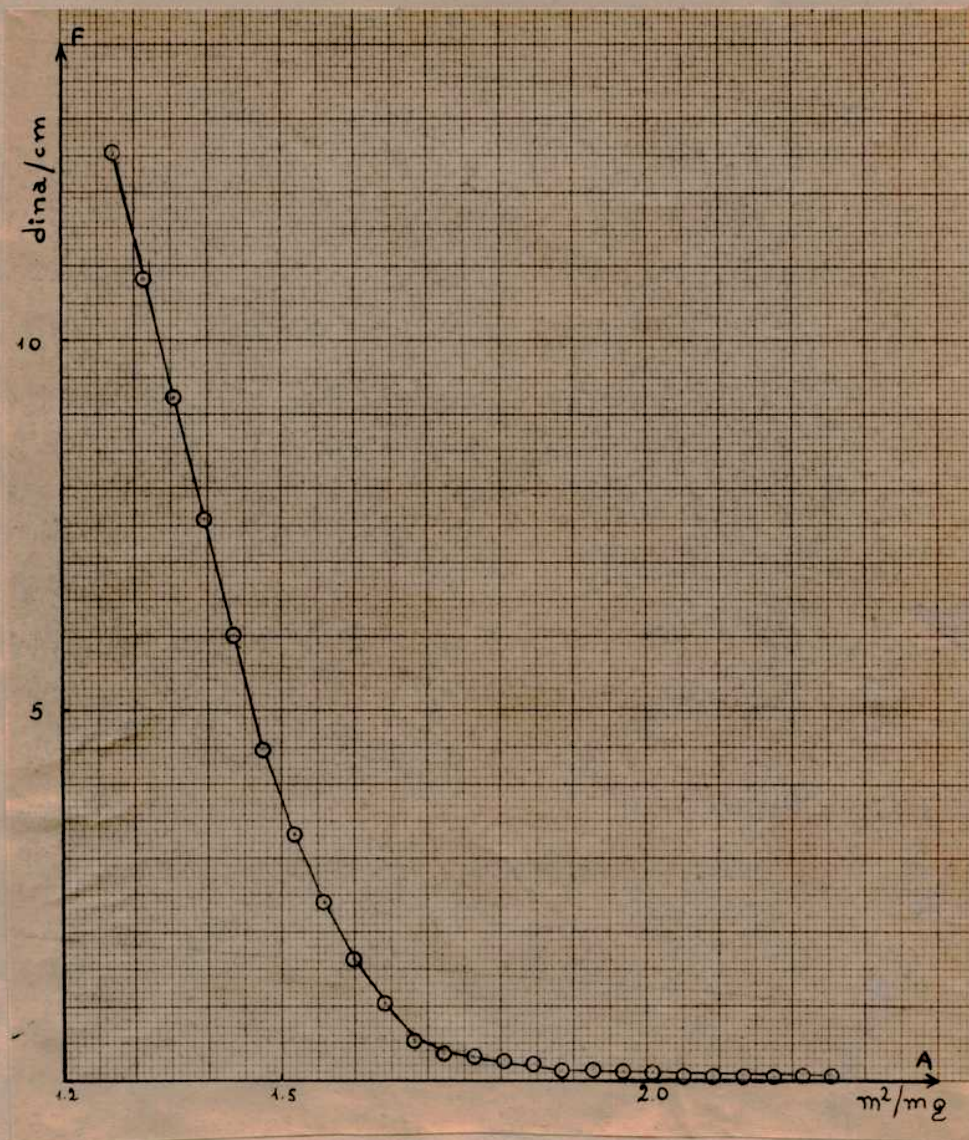


Fig. 6

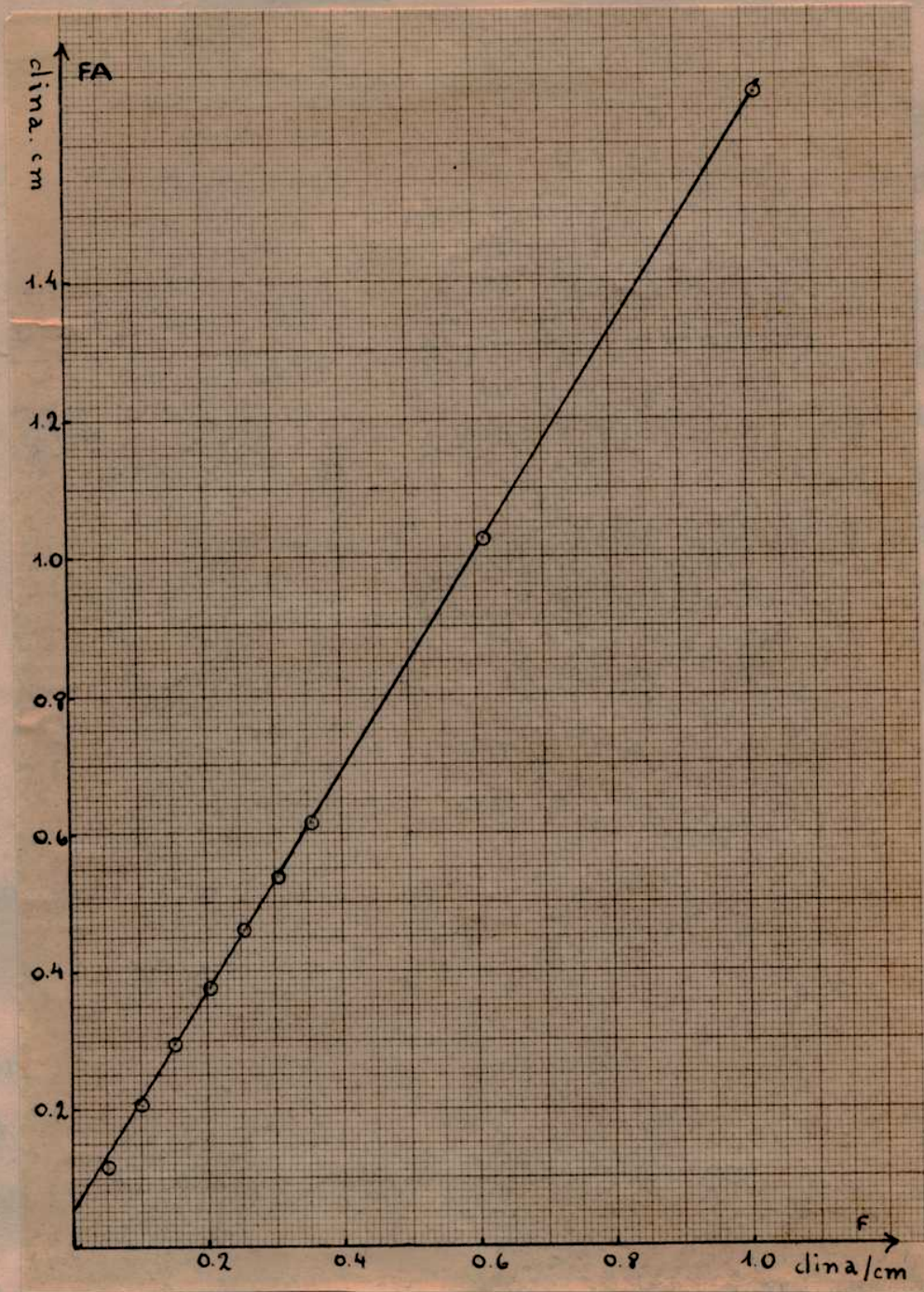


Fig. 7

Tabla 2

$F(x_1)$	$\dot{u}$	$F\dot{u}(y_1)$	$x_1^2$	$x_1 y_1$
0.051	2.255	0.115005	0.002601	0.005865
0.102	2.009	0.204918	0.010404	0.020910
0.153	1.927	0.294831	0.023409	0.045135
0.204	1.845	0.376380	0.041616	0.076704
0.255	1.804	0.460020	0.065025	0.117300
0.306	1.763	0.539478	0.093636	0.164934
0.357	1.722	0.614754	0.127449	0.219555
0.612	1.681	1.028772	0.374544	0.629136
1.020	1.640	1.672800	1.040400	1.706460
3.060		$\Sigma = 5.306958$	$\Sigma = 1.779084$	$\Sigma = 2.995990$

$$9 \beta + 3.060 \alpha = 5.307$$

$$3.06 \beta + 1.779 \alpha = 2.996$$

Lo que conduce a valores de

$$\beta = 0.0551$$

$$\alpha = 1.572$$

La expresión para el peso molecular, teniendo en cuenta que se ha trabajado a 20°C es (fórmula 12)

$$M_2 = 24.3 \times 10^2 / 0.0551$$

$$M_2 = 44.100$$

Con el fin de verificar si la extensión era completa se llevaron a cabo experiencias a distintas concentraciones superficiales iniciales, observándose que los resultados obtenidos eran independientes de dicha concentración. Por ejemplo, el valor del peso molecular obtenido empleando una  $c_s^i$  igual a 0.28 ng/m<sup>2</sup> fué de 43,470.

Los valores obtenidos en una serie de experiencias fueron los siguientes:

Tabla 3

Peso molecular	Valor medio	$d_1$	$d_1^2$
43,626		560	313,600
42,270		1,916	3,671,456
41,908		2,278	5,189,284
46,285		1,099	1,207,801
44,102	44,186	84	7,056
47,647		3,461	11,978,521
43,470		4	16
43,470		716	512,656

353 3,490

$\Sigma = 22,680,390$

lo que conduce finalmente a un valor del peso molecular de  $44,186 \pm 636$  (desviación standard  $\sigma_M = 636$ ). El método utilizado por nosotros da pues para el peso molecular de la ovoalbúmina:  $M = 44,200 \pm 650$ .

Pasemos ahora a considerar el film a presiones mayores de 1 dina/cm. La Fig. 8 muestra el gráfico correspondiente al coeficiente de compresibilidad en función del área del film ( $\delta = 1/A_0 \frac{dA}{dF}$ ) donde  $A_0$  es el valor obtenido por extrapolación del trazo recto de la curva  $F = f(A)$ . Se muestra sólo la parte descendente de la curva debido a que se hicieron lecturas hasta la presión de colapso únicamente, ya que para valores del área menores que el correspondiente a esta presión,  $F$  dependía fuertemente del tiempo, no llegándose a equilibrio a pesar de haber hecho lecturas durante intervalos considerables. Se consideró que los valores de  $A$  y  $\delta$  correspondientes a esta presión correspondían al mínimo de la curva total de compresibilidad. (22).

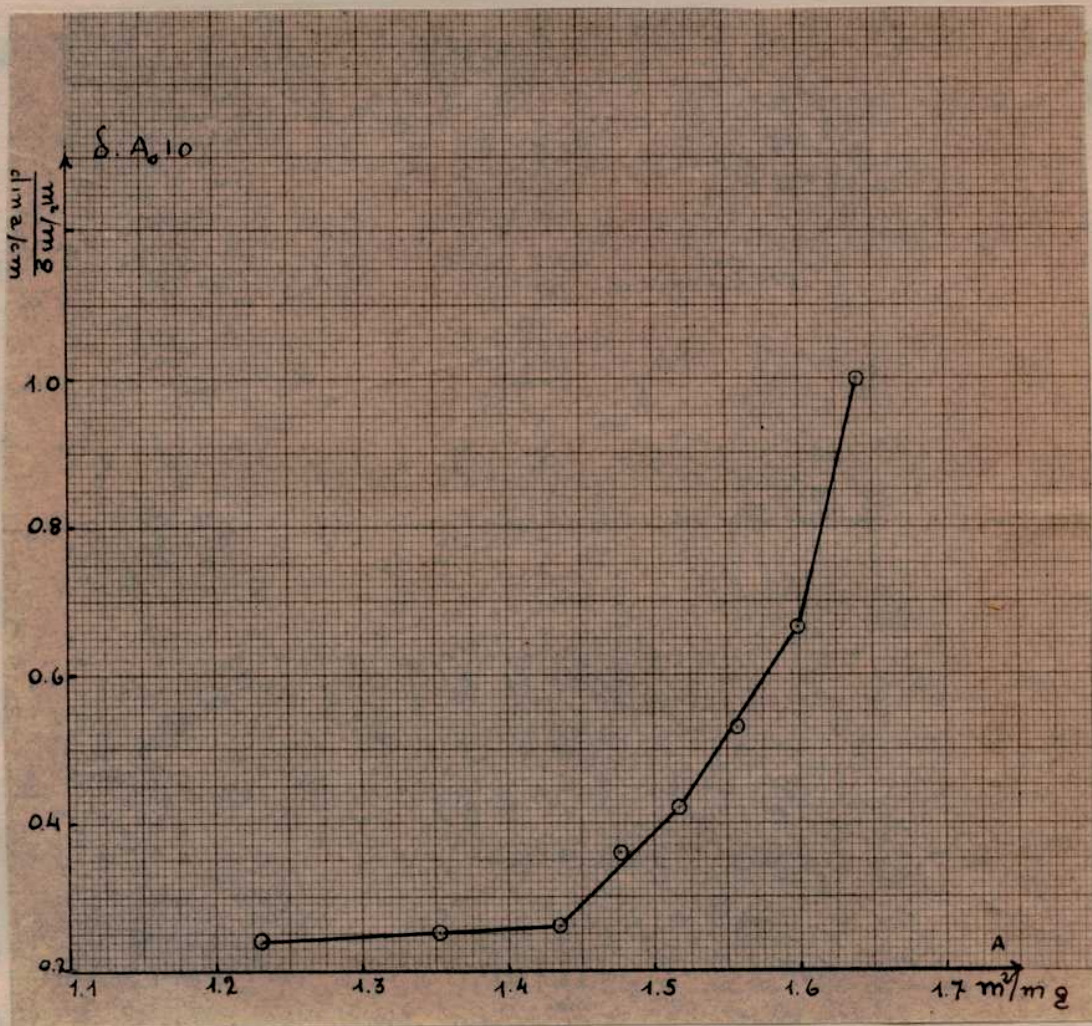


Fig. 8

Los valores obtenidos gráficamente son:

Presión de colapso ( $F_m$ ) = 12.5 dina/cm

Area correspondiente al punto de mínima compresibilidad ( $A_m$ ) =  $1.2 \frac{\text{m}^2}{\text{mg}}$

Compresibilidad mínima ( $\delta_m$ ) = 0.016

b) Resultados obtenidos con albúmina de bovino

La Tabla 4 muestra los valores obtenidos en una experiencia representativa de la serie realizada con albúmina de bovino (Experiencia No 57).

Tabla 4. Film de albúmina de bovino sobre sustrato de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  5%  
 $\tau = 5$  min. Concentración superficial inicial =  $0.42 \text{ ng/n}^2$ .  
 $\Delta \gamma = 102 \Delta G$ .  $T = 20^\circ\text{C}$ .

$\Delta$ (n <sup>2</sup> /mg)	$\Delta G$ (mg)	$\Delta \gamma$ (dina/cm)	Cum $\Delta \gamma$ (dina/cm)	FA
2.255	0.7	0.071	0.071	0.166
2.214	0.0			
2.173	0.0			
2.132	0.0			
2.091	0.5	0.051	0.122	0.255
2.050	0.0			
2.009	0.5	0.051	0.173	0.347
1.968	0.0			
1.927	0.7	0.071	0.244	0.470
1.886	0.0			
1.845	1.0	0.102	0.346	0.638
18804	0.5	0.051	0.397	
1.763	1.5	0.153	0.550	
1.722	1.5	0.153	0.703	
1.681	2.0	0.204	0.907	
1.640	2.5	0.255	1.162	
1.599	3.0	0.306	1.468	
1.558	4.5	0.459	1.927	
1.517	5.5	0.561	2.488	
1.476	7.0	0.714	3.202	

1.435	9.0	0.918	4.120
1.394	11.5	1.173	5.293
1.353	13.5	1.377	6.670
1.312	15.0	1.530	8.300
1.271	16.0	1.632	9.932
1.230	16.0	1.632	11.564
1.189	15.0	1.530	13.094

La fig. 9 corresponde al gráfico de  $F = f(\Lambda)$  correspondiente a estos datos.

#### Región de bajas presiones

Los gráficos de  $F_{\Lambda} = f(F)$  dieron rectas hasta una presión superficial de 0.30 a 0.35 dinas/cm, obteniéndose en el intervalo comprendido entre 0 y 0.3 dinas alrededor de 6 puntos experimentales sobre los que podía hacerse la extrapolación.

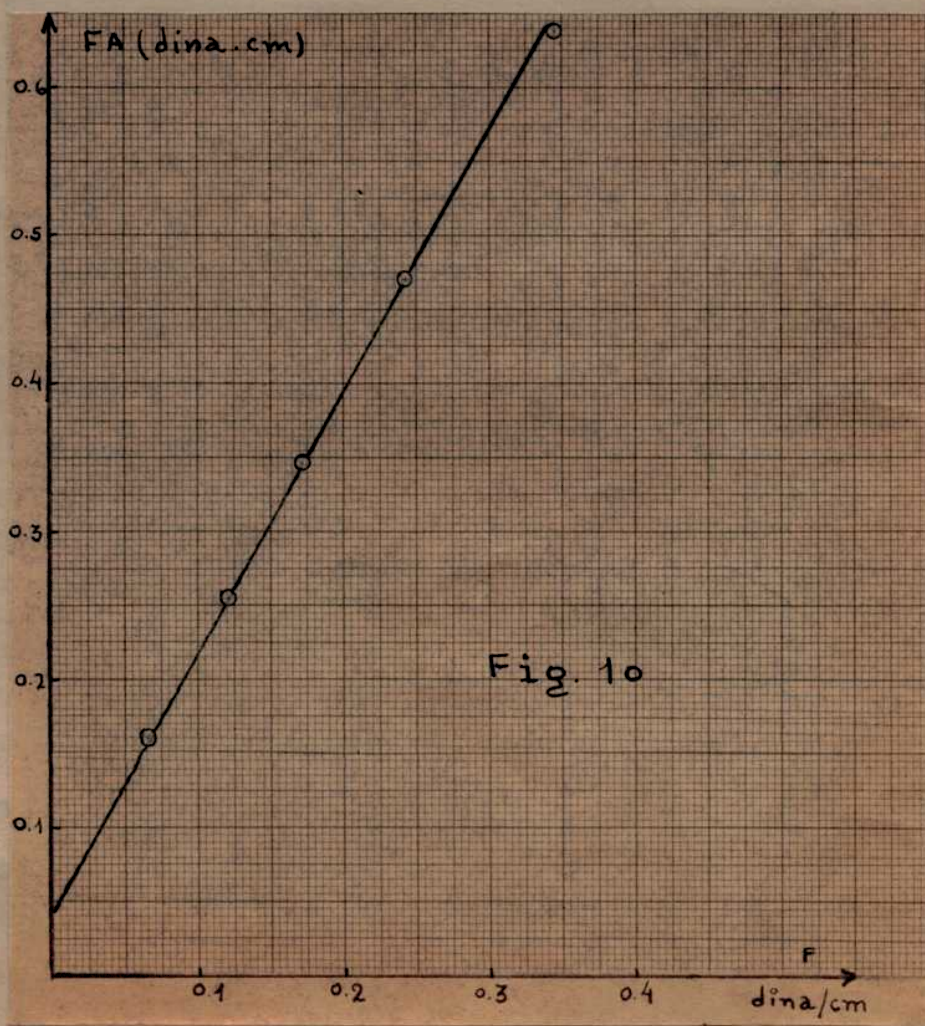
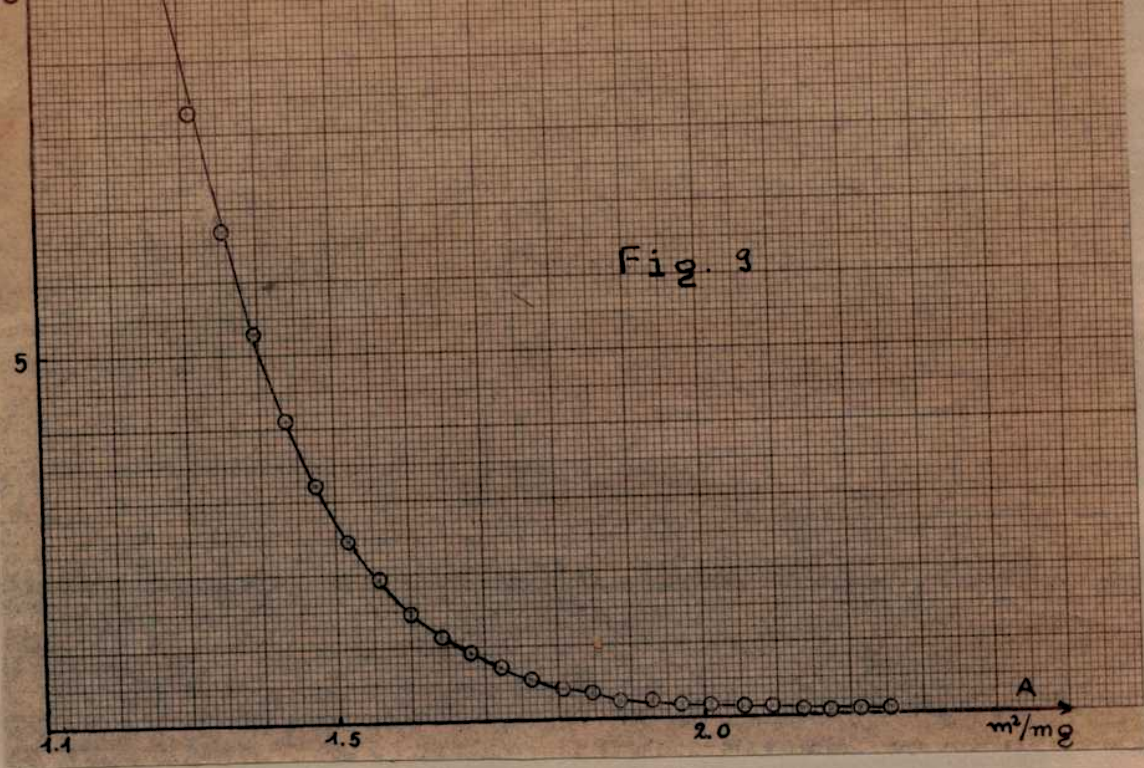
La fig. 10 muestra el gráfico  $F_{\Lambda} = f(F)$  correspondiente a los valores de la tabla 4. La ecuación de la recta calculada por cuadrados mínimos es

$$F_{\Lambda} = 0.033 + 1.75 F$$

lo que conduce a un valor de 73.600 para el peso molecular. El valor medio obtenido en una serie de determinaciones fué de 67,500.

#### Región de altas presiones.

La Fig 11 muestra la curva de compresibilidad correspondiente a un film de albúmina de bovino sobre sustrato de sulfato de amonio al 5%





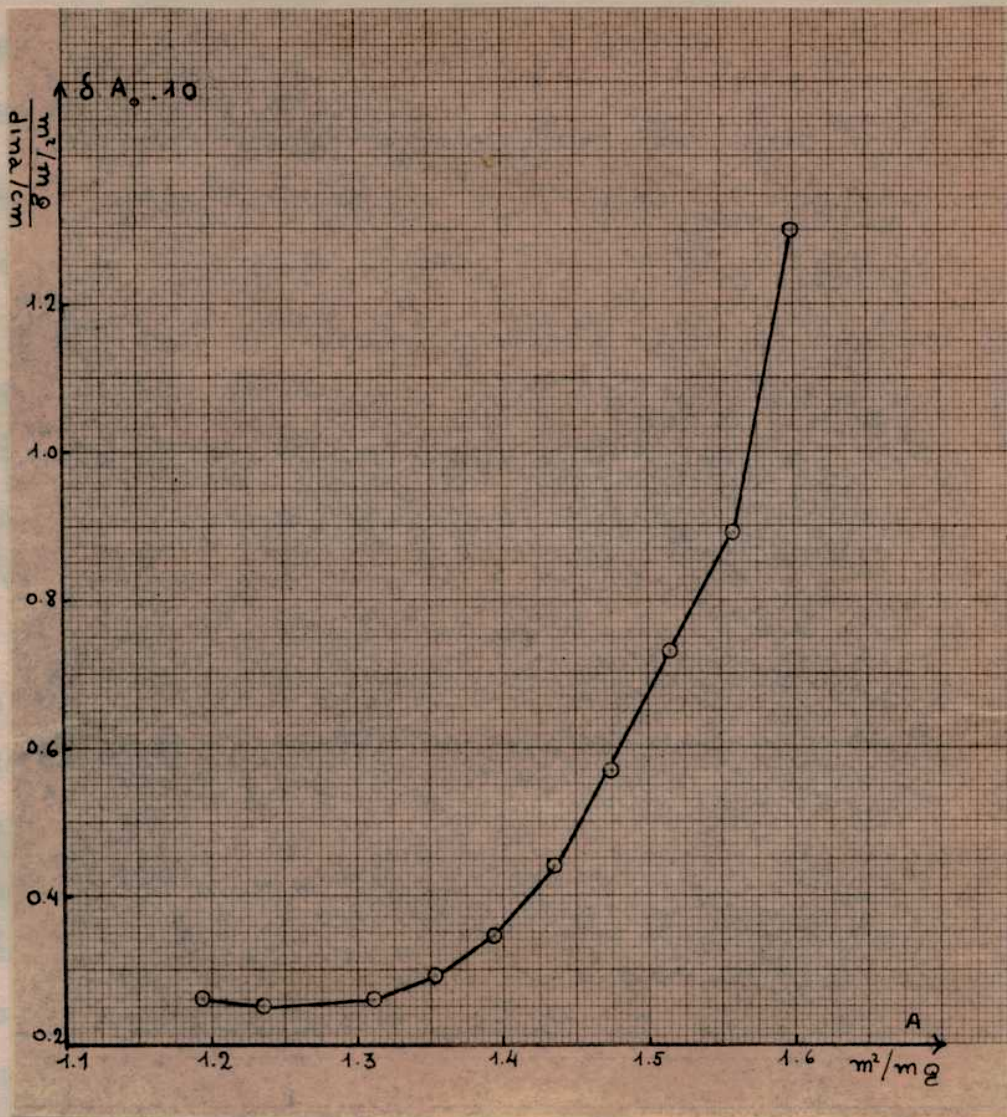


Fig. 11

Los valores obtenidos gráficamente son:

Presión de colapso ( $F_m$ ) = 122 dinas/cm

Area correspondiente al punto de mínima compresibilidad ( $A_m$ ) =  $1.2 \frac{\text{m}^2}{\text{mg}}$

Compresibilidad mínima ( $\delta_m$ ) = 0.016

b) DETERMINACION DE ESPESORES DE FILMS

Se utilizó ovoalbúmina cristalina y albúmina de bovino (Fracción V de Cohn) para el control del dispositivo de Rothen montado para la medida de espesores de films de proteínas.

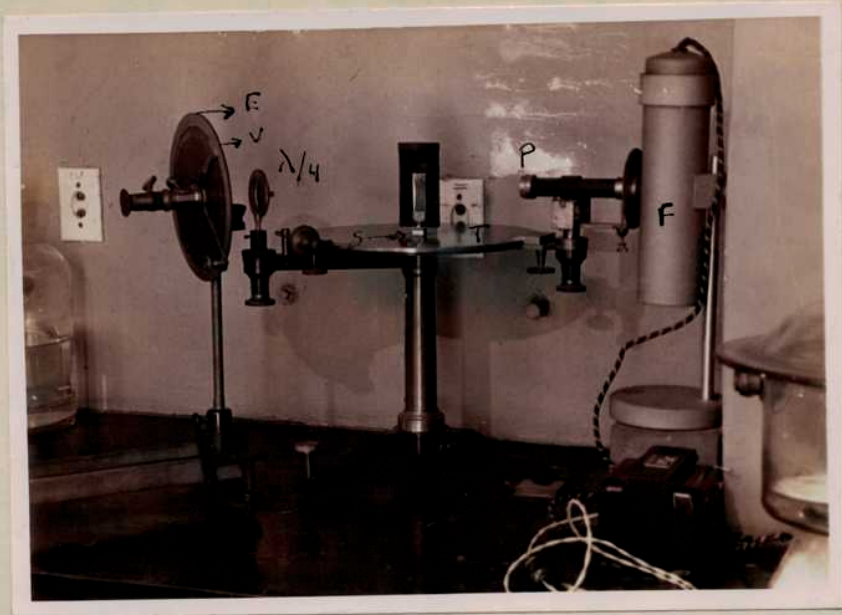
La Fig. 12 muestra la disposición general de la instalación empleada.

Como fuente luminosa F se empleó una lámpara de vapor de sodio; P es un disco de Polaroid montado sobre un marco graduado de manera de poder conocer y reproducir la posición del plano de polarización de la luz emergente del mismo; S es una plataforma, sobre la que se coloca para su observación la lámina metálica cubierta por el film en estudio, y que tiene dos movimientos: uno de rotación, en forma de poder variar el ángulo de incidencia de la luz emergente del polarizador sobre la lámina, y otro vertical que permite variar la altura a la que se encuentra la plataforma sobre el limbo graduado T. Este último lleva una escala graduada en grados que permite medir el ángulo de incidencia por medio de un índice solidario con S. La lámina de cuarto de onda  $\lambda/4$  se halla montada a su vez en un disco metálico, dentro del cual puede girar, leyéndose su posición en la escala grabada sobre el mismo. D es el nicol analizador cuya posición puede leerse sobre la escala E por medio del Vernier V con una precisión de  $\pm 0.05^\circ$ .

Para la construcción del elipsómetro se emplearon un limbo de goniómetro y el sistema analizador de un polarímetro, los ajustes necesarios para completar la instalación (montaje del Polaroid y de la lámina cuarto de onda y escalas) fueron llevados a cabo en el Taller de Precisión de la Facultad.

La marcha de los rayos puede seguirse en la representación esquemática del aparato que se ve en la Fig. 13.

---



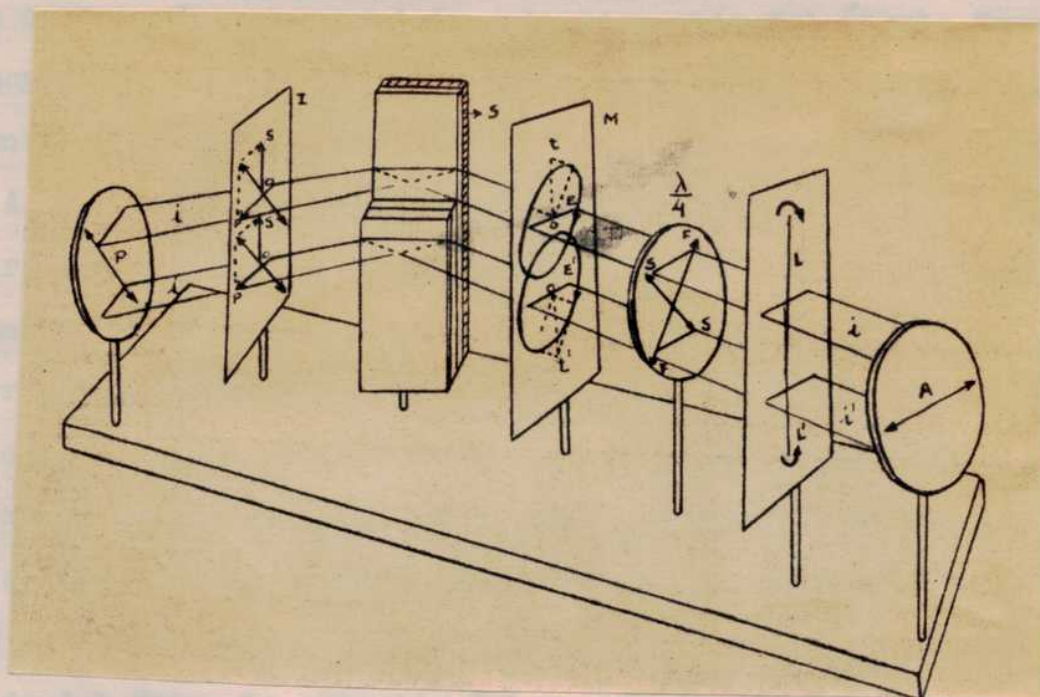


Fig. 13

La luz monocromática proveniente de la lámpara de sodio pasa a través del polarizador P, orientado en forma tal que la dirección del plano de polarización de la luz forme un ángulo de  $45^\circ$  con el plano de incidencia  $i$ , indicado por los dos rayos que inciden en la parte superior e inferior de la lámina metálica S. La dirección de vibración de los dos rayos determinada por la posición del Polaroid P está indicada en el plano I. La parte superior e inferior de la lámina S han sido cubiertas con uno y tres film monomoleculares de referencia, lo que permite la utilización de una técnica de medio campo para determinar espesores, en la forma que se describirá.

Después de reflejarse en S la luz es elípticamente polarizada, y como los espesores de los films que cubren ambas mitades de la lámina no son iguales, las correspondientes elipses E y E' difieren en orientación y elipticidad. Los dos haces de luz caracterizados por estas dos elipses

pasan a través de una lámina de cuarto de onda orientada con su dirección rápida aproximadamente paralela a la bisectriz del ángulo formado por los ejes mayores de las elipses E y E', transformándose en las elipses extremadamente clongadas L y L'. Finalmente la luz pasa a través de un analizador A, observándose por medio de un ocular enfocado en S. El ángulo leído para la posición del analizador cuando ambas mitades del campo tienen la misma intensidad da la lectura cero sobre la escala E. Si se añade ahora sobre toda la lámina un film delgado de espesor desconocido, el campo superior e inferior adquieren distinta intensidad, ya que ha variado la orientación de las elipses E y E' y su elipticidad es ahora mayor. Después del pasaje de la luz a través de la lámina de cuarto de onda las elipses L y L' también han rotado y su elipticidad es algo mayor que antes del agregado del film. La rotación del analizador devuelve la igualdad de intensidad a ambos campos, y el ángulo girado es una medida del espesor del film.

El ajuste del aparato requiere, como ya se mencionó, que el polarizador se halle orientado en forma tal que el plano de polarización de la luz emergente del mismo se halle formando un ángulo de  $45^\circ$  con el plano de incidencia i. Para hallar dicha posición debe tenerse en cuenta que cuando un haz de luz es linealmente polarizado y se cumple la condición anterior, el vector representativo puede ser considerado como la resultante de los vectores iguales y vibrando en fase op en el plano de incidencia y os perpendicular a él (plano I). Después de la reflexión metálica la elipse que caracteriza a la vibración reflejada es exactamente simétrica con respecto al plano de incidencia, a la elipse similar que se obtiene cuando el plano de la vibración incidente es girado en un ángulo de  $90^\circ$ . Entonces:

- 1) Por ensayos sucesivos se coloca el polarizador lo más cerca posible
-

de la posición en que la dirección del plano de polarización de la luz sea perpendicular al plano de incidencia, rotando el analizador hasta extinguir la luz proveniente directamente del polarizador. Se interpone luego la lámina de cuarto de onda, girándola hasta reextinción de la luz, dejando fijos el analizador y polarizador. Se toma nota de estas posiciones.

2) Se gira  $45^\circ$  el polarizador y se observa por reflexión sobre una lámina metálica montada sobre la plataforma central del limbo graduado; por rotación de la misma se halla el ángulo de incidencia para el cual la suma de los cambios de fase producidos por la reflexión metálica y por la lámina de cuarto de onda es igual a  $0^\circ$  o  $180^\circ$ . Esta condición puede ser fácilmente reconocida por el hecho de que en ese caso la vibración emergente de la lámina cuarto de onda es nuevamente linealmente polarizada, y puede obtenerse una posición del analizador para la cual haya extinción total. Esta posición del analizador conjuntamente con la obtenida anteriormente da el ángulo  $\theta$  entre el plano de polarización de la vibración linearizada 2) y el plano de vibración de la luz incidente 1).

3) Con el mismo ángulo de incidencia y la misma posición de la lámina de cuarto de onda se gira  $90^\circ$  el polarizador ( $45^\circ$  de la posición primitiva) girando el analizador hasta obtener nuevamente extinción. Si la posición inicial del polarizador era la correcta, vale decir, si en 1) el plano de polarización era perpendicular al plano de incidencia, el nuevo ángulo  $\theta'$  debe ser igual al obtenido en 2).

La Tabla 5 muestra los valores obtenidos en una de estas operaciones.

---

TABLA 5

	Posición del polarizador	Posición de la lámina $\lambda/4$	Posición del analizador	$\Delta$
Observación directa	112°	-4°	-26.5°	30.4°
Observación por reflexión en lámina metálica (ángulo de incidencia = 75°)	67°	-4°	-56.9°	29.8°
Idem	157°	-4°	3.3°	

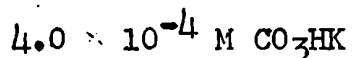
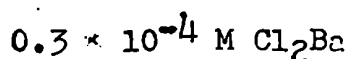
El ajuste del aparato fué verificado cada veinte o treinta experiencias.

Las láminas metálicas empleadas para el depósito de los films eran de acero inoxidable altamente pulido hasta lograr una superficie espejo. Sus dimensiones eran 0.2 x 1.5 x 6 cm. El pulido se llevó a cabo en el Taller de la Cátedra de Mineralogía en la forma siguiente: Las láminas previamente rectificadas se desgastaron con Carborundum 120 y esmeril fino contra una superficie de vidrio hasta obtener una superficie mate uniforme. En la operación de pulido se empleó Aloxite 3F y Aloxite óptico sobre planchas de vidrio, y Aloxite óptico y óxido de cromo sobre discos giratorios recubiertos de paño, obteniéndose finalmente una superficie altamente pulida y reflectora. Anteriormente habíamos intentado usar láminas de bronce rectificadas y cromadas, pero las irregularidades de la superficie, debidas probablemente a una técnica deficiente de cromado, hacían que no se obtuviera una extinción simultánea en toda la extensión del campo empleado para la observación, lo que dificultaba la elección del criterio a adoptar para hacer las lecturas.

Las láminas se limpiaban dejándolas sumergidas en una solución de potasa alcohólica entre una y otra experiencia, enjuagándolas luego con abundante agua, hasta obtener un mojado uniforme de la superficie.

Para el depósito de los films, las láminas limpias se introducían en

una cubeta de acero inoxidable parafinada en la forma ya descripta, que contenía un buffer de la siguiente composición:



pH = 7.0 a 7.2

La conductividad específica del agua utilizada era de  $3.6 \times 10^{-6} \Omega^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

Una vez sumergidas las láminas en el sustrato, se dejaba caer en la superficie del mismo una solución benecónica al 1% de ácido esteárico, hasta cubrir aproximadamente las tres cuartas partes de la superficie total, limitando la superficie disponible por medio de un hilo parafinado de longitud apropiada. Para mantener constante la presión durante el depósito del film se empleó un pistón de ácido oleico, que fué purificado por el Dr. P. Cattaneo a partir del producto B.D.H.. Las constantes del producto final eran:

	Determinado	Tabulado
Indice de iodo	89.9	89.9
Indice de refracción a 20°C	1.4597	1.4597
Indice de refracción a 15°C	1.4613	1.4614

Dicha purificación fué necesaria ya que los resultados obtenidos con el ácido oleico original no eran reproducibles.

La primer monocapa se deposita sobre toda la superficie de la lámina retirando ésta lentamente a través del film de estearato de bario, por medio del dispositivo cuya fotografía puede verse en la Fig. 14, mediante el cual puede hacerse el depósito sobre seis láminas simultáneamente. T es un tornillo cuya rotación ocasiona el desplazamiento vertical de las láminas; la altura a la cual se sumergen las mismas puede controlarse por medio de la escala E.

---



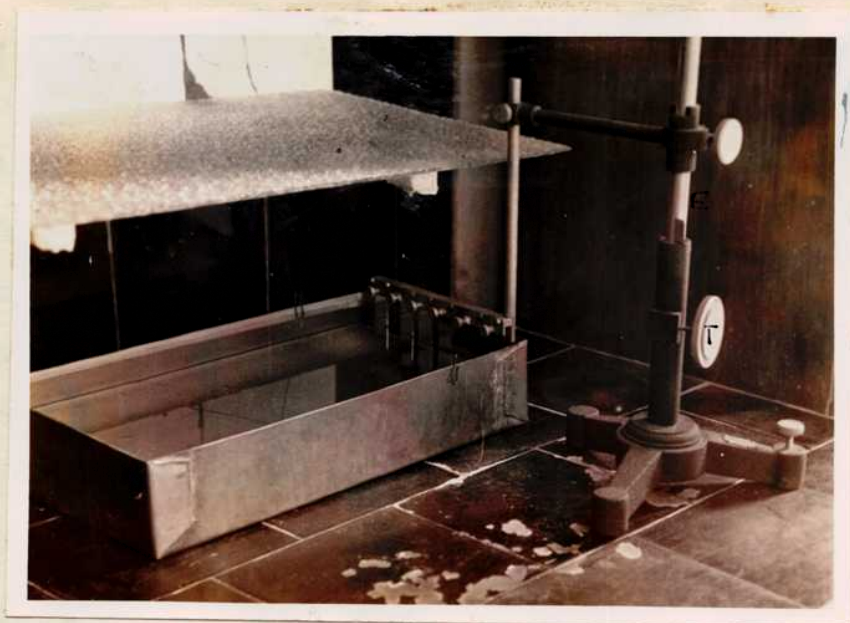


Fig. 14

En la mitad inferior de la lámina se depositan dos monocapas adicionales, sumergiéndola hasta una altura conveniente y retirándola luego.

La posición del analizador para la cual ambas mitades del campo aparecen de la misma intensidad da el cero del aparato.

Sobre toda la superficie de la lámina preparada en la forma descrita anteriormente se depositan sucesivamente 1, 2, 3, ... etc. dobles capas de estearato de bario, leyendo las distintas posiciones del analizador para las cuales se obtiene nuevamente la igualación de la intensidad de iluminación en ambos semicampos.

Si se representa ahora gráficamente la variación del ángulo de rotación del analizador por doble capa  $\Delta \alpha / \Delta N$  ( $\Delta \alpha$  = ángulo rotado por el analizador para cada doble capa de estearato depositada;  $N$  = número de dobles capas depositadas) en función de  $N$ , se obtiene una recta. Por lo tanto  $\Delta \alpha / \Delta N = a - b N$ , expresa el espesor óptico de un film en grados por doble capa en función del número de dobles capas depositadas sobre el "gage" de referencia 1-3. Como una doble capa de estearato tiene un es-

pesor de 48.8 Å, se puede asociar en un gráfico la altura de la barrera de estearato en Å (abscisas) con el incremento por doble capa (en ordenadas), o bien representar directamente, como ya se mencionó,  $\Delta \alpha / \Delta N$  en función de N. Si el número de capas depositadas es grande de modo que el espesor total es de 200-300 Å, la luz proveniente de la lámina de cuarto de onda tiene una elipticidad apreciable y resulta difícil igualar con precisión las dos mitades del campo.

La Tabla 6 y la Fig. 15 muestran los valores y el gráfico obtenidos en una operación de calibrado.

Tabla 6. Angulo de incidencia 69°. Posición del polarizador: 67°.

Posición de la lámina de cuarto de onda: 54.5° (Exp. No 84)

Posición del analizador	no. de dobles capas depositadas sobre el gage	$\Delta \alpha / \Delta N$
50.90	1	3.00
47.90	2	2.85
45.05	3	2.65
42.40	4	2.40
40.00	5	2.20
38.80	6	

El empleo de este método para la determinación de espesores de films de proteínas se basa en la suposición, confirmada experimentalmente, de que el índice de refracción de los mismos es igual que el correspondiente a los films de estearato de bario ( $n_D = 1.495$ ).

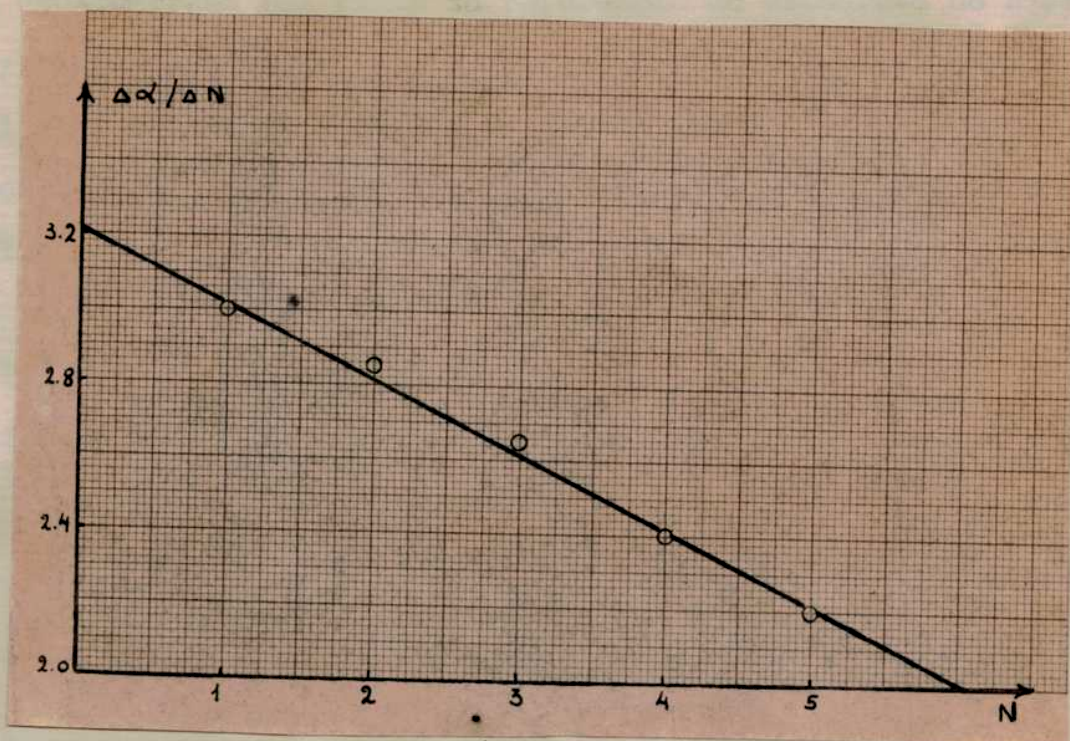


Fig. 15

Manera en que se condujeron las experiencias de determinación de espesores.

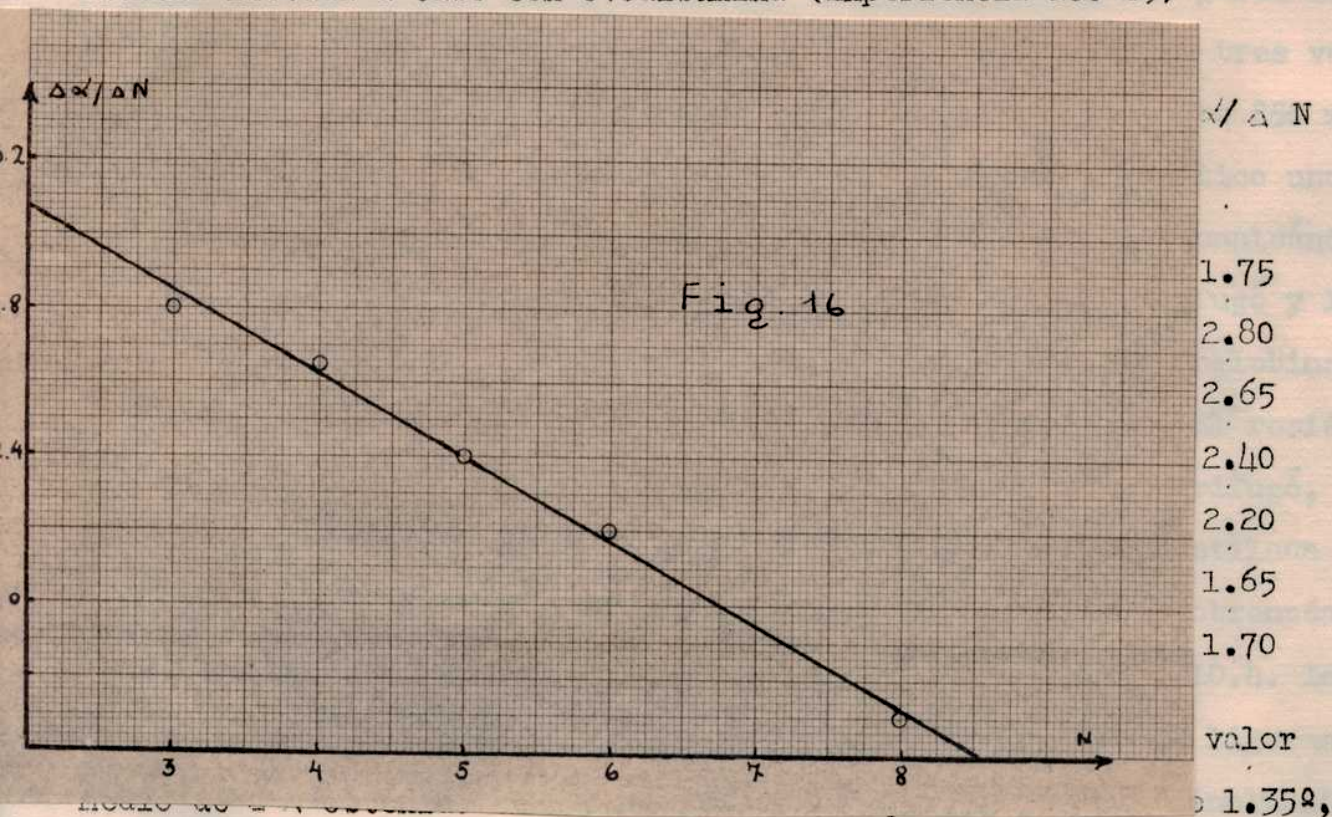
Una vez depositados los films de referencia de estearato de bario y leída la posición de cero del elipsómetro, se transfirió a la lámina metálica una doble capa de proteína, leyendo la nueva posición del analizador y determinando por medio de la curva de calibrado a que valor de N corresponde el  $\Delta\alpha$  hallado.

Los films de proteínas fueron extendidos sobre un sustrato de ClH 0.1 N y mantenidos durante el depósito a una presión superficial constante de 9 dinas/cm mediante el empleo de un pistón superficial de fosfato de o-tricresilo.

Con el fin de verificar si la curva de calibrado empleada era la correcta, resultó conveniente operar en la siguiente forma. Se depositó en la

forma acostumbrada los films de referencia de estearato de bario ("gage" 1-3) y la doble capa de proteína, y se continuó depositando luego sobre toda la lámina sucesivas dobles capas de estearato de bario, hallando los correspondientes valores  $\Delta \alpha / \Delta N$  y representándolos en función de N en la forma ya mencionada a partir de la primera monocapa depositada sobre el film de proteína.

La Tabla 7 y la Fig. 16 muestran los valores obtenidos en una experiencia llevada a cabo con ovoalbúmina (Experiencia No. 89)



lo que corresponde a un valor medio del espesor igual a 11 A, en concordancia con los datos mencionados en la literatura ( $\sim 10$  A).

Para la albúmina de bovino se obtuvo como promedio de los resultados de 20 experiencias un  $\Delta \alpha = 1.26^\circ$ , lo que corresponde a un valor de 9.7 A por monocapa.

forma acostumbrada los films de referencia de estearato de bario ("gage" 1-3) y la doble capa de proteína, y se continuó depositando luego sobre toda la lámina sucesivas dobles capas de estearato de bario, hallando los correspondientes valores  $\Delta \lambda / \Delta N$  y representándolos en función de N en la forma ya mencionada a partir de la primera monocapa depositada sobre el film de proteína.

La Tabla 7 y la Fig. 16 muestran los valores obtenidos en una experiencia llevada a cabo con ovoalbúmina (Experiencia No. 89)

Tabla 7

Posición del analizador	Número de dobles capas depositadas sobre el "gage" 1-3	$\Delta \lambda / \Delta N$
44.15	1	1.75
42.40	2 <sup>ovoalbúmina</sup>	2.80
39.60	3	2.65
36.95	4	2.40
34.55	5	2.20
32.35	6	1.65
30.70	7	1.70
29.00	8	

Lo que da un espesor por monocapa de proteína de 13.4 A. El valor medio de  $\Delta \lambda$  obtenido en una serie de 27 experiencias fué de 1.35 $\mu$ , lo que corresponde a un valor medio del espesor igual a 11 A, en concordancia con los datos mencionados en la literatura ( $\approx 10$  A).

Para la albúmina de bovino se obtuvo como promedio de los resultados de 20 experiencias un  $\Delta \lambda = 1.26\mu$ , lo que corresponde a un valor de 9.7 A por monocapa.

c) ESTUDIO DE PROTEINAS NUCLEARES

Esta parte del trabajo consistió en la preparación de la histona y el estudio de sus propiedades superficiales empleando los métodos anteriormente descritos.

Preparación de histona. Se extrajo la histona de los núcleos de glóbulos rojos de pollo, siguiendo el método de Kossel modificado por Bang (69).

Se partió de 500 ml de sangre de pollo a la que se había agregado como anticoagulante oxalato de sodio 0.1 N, en proporción de una parte de oxalato por cada nueve partes de sangre. Se centrifugó, lavando tres veces los glóbulos con solución fisiológica, obteniéndose finalmente 250 ml de glóbulos. Los núcleos se separaron usando como agente hemolítico una solución de saponina al 3% en buffer de fosfatos a pH 7 (70), empleándose 5 ml de esta solución por cada 100 ml de glóbulos. Se centrifugó y lavó repetidamente con solución fisiológica hasta eliminar la hemoglobina. La suspensión de núcleos así obtenida es de color amarillo. El residuo se agitó durante 4 horas con ClH 0.8%, luego de lo cual se centrifugó, y el sobrenadante límpido o algo turbio se dializó contra agua destilada hasta reacción negativa de cloruros. Se precipitó la histona del sobrenadante por agregado de NaOH 0.1 N hasta pH aproximadamente igual a 10.4. Inmediatamente se centrifugó y el precipitado se redisolvió en agua ligeramente clorhídrica, repitiendo este tratamiento dos o tres veces. Finalmente, el precipitado blanco de histona se lavó con poca agua, se redisolvió en agua ligeramente clorhídrica y se liofilizó. Se obtuvieron 600 mg de clorhidrato de histona, en forma de polvo blanco fácilmente soluble en agua.

Determinación del peso molecular medio de la fracción obtenida. Se obtuvieron los diagramas F-A correspondientes a films de histona, siguiendo la técnica ya descrita en las experiencias correspondientes a ovoalbúmina

---

y albúmina de bovino.

Para el depósito de los films se empleó una solución acuosa de clorhidrato de histona.

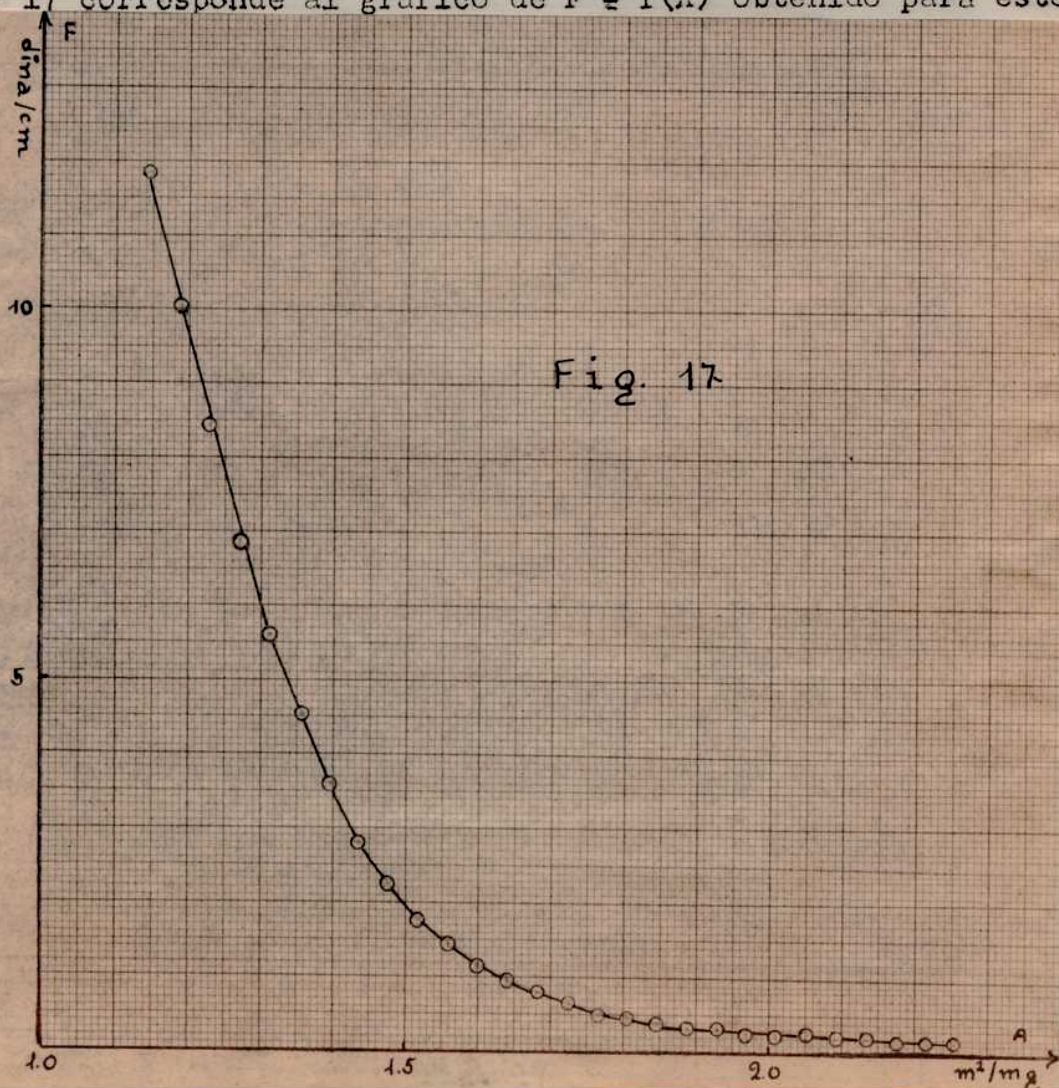
La Tabla 8 muestra los valores obtenidos en una experiencia representativa de la serie llevada a cabo con histona (Experiencia No. 49)

Tabla 8. Film de histona sobre sustrato de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  5%.  $\tau = 5$  min.  
Concentración superficial inicial  $0.42 \text{ mg/m}^2$ .  $\Delta\gamma = 102 \Delta G$ .  
 $T = 20^\circ\text{C}$ .

A ( $\text{m}^2/\text{mg}$ )	$\Delta G$ (mg)	$\Delta\gamma$ (dina/cm)	Cum $\Delta\gamma$ (dina/cm)	FA
2.255	1.5	0.153	0.153	0.345
2.214	0.0			
2.173	0.0			
2.132	0.5	0.051	0.204	0.435
2.091	0.0			
2.050	0.5	0.051	0.255	0.523
2.009	0.0			
1.968	0.0			
1.927	0.7	0.071	0.326	0.628
1.886	0.0			
1.845	0.5	0.051	0.377	0.695
1.804	0.7	0.071	0.448	0.808
1.763	0.5	0.051	0.499	0.879
1.722	1.5	0.153	0.652	1.123
1.681	1.5	0.153	0.805	1.353
1.640	1.5	0.153	0.958	1.571
1.599	2.0	0.204	1.162	
1.558	2.5	0.255	1.417	

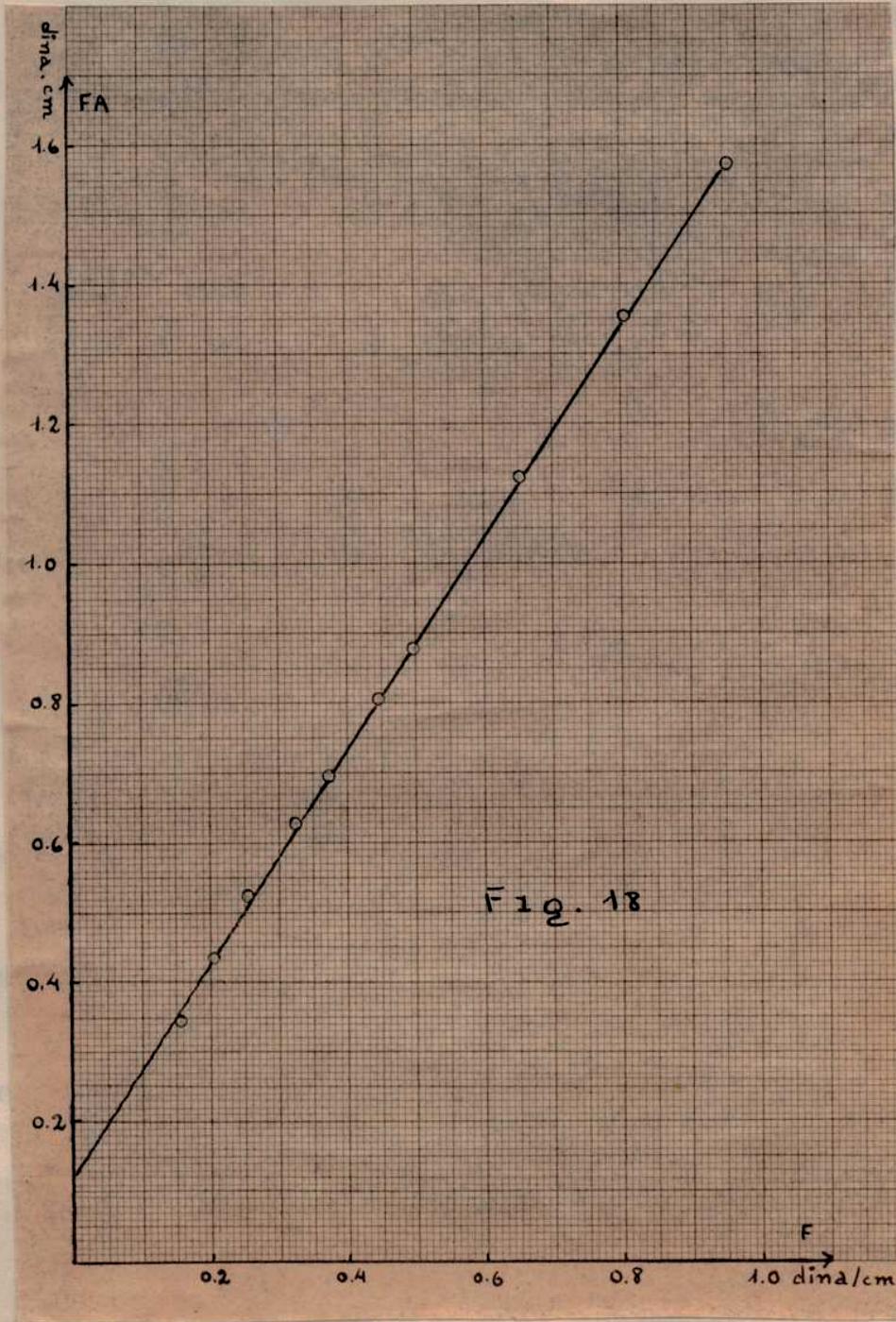
1.517	3.5	0.357	1.774
1.476	4.5	0.459	2.233
1.435	5.5	0.561	2.794
1.394	7.5	0.765	3.559
1.353	9.5	0.969	4.528
1.312	10.5	1.071	5.599
1.271	12.5	1.275	6.874
1.230	15.5	1.581	8.455
1.189	15.5	1.581	10.036
1.148	17.5	1.785	11.821
1.107	16.0	1.632	13.453

La Fig. 17 corresponde al gráfico de  $F = f(\Lambda)$  obtenido para estos datos





Región de bajas presiones. Se obtuvieron 9-10 valores de  $F$  comprendidos entre 0 y 1 dina/cm con los que trazaron los gráficos  $FA = f(F)$  tal como el que figura a continuación, correspondiente a los valores de la Tabla 8.



Mediante el método de cuadrados mínimos se obtuvieron los siguientes valores para el cálculo de la ecuación de la recta obtenida:

Tabla 9

F (x <sub>1</sub> )	A	FA (y <sub>1</sub> )	x <sub>1</sub> <sup>2</sup>	x <sub>1</sub> y <sub>1</sub>
0.153	2.255	0.345015	0.023409	0.052787
0.204	2.132	0.434928	0.041616	0.088725
0.255	2.050	0.522750	0.065025	0.133301
0.326	1.927	0.628202	0.106276	0.204793
0.377	1.845	0.695565	0.142129	0.262228
0.448	1.804	0.808192	0.200704	0.362070
0.499	1.763	0.879737	0.249001	0.438988
0.652	1.722	1.122744	0.425104	0.732029
0.805	1.681	1.353205	0.648025	1.089330
0.958	1.640	1.571120	0.917764	1.505132
4.677		Σ = 8.361458	Σ = 2.819053	Σ = 4.869383

$$10 \beta + 4.677 \alpha = 8.361$$

$$4.677 \beta + 2.819 \alpha = 4.869$$

lo que conduce a valores de

$$\beta = 0.126 \quad \alpha = 1.304$$

La ecuación de la recta es por lo tanto

$$FA = 1.304 F + 0.126$$

y el valor del peso molecular, teniendo en cuenta que se ha trabajado a 20°C

$$M_2 = 24.3 \cdot 10^2 / 0.126 = 19,285$$

Con el fin de verificar si la extensión había sido completa se llevaron a cabo experiencias empleando distintas concentraciones superficiales,

verificándose, como en el caso de la ovoalbúmina, que los valores obtenidos eran independientes de dicha concentración. En experiencias hechas a partir de una concentración superficial inicial de  $0.28 \text{ mg/m}^2$  se obtuvieron valores del peso molecular de 22,090 (Experiencia No. 63) y 16,310 (Experiencia No. 64).

Los valores obtenidos en una serie de experiencias fueron los siguientes:

Tabla 10

Peso molecular	Valor medio	$d_1$	$d_1^2$
20,250		2,175	4,730,625
19,917		1,842	3,392,964
19,285		1,210	1,464,100
16,420		1,655	2,739,025
15,676	18,075	2,399	5,755,201
14,127		3,948	15,586,704
15,379		2,696	7,268,416
22,293		4,218	17,791,524
20,250		2,175	4,730,625
17,154		921	848,241

lo que conduce a un valor del peso molecular de  $18,075 \pm 845$  (desviación standard  $\sigma_M = 845$ ). El valor del peso molecular de la histona obtenido por este método es pues de  $18,000 \pm 850$ .

Región de altas presiones. La Fig. 19 corresponde a la curva de compresibilidad de un film de histona sobre sustrato de sulfato de amonio al 5% trazado con los valores incluidos en la Tabla 8.

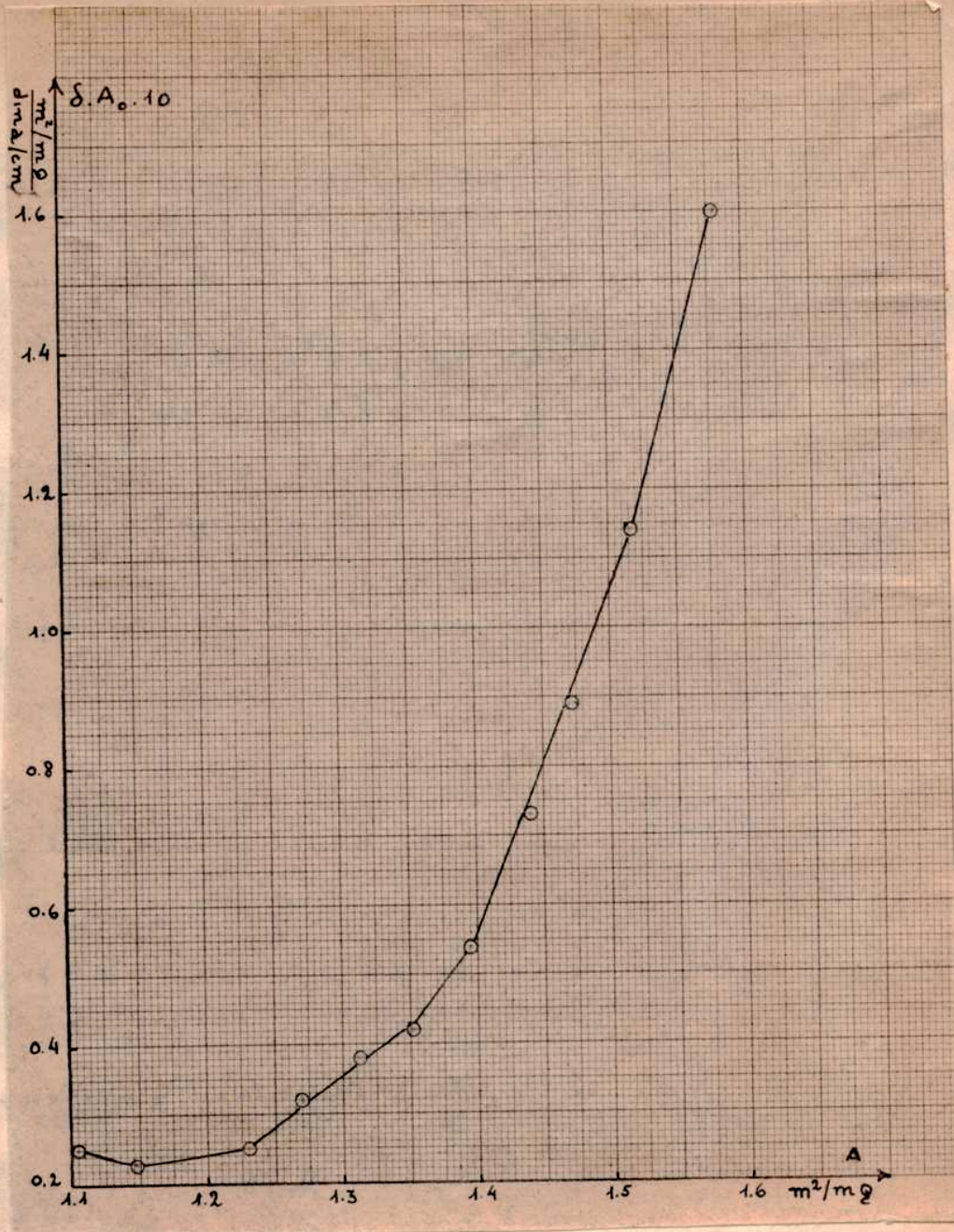


Fig. 19

Los valores obtenidos gráficamente son:

Presión de colapso: 12 dinas/cm

$A_m = 1.1 \text{ m}^2/\text{mg}$

Compresibilidad mínima: 0.015

Se estudió asimismo la importancia que tiene sobre el grado de extensión el tiempo transcurrido entre la formación del film y el comienzo de la compresión ( $\zeta$ ). La Fig. 20 muestra los resultados obtenidos. Los puntos se obtuvieron por interpolación en la curvas F-A obtenidas para  $\zeta$  igual a 5, 10, 15, y 30 minutos respectivamente. Puede observarse que dentro del intervalo considerado el área correspondiente a una dada presión es independiente de  $\zeta$ .

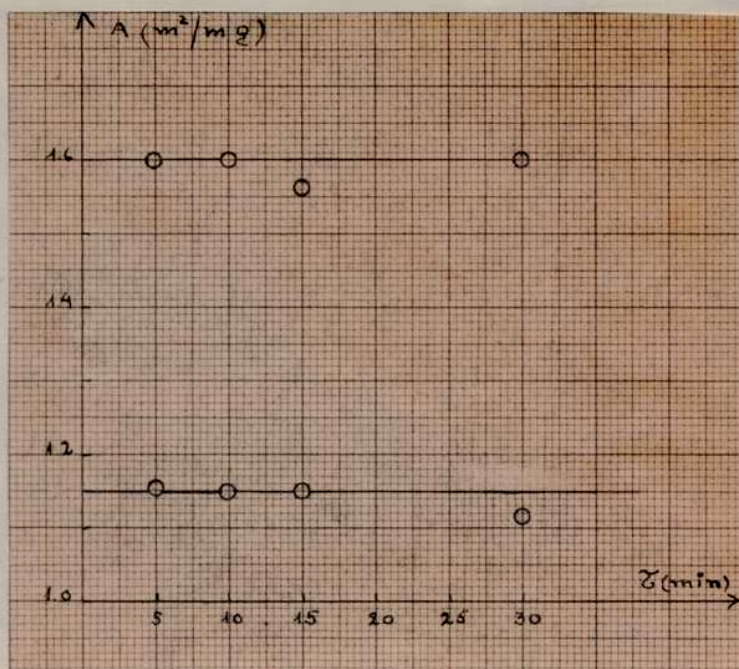


Fig. 20

Determinación del espesor correspondiente a los films de la fracción obtenida.

Se operó en la forma ya descrita para la ovoalbúmina. Al intentar trazar una curva de calibrado correspondiente al depósito de dobles capas de estearato de bario sobre films de histona, en forma semejante a como se operó para obtener la Fig. 16, se observó que el gráfico obtenido no era una recta, sino que presentaba la forma siguiente:

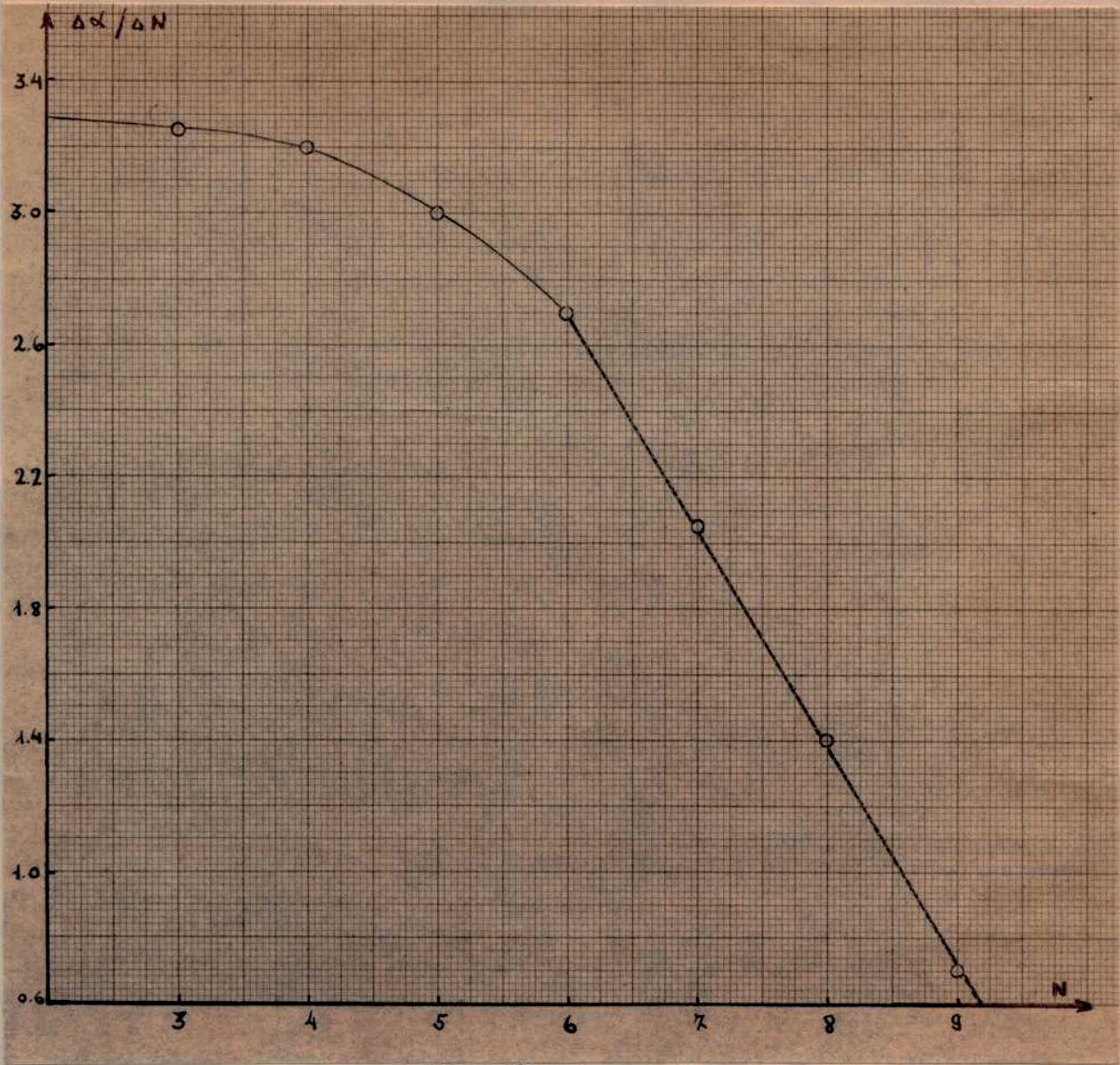


Fig. 21

Los valores empleados para el trazado del gráfico son los siguientes:

Tabla 11

Posición del analizador	No. de dobles capas depositadas sobre el "gage" 1-3	$\Delta\alpha/\Delta N$
49.85	1	0.95
50.80	2 <sub>histona</sub>	3.25
54.05	3	3.20
57.25	4	3.00
60.25	5	

60.25	5	2.70
62.95	6	2.05
65.00	7	1.40
66.40	8	0.70
67.10	9	

Lo que da un espesor por monocapa de proteína de 7.7 A. En una serie de 20 experiencias se obtuvo un valor medio del espesor igual a 8.7 A.

### III) DISCUSION DE LOS RESULTADOS.

Los resultados obtenidos en las determinaciones de los pesos moleculares de la ovoalbúmina cristalizada y albúmina de bovino con la técnica experimental descrita por nosotros, demuestran una concordancia completa entre los resultados obtenidos por este método y los obtenidos por otros autores con el método de Harkins-Anderson trabajando a  $l$  variable. La sensibilidad del método es, naturalmente, inferior a la que se obtiene con el dispositivo de escala y espejo, pero ampliamente suficiente para el estudio del comportamiento de un film monomolecular de proteína en la región gaseosa, a los efectos de la extrapolación de las curvas  $FA - f(F)$  para el cálculo de pesos<sup>o</sup> moleculares de proteínas extensibles en films monomoleculares. Creemos que el método tiene el doble interés de su simplicidad, ya que es de aplicación inmediata con los elementos comunes de laboratorio; y el de la verificación de las relaciones (1) por una vía experimental diferente.

Las limitaciones del método son fundamentalmente la condición de extensibilidad de la sustancia de la sustancia en estudio y, tratándose de proteínas, la posibilidad, durante la extensión, de una desnaturalización profunda consistente en un dislocamiento de la arquitectura molecular con formación de fragmentos de menor pesos molecular (disociaciones) o asocia-

---

iones que conducen a valores anormalmente altos para los pesos moleculares. Los casos diversos de disociación y asociación por extensión citados en la literatura indican la necesidad de juzgar con suma cautela los valores de  $M$  obtenidos con los métodos de química de superficies, particularmente cuando la proteína en estudio no ha sido investigada por otros métodos.

En cuanto a los otros parámetros que sirven para caracterizar el comportamiento superficial de un film, los resultados obtenidos con nuestra técnica para la ovoalbúmina y sueroalbúmina de bovino son comparables a los obtenidos por otros autores. En general, las presiones de colapso obtenidas (presión superficial correspondiente al punto de mínima compresibilidad) son algo inferiores a las registradas en la tabla de la página 15 para la ovoalbúmina se obtuvo  $F_m = 12.0$  dina/cm, y para la sueroalbúmina de bovino  $F_m = 12.0$  dina/cm, utilizando en ambos casos como sustrato sulfato de amonio al 5%. Los valores ligeramente inferiores de  $F_m$  se traducen en valores algo más altos para las áreas  $A_m$  correspondientes al punto de mínima compresibilidad, aunque las discrepancias entre los valores de  $A_m$  obtenidos y tabulados son mayores de las que podrían esperarse teniendo en cuenta las diferencias en los valores obtenidos para  $F_m$ . Debe tenerse en cuenta asimismo que los valores no son estrictamente comparables por cuanto son diferentes los sustratos utilizados. El valor de  $\int_m = .016$  para la compresibilidad mínima de la ovoalbúmina y albúmina de bovino se compara satisfactoriamente con los datos tabulados, que muestran una considerable influencia que puede tener la naturaleza del sustrato.

La barrera de lucite ideada por nosotros, con contactos laterales elásticos que aseguran una amplia superficie de protección contra pérdidas, y que opera semisumergida, exhibiendo un frente de varios milímetros por debajo y por encima del film, ha resultado muy satisfactoria, excluyendo

---



prácticamente toda posibilidad de pérdida. En la forma utilizada por nosotros no es indicada para el estudio de la reversibilidad de las curvas  $F - f(A)$ , pero es perfectamente adaptable a tal fin, lo que proyectamos ensayar experimentalmente.

El sustrato de ClH 0.1 N, como también el de  $SO_4(NH_4)_2$  5% han resultado aptos para lograr la extensión de la histona. Como ha sido señalado por Bull (21) los sustratos de sulfato de amonio se prestan mejor para la obtención de curvas de compresión reproducibles, razón por la cual lo hemos utilizado. Con ClH 0.1 N la extensión de la histona era un tanto variable, debido posiblemente a una extensión incompleta de la proteína depositada sobre la superficie.

Los valores de  $F_m = 12$  dinas/cm;  $\delta_m = 0.015$  y  $A_m = 1.1$  m<sup>2</sup>/mg obtenidos para la histona son del orden de los ya conocidos para otras proteínas. No hemos encontrado en la literatura referencias a estudios sobre proteínas tipo histona con los métodos de la química de superficies, salvo la mención por parte de H. Bull y H. Neurath de la imposibilidad de obtener films de protamina, aunque no mencionan las condiciones de trabajo ni sustrato empleado, y la descripción hecha por V. Shaefer de los "expansion patterns" de esta misma proteína.

El peso molecular de  $18,000 \pm 850$  obtenido por extrapolación de las curvas  $FA - f(F)$  para  $F \rightarrow 0$ , se corresponde con los valores medios de  $M$  descriptos para esta clase de proteínas, aún cuando los valores de  $M$  para histonas de células de diverso origen obtenidos por estudio de velocidades de sedimentación, se distribuyen en un amplio intervalo, habiendo sido descriptas histonas de  $M \approx 100,000$ . Los dos únicos ejemplos de proteínas de punto isoeléctrico mayor que 9.0, no pertenecientes a la clase de las histonas y protaminas, para las cuales se ha hecho una caracterización fisicoquímica amplia son la lisozima [ pI = 10.5-11.0,  $M =$

---

16,400 (71)] y el citocromo c [pI = 9.7, M = 15,600 (72)].

Dado que con los métodos superficiales se obtienen valores medios de M, queda abierta la posibilidad de que el valor de 18,000 corresponda al valor medio de un sistema de macromoléculas de distinto peso molecular, como parecen indicarlo los estudios electroforéticos y de velocidad de sedimentación efectuados con la histona. (68).

El valor de 8.7 Å obtenido para el espesor de un film monomolecular de la histona depositada a la presión superficial de 9 dinas/cm, se compara satisfactoriamente con el valor de ~ 10 Å obtenido para la casi totalidad de las proteínas estudiadas y que representaría el espesor de la cadena polipeptídica. Los valores obtenidos con el dispositivo de Rothen para los espesores de films monomoleculares de ovoalbúmina, albúmina de bovino e histona, representan valores medios satisfactoriamente reproducibles. En cambio, la medición de espesores de films de proteínas adsorbidos específicamente (interacción de antígeno y antisuero homólogo sin interposición de barreras "inertes") (37), proporcionaba datos altamente dependientes de las condiciones de lavado.

Un hecho que es interesante destacar es el efecto, en cierto modo específico de la histona, de determinar valores aproximadamente constantes para  $\Delta \alpha / \Delta N$  cuando se depositan dobles capas (N) de estearato de bario sobre una doble capa de histona, para valores pequeños de N. Al aumentar el número de dobles capas de estearato de bario, desaparece la influencia del lecho de histona depositada sobre el "gage" de referencia 1-3. No hemos observado tal efecto con la ovoalbúmina y albúmina de bovino; suponemos que éste debe estar asociado a alguna peculiaridad estructural de los films de histona, o puede ser dependiente de la composición de aminoácidos de la histona, con una marcada preponderancia de los aminoácidos básicos.

---

IV) RESUMEN

Se modificó el método de Harkins-Anderson para la determinación de presiones superficiales y se verificó la aplicabilidad del mismo determinando como control los pesos moleculares de ovoalbúmina y albúmina de bovino. Se encontró una buena concordancia entre estos valores y los hallados por Bull empleando el método original de Harkins-Anderson. Se propuso asimismo un nuevo tipo de barrera superficial.

Se montó un dispositivo (clipsómetro) para la determinación de espesores de films delgados, y se determinaron como control los espesores de films monomoleculares de ovoalbúmina y albúmina de bovino, encontrándose una concordancia satisfactoria con los datos mencionados en la literatura.

Se aplicaron los métodos mencionados al estudio de las propiedades superficiales de una fracción tipo histona obtenida a partir de núcleos de glóbulos rojos de pollo; obteniéndose un peso molecular medio de  $18,000 \pm 850$  y un espesor medio de 8.7 A por monocapa de proteína.

Se discutieron los resultados obtenidos, comparándolos con los mencionados en la literatura.

---

BIBLIOGRAFIA

- (1) Pockels: Nature, 43, 437 (1891)
  - (2) Rayleigh: Phil. Mag., 48, 337 (1899)
  - (3) Adam, N.K.: The Physics and Chemistry of surfaces, London University Press, 1941.
  - (4) Rideal, E.K.: Surface Chemistry, 1930
  - (5) Schulman, J.H. y Rideal, E.K.: Proc. Royal Soc. London, 130A, 259 (1931)
  - (6) Adam, N.K. y Harding, J.B.: Proc. Royal Soc. London, 138A, 411, (1932)
  - (7) Harkins, W.D.: J. Chem. Phys. 1, 852 (1933); 3, 693 (1935)
  - (8) Philippi, G. Th.: On the Nature of Proteins. Tesis, Univ. de Loiden (1936)
  - (9) Freundlich: Z. physikal. Chem., 128, 321; 130, 289 (1927)
  - (10) Tronstad: Trans. Faraday Soc., 29, 502 (1933); 31, 1151 (1935)
  - (11) Rothen, A.: J. Scient. Instr., 16, 26 (1945)
  - (12) Rothen, A.: Recent Advances in Protein Chemistry, III, 123 (1947)
  - (13) Harkins, W.D.: en Weissberger: Physical Methods of Organic Chemistry, I, Cap. VII
  - (14) Langmuir, I.: J. Am. Chem Soc., 1848 (1917)
  - (15) Adam y Jessop: Proc Royal Soc. 110A, 423 (1926)
  - (16) Harkins, W.D. y Myers, R.: J. Chem. Phys., 4, 716 (1936)
  - (17) Wilhelmy, L.: Ann. Physik, 119, 177 (1863)
  - (18) Dervichian, D.: J. phys. radium, 6, 221 (1935)
  - (19) Harkins, W.D. y Anderson, T.F.: J. Am. Chem. Soc., 59, 2189 (1937)
  - (20) Bull, H.: J. Biol. Chem.: 185, 27 (1950)
  - (21) Bull, H.: J. Am. Chem. Soc., 67, 4 (1945)
  - (22) Bull, H.: Recent Advances in Protein Chemistry, III, 95 (1947)
  - (23) Guastalla, J.: Compt. rend., 208, 973 (1939)
-

- (24) Mitchell, J.S.: Trans. Faraday Soc. 31, 980 (1935)
- (25) Bull, H.: Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol., 6, 140 (1938)
- (26) Neurath, H. y Bull, H.: Chem. Revs., 23, 391 (1938)
- (27) Bateman, J.B. y Chambers, L.A.: J. Chem. Phys., 7, 244 (1939)
- (28) Blodgett, K.: J. Am. Chem. Soc., 56, 495 (1934)
- (29) Blodgett, K.: J. Am. Chem. Soc., 57, 1007 (1935)
- (30) Langmuir, I.: Proc. Royal Soc. London, 170A, 1 (1939)
- (31) Langmuir, I. y Shaefer, V.J.: J. Am. Chem. Soc., 59, 2075 (1937)
- (32) Langmuir, I. y Shaefer, V.J.: Chem. Revs., 24, 181 (1939)
- (33) Blodgett, K. y Langmuir, I.: Phys. Rev., 51, 964 (1937)
- (34) Drude, P.: Ann. d. Physik u. Chemie, 39, 481 (1890)
- (35) Rothen, A. y Hanson, M.; Rev. Scient. Instr., 20, 66 (1949)
- (36) Rothen, A. y Nauson: Rev. Scient. Instr., 19, 839 (1948)
- (37) Rothen, A.: J. Biol. Chem., 168, 75 (1947)
- (38) Trurnit, H.J.: Science, III, 1 (1950)
- (39) Rothen, A.: Helvetica Chim. Acta, XXXIII, 834 (1950)
- (40) Gorter, E.: Ann. Rev. Biochem. X, 619 (1941)
- (41) Langmuir, I.: Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol., 6, 171 (1938)
- (42) Hughes, A.H. y Rideal, E.K.: Proc. Royal Soc. London, 137A, 62 (1932)
- (43) Zocheř, H. y Stiebel, F.: Z. physikal. Chemie, 147, 401 (1930)
- (44) Gorter, E. y Grenđel, F.: Proc. Acad. Sci. Amsterdam, 29, 371 (1925)
- (45) Hughes, A.H.: Trans. Faraday Soc., 29, 214 (1933)
- (46) Fosbinder, R.J.: J. Franklin Inst. 215, 579 (1933)
- (47) Gorter, E.: Proc. K. Akad. Wetensch. Amsterdam, 35, 838 (1932)
- (48) Gorter, E.: ibid. , 37, 20 (1934)
- (49) Gorter, E. y Van Ormond, J.: Biochem. J., 29, 48 (1935)
- (50) Gorter, E. et al.: Proc. K. Akad. Wetensch. Amsterdam, 37, 20 (1934)
- (51) Gorter, E. y Van Ormond, J.: Biochem. J., 29, 381 (1935)

- (52) Gorter, E.: Proc. Acad. Sci. Amsterdam, 37, 20 (1934)
- (53) Seastone, C.V.: J. Gen. Physiol, 21, 261 (1938)
- (54) Mitchell, J.S.: Trans Faraday Soc., 33, 1129 (1937)
- (55) Shaefer, V.: J. Phys. Chem., 42, 1089 (1938)
- (56) Gorter, E.: The Chemistry of Aminoacids and Proteins (1938)
- (57) Crowfoot, D.: Chem. Revs., 28, 215 (1941)
- (58) Astbury, W.T.: Nature, 137, 803 (1936)
- (59) Pauling, L.: J. Am. Chem. Soc., 62, 2643 (1940)
- (60) Dervichian, D.: J. Chem. Phys., 11, 236 (1943)
- (61) Boyes-Watson, J. y Perutz, M.F.: Nature, 714 (1943)
- (62) Miescher, F.: Die histochemischen und physiologischen Arbeiten, Vol. II, Leipzig, 1897.
- (63) Greenstein, J. Adv. Prot. Chem. I, 210 (1944)
- (64) Kossel, A.: Protamines and Histones. Longmans, Green & Co.
- (65) Stedman y Stedman: Nature, 152, 267 (1943)
- (66) Stedman y Stedman: Nature, 152, 556 (1943)
- (67) Lajmanovich, S. y Mittelman, N.: Rev. Inst. Bact. "Carlos G. Malbrán", XII, 320 (1944)
- (68) Mittelman, N.: Estudio electroforético y ultracentrífugo de la histona de eritrocitos de pollo. Trabajo de Adscripción (a publicarse), 1951.
- (69) Bang, I.: Z. fur physiol. Chem., 27, 463 (1899)
- (70) Dounce y Tien Ho Lan: Science, 97, 584 (1943)
- (71) Alderton, G., Ward, W.H. y Fevold, F.H.: J. Biol. Chem., 157, 43 (1945)
- (72) Svodberg, Th. y Pedersen, K.O.: The Ultracentrifuge, Oxford, At the Clarendon Press, 1940.
-