

Tesis de Posgrado

Aplicación de resinas de intercambio iónico al análisis de orina

Scaglia, Roberto Mario

1959

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

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

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

Cita tipo APA:

Scaglia, Roberto Mario. (1959). Aplicación de resinas de intercambio iónico al análisis de orina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1003_Scaglia.pdf

Cita tipo Chicago:

Scaglia, Roberto Mario. "Aplicación de resinas de intercambio iónico al análisis de orina". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1959.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1003_Scaglia.pdf

A. 03

I. 19-3

Resumen de tesis

Aplicación de resinas de intercambio iónico al análisis
de orina.

por:

Roberto Mario Scaglia

Tesis para optar al título de Doctor en Química.
(orientación Química Analítica)

padrino de tesis: Doctor Ventura Morera.

Parte General

En el presente trabajo se ha revisado la bibliografía existente sobre las aplicaciones biológicas de las resinas intercambiadoras de iones, especialmente las que se refieren a sangre y orina.

Parte Experimental

Se ensayó la técnica de Sullmann para determinación de bases totales en diferentes muestras de orina, habiéndose encontrado resultados reproducibles.

Se valoraron las bases totales por dicha técnica en orinas de personas normales sometidas a dietas acidificantes, alcalizantes y mixtas.

En personas normales con dietas acidificantes se obtuvieron cifras comprendidas entre 192 y 238 meq/lt. (7,68-9,52 grs. HONa/lt.).

En personas normales sometidas a dietas alcalizantes se obtuvieron cifras comprendidas entre 358,6 y 388 meq/lt. (13,34-

Res. de Tesis: 1002

15,52 grs.HONa/lt.).

En personas normales con dietas mixtas se obtuvieron cifras comprendidas entre 294 y 326 meq/lt. (11,76-13,04 grs. HONa/lt.).

También se determinaron bases totales por el mismo método en orina de diabéticos. Sobre trece orinas de diabéticos sin cuerpos cetónicos se ha encontrado un valor mínimo de 100 meq/lt. (4 grs.HONa/lt.) y un máximo de 340 meq/lt. (13,6 grs.HONa/lt.).

En el análisis de treinta y dos muestras de orina de diabéticos conteniendo cuerpos cetónicos se ha observado un valor mínimo de 92 meq/lt. (3,68 grs.HONa/lt.) y un máximo de 280 meq/lt. (11,20 grs.HONa/lt.).

Se realizaron también algunos ensayos aislados para tratar de separar entre sí los cuerpos cetónicos en orina. Los ensayos cualitativos realizados revelan en la mayoría de los casos (siete sobre nueve) una fijación del ácido acetoacético, ó de sus compuestos por la resina empleada.

Estos últimos resultados muestran una interesante vía para estudios futuros.-



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

APLICACION DE RESINAS DE INTERCAMBIO IONICO
AL ANALISIS DE ORINA

por

ROBERTO MARIO SCAGLIA

T E S I S

para optar al título de

DOCTOR EN QUIMICA

(Orientación Química Analítica)

TESIS! 1003

Buenos Aires

1 9 5 9

A M I S P A D R E S :

Padrino de Tesis:

Dr. VENTURA MORERA

Al Dr. Ventura Morera, Profesor Titular de Análisis Biológicos, mi más amplio y sincero reconocimiento, por haber tomado bajo su dirección el presente trabajo, constantemente orientado con sus valiosas indicaciones.-

Asimismo, agradezco sinceramente a la Dra. Rosa M. Ferro, por su amabilidad de colaborar en la corrección de los originales de esta tesis.-

FOOTBALL

I N D I C E

Introducción.-

Aplicaciones bioquímicas de sustancias intercambiadoras de iones.

	Pág.
I) Consideraciones generales.	1
II) Vitaminas	4
III) Aminoácidos	12
IV) Acido nucleico y compuestos con él relacionados	16
V) Carbohidratos	20
VI) Virus	24
VII) Bacterias.	26
VIII) Antibióticos	36
IX) Alcaloides	46
X) Investigaciones cromatográficas de hormonas no esteroides	52
XI) Enzimas	57
XII) Aplicaciones de las resinas de intercambio en Hematología.	59
XIII) Aplicaciones de sustancias intercambiadoras de iones en Urología.	70
XIV) Bases totales en líquidos biológicos	94

Parte Experimental

I) Determinación de bases totales en orina	108
II) Determinación de bases totales en orinas de personas sometidas a dietas alcalizantes, acidificantes y mixtas.	121
III) Determinación de bases totales en orinas de diabéticos.	125

IV) Separación de los ácidos b-hidroxibutírico y acetoacético de la acetona en orina mediante resinas intercambiadoras.

128

Conclusiones.

INTRODUCCION

El objeto del presente trabajo, fué estudiar algunas aplicaciones prácticas de resinas intercambiadoras de iones, a los análisis corrientes de orina.

En dicho líquido orgánico, la aplicación de estas resinas, resulta particularmente interesante en ciertas determinaciones, tales como la estimación de bases totales. A este último tipo de valoraciones, hemos prestado preferente atención.

Estas técnicas pueden también resultar de interés, para separación de cuerpos cetónicos, o de mezclas de aminoácidos en casos especiales.

Pueden también tener especial interés en determinaciones toxicológicas, para la separación de alcaloides y metales tóxicos, contribuyendo así a su purificación y posterior reconocimiento.

Con respecto a la composición, obtención, propiedades y naturaleza del proceso de intercambio iónico de las resinas, puede consultarse el trabajo de tesis de Ana Cotello⁽¹⁾ donde estos temas han sido tratados con todo detalle.

Bibliografía:

- (1) - COTELLO Ana: Resinas sintéticas intercambiadoras de iones. Preparación de resinas intercambiadoras de cationes con materias primas nacionales. Tesis 1950. F.C.E.F. y N. de Buenos Aires.-

APLICACIONES BIOQUIMICAS DE SUSTANCIAS
INTERCAMBIADORAS DE IONES

CONSIDERACIONES GENERALES

El desarrollo de las aplicaciones bioquímicas de las resinas de intercambio y sustancias relacionadas con ellas, da en cierta medida una base para la aplicación de estos agentes en medicina.

El desarrollo de membranas plásticas semi permeables por la Ionics Inc., de Cambridge, Massachusetts, fué de gran importancia por su aplicación económica. Estas resinas de intercambio iónico en forma de membrana, permiten en combinación con la energía eléctrica, la desionización de aguas salobres a precios que permiten su aplicación práctica.

El funcionamiento de estos sistemas, es menos costoso que la usual destilación y condensación y permitiría a vastas áreas del mundo, ahora virtualmente inhabitables, ser convertidas en oasis artificiales.

La evidente semejanza de estas membranas con aquellas de similar importancia, en biología, sugiere un gran desarrollo futuro para el estudio en investigaciones biológicas y médicas fundamentales. Una aplicación posible sería la realización de riñones artificiales. Podría también, considerarse la posible creación de un tracto gastro-intestinal artificial en base a estas resinas. Como se ve, el futuro se presenta brillante en la aplicación de membranas formadas por resinas de intercambio iónico.

Otro nuevo e importante desarrollo, es el de la familia de los polímeros basados en la hidroquinona, que intereag

bian electrones.

En general, los mecanismos enzimáticos, pueden ser considerados como sistemas transportadores en la transferencia de electrones. En la actualidad se dispone de resinas que facilitan las reacciones de oxidación-reducción.

De los primeros esfuerzos de Harold Cassidy de la Universidad de Yale en este campo, surgieron aplicaciones industriales y médicas. Se demostró mediante estas experiencias la transferencia de protones (transferencia del ión hidrógeno).

La transferencia protónica en la medicina se aplica en el tratamiento de úlceras y en el uso de intercambiadores aniónicos; similarmente, la extracción de sodio por medio de intercambiadores catiónicos, representa otra aplicación de transferencia protónica.

Los bioquímicos están estudiando el uso de films de estos polímeros "cede-electrones", como modelos para el efecto de potenciales redox sobre humores transportados a través de membranas y para el estudio de las fuerzas impulsantes implicadas en el transporte de los mismos.

El presente y futuro uso médico de las resinas, desde el punto de vista del actual conocimiento bioquímico, se orienta, en principio, a la necesidad de tener en cuenta materiales de intercambio solubles ó insolubles, así como la característica de queladores ("chelators") de los intercambiadores de iones, ya sean solubles ó insolubles.

La administración oral de resinas de intercambio para la modificación bioquímica del tracto gastro-intestinal, tiene su corolario en el uso parenteral de productos químicos intercambiadores de iones solubles.

En base a nuestros conocimientos sobre usos bioquímicos, de las resinas de intercambio iónico, ciertos efectos perjudiciales de las resinas de intercambio iónico, pueden ser relacionados con la eliminación de sustancias del metabolismo normal. Así en la aplicación de intercambiadores de cationes, para la eliminación de sodio, se produce también la eliminación del potasio, puesto que el intercambiador actúa frente a ambos en igual forma.

Las posibilidades para crear nuevas resinas son virtualmente ilimitadas. Recientemente, Broser y Lautsch (1951)⁽¹⁾, han copolimerizado estireno y metilfecorbido, siendo el último un producto químico de degradación de la clorofila. En la misma forma se trata de copolimerizar estireno con el ester dibencílico de la protoporfirina (derivado de un producto de degradación de la hemoglobina).

No es posible por ahora, predecir aplicaciones de tales unidades poliméricas, puesto que están formadas por monómeros naturales y sintéticos.-

Bibliografía:

- (1) - BROSER W. y LAUTSCH W., Naturwissenschaften, 208: 38, 1951.

V I T A M I N A S

Las sustancias intercambiadoras de iones han encontrado considerable aplicación en el fraccionamiento de las vitaminas tanto naturales como sintéticas. Este fraccionamiento es realizado a menudo como una etapa en la concentración o separación de una determinada vitamina en particular. El intercambio iónico puede servir también como un medio para la eliminación de ciertas sustancias que acompañan a las vitaminas en su estado natural y que interfieren de una u otra manera en la valoración de las vitaminas.

La aplicación de los procesos de intercambio iónico, está basada frecuentemente en el carácter iónico, ya sea de las vitaminas ó de sus impurezas. Sin embargo, en ciertos casos el material de intercambio iónico, parece funcionar solo como un adsorbente, puesto que el material aparentemente adsorbido es de carácter no iónico.

El uso de materiales de intercambio en la purificación de vitaminas liposolubles, depende mucho más de un fenómeno de adsorción, que de intercambio iónico.

La separación de las impurezas de una vitamina puede involucrar, ya sea intercambiadores aniónicos ó catiónicos, ó ambos a la vez. Si una vitamina es fijada por un intercambiador iónico, mientras que las impurezas no lo son, o lo son solo parcialmente, puede efectuarse su purificación. Cuando las impurezas acompañan a dicha vitamina en la fijación, ambas pueden ser separadas si están presentes en dife-

rentes extractos, en una columna de intercambiador. La separación mecánica de estos extractos y la elusión por separado de ambos, llevará a los resultados deseados. Una elusión diferencial, por la cual la vitamina y las impurezas son eluidas, en diferentes proporciones, puede ser efectiva en la purificación de la vitamina, cuando ambas han sido fijadas en el agente de intercambio. Aquí, un eluyente selectivo y el control de las condiciones de trabajo, tales como temperatura, velocidad de pasaje, concentración del eluyente y pH, ha demostrado ser de importancia decisiva.

En los primeros períodos de investigación en el complejo de vitamina B, los procedimientos de separación por precipitación, filtración y lavado, y métodos similares fueron pronto reemplazados por adsorción en tierra de "Fuller" (Windaus y col., 1932)⁽¹⁾. Con el desarrollo del conocimiento en este campo, se supo que la adsorción del complejo B en los silicatos naturales era debido por lo menos parcialmente, al fenómeno de intercambio catiónico.

Estas primeras observaciones condujeron lógicamente a la aplicación de resinas de intercambio catiónico para estos propósitos.

El uso de un proceso de intercambio iónico en el campo de la química de las vitaminas, fué dado a conocer por primera vez, por Cerecedo y sus colaboradores^(2,3,4). El material de intercambio iónico usado en este trabajo fué "Decalco", una zeolita artificial (silicato de sodio y aluminio).

Recientemente, el advenimiento de los agentes de

intercambio iónico orgánicos sintéticos, ya sean aniónicos ó catiónicos, ha llevado a muy extensas aplicaciones de este material en el campo de las vitaminas. Hay aún muchos temas en los cuales estos materiales tan útiles pueden encontrar aplicación adicional.

Cualquier vitamina formando una unidad catiónica es separada de una solución de pH apropiado, por un intercambiador de cationes y similarmente cualquier vitamina formando un anión, bajo condiciones adecuadas, es separada por un intercambiador de aniones.

Además de la tiamina, entre las vitaminas, que presumiblemente pueden experimentar intercambio catiónico, están la colina, piridoxina, piridexamina, piridoxal. Sólo para la piridoxina han aparecido informes sobre trabajos de intercambio catiónico.

Varias de las vitaminas son suficientemente ácidas para experimentar intercambio aniónico. Estan en este grupo el ácido ascórbico, ácido nicotínico, biotina, ácido p-aminobenzoico, ácido fólico y compuestos relacionados a éste y los ésteres ácidos del fosfórico o pirofosfórico de algunas vitaminas. Este último grupo incluiría los ésteres de la riboflavina⁽⁵⁾, piridoxal⁽⁶⁾, piridexamina^(7,8), inositol⁽⁹⁾ y tiamina⁽¹⁰⁾. Aquí otra vez se ha sacado ventaja del proceso de intercambio iónico en relativamente pocos casos.

Algunas de las vitaminas pueden existir, en más de una forma química, en sus fuentes naturales o aún en preparaciones farmacéuticas. Ejemplos de estas son la existencia de

tiamina, en su forma disulfuro⁽¹¹⁾ y los ésteres fosfóricos de ésta, riboflavina y sus ésteres, los miembros del grupo de la Vitamina B₆, ácidos ascórbicos y deshidroascórbicos, inositol y sus ésteres y ácido pantoténico y pantotenol⁽¹²⁾.

Debido a que estas formas difieren en su carácter iónico, el intercambio iónico ofrecería una base práctica para la separación. El uso de intercambio iónico para este propósito está aún poco estudiado.

Tiamina: El uso de un proceso de intercambio iónico, para la separación de esta vitamina, de sus impurezas, presentes en su fuente natural, fué dado a conocer en 1937 por Cerecedo y sus ayudantes (2,3,4 loc.cit.) - es una etapa en la separación de Tiamina de la cáscara de arroz, levadura y germen de trigo - desarrollaron un método estandarizado de análisis para tiamina, en el cual, la purificación por intercambio catiónico, tiene gran importancia^(13,14).

El remplazo de las arcillas, por la zeolita sintética "Decalso", en la investigación de tiamina por el método del tiocromo, condujo a un notable adelanto en la seguridad de este proceso^(13,15). Debido a la gran selectividad del proceso de intercambio iónico, Melnick y Field⁽¹⁶⁾ han encontrado que el "Decalso" activado, es efectivo en la preparación de materiales biológicos, para la investigación de tiamina por un método colorimétrico, en el cual el reactivo es p-aminoacetofenona diazotada.

Recientemente, ciertas resinas sintéticas, de intercambio catiónico, han demostrado fijar tiamina de sus soluciones y liberarla cuando son tratadas con soluciones

salinas acuosas ó ácidos diluidos (17, 18, 19).

Sin embargo, hay una mayor experiencia en el uso de "Decalso" para este proceso, no solo con soluciones puras de tiamina, sino también con extractos de productos naturales. "Decalso" tiene gran afinidad con la tiamina, la fija casi cuantitativamente en presencia de otros cationes, cuyas concentraciones pueden ser 10^5 veces la de la tiamina.

Herr (1945)⁽¹⁷⁾, utilizando los principios de adsorción cromatográfica ó intercambio catiónico, separó tiamina de riboflavina. La última molécula no puede actuar como un catión y por lo tanto es separada de la tiamina. Para propósitos prácticos el proceso dió resultados deficientes, ya que fueron requeridas elevadas concentraciones de ácidos minerales (30-37%) para la separación de la vitamina (tiamina de la resina).

Grupo vitamínico B₆: La absorción sobre "Decalso", con la subsiguiente elusión por cloruro de potasio, casillente al 10%, fué propuesto por Scudi y colaboradores^(20,21) como paso preliminar en la determinación colorimétrica de la vitamina B₆.

Brown y sus colaboradores⁽²²⁾, usaron "Amberlite" IB-4 en grado analítico ó "Decalso" para eliminar interferencias antes de analizar vitamina B₆ por el método colorimétrico que emplea p-aminoacetofenona diazotada.

Vitamina B₁₂: Es separada en virtud de su magnitud molecular más bien que por su forma iónica (Pfiffner y colaboradores, 1946⁽²³⁾).

Acido ascórbico: La fijación de ácido ascórbico de extractos acuosos al 0,2% provenientes de corteza de nogal, fue realizada en 1950 por Klose y colaboradores⁽²⁴⁾ mediante el uso de "Amberlite" IB-4 y "Amberlite" IB-4B, regeneradas con HCl 2N.

La probabilidad de separación de vitaminas nutritivas por adsorción y por materiales intercambiadores de iones es real. Así lo demostró Messerli en 1922⁽²⁵⁾, quién encontró que las ratas y palomas, alimentadas a dieta de arroz pelado, desarrollaron una avitaminosis más rápida y más severa, que si se hubiera añadido carbón o caolín a la dieta.

Melnick y colaboradores (1945)⁽²⁶⁾, extendieron estos estudios al ser humano y encontraron que mientras la tierra de "Fuller" redujo marcadamente la disponibilidad de tiamina, el caolín no interfirió con la utilización de este factor.-

Bibliografía:

- (1) - WINDAUS, A., TSCHESCHE, R., RUMKOPF, H., LAQUER, F. y SHULTZ, F., Ztschr. Physiol.Chem., 123: 204, 1932.
- (2) - CERECEDO, L.R. y HENNESSY, D.J., J.Am. Chem. Soc., 1617: 59, 1937.
- (3) - CERECEDO, L.R. y KASZUBA, F.J., J.Am.Chem. Soc., 1619: 59, 1937.
- (4) - CERECEDO, L.R. y THORNTON, J.J., J.Am.Chem. Soc., 1621: 59, 1937.
- (5) - KUHN, R. y RUDY W., Z.Physiol.Chem.(Hoppe-Seyler's) 47: 239, 1937.

- (6) - GUNSAEUS, I.C., BELLAMY, W.D. y UMBREIT, W.W., J. Biol. Chem. 685: 155, 1944.
- (7) - PETERSON, E.A., SOBER, H.A. y MEISTER, A., J. Am. Chem. Soc., 570: 74, 1952.
- (8) - PETERSON, E.A. y SOBER, H.A., J. Am. Chem. Soc., 169: 76, 1954.
- (9) - ANDERSON, R.J., J. Biol. Chem., 463: 20, 1915.
- (10) - LOHMANN, K. y SCHUSTER, P., Biochem. Z., 188: 294, 1937.
- (11) - ZIMA, O. y WILLIAMS, R.R., Ber., 941: 73B, 1940.
- (12) - WOLLISH, E.G. y SCHMALL, M., Anal. Chem., 1033: 22, 1950.
- (13) - HENNESSY, D.J. y CERECEDO, L.R., J. Am. Chem. Soc., 179: 61, 1939.
- (14) - HENNESSY, D.J., Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 216: 13, 1941.
- (15) - ELVIDGE, W.F., Quart. J. Pharm. and Pharmacol., 257: 20, 1947.
- (16) - MELNICK, D. y FIELD, H., Jr., J. Biol. Chem., 515: 127, 1939.
- (17) - HERR, D.S., Ind. Eng. Chem., 631: 37, 1945.
- (18) - MYERS, F.J., Ind. Eng. Chem., 858: 35, 1943.
- (19) - WINTERS, J.C. y KUNIN, R., Ind. Eng. Chem., 460: 41, 1949.
- (20) - SCUDI, J.V., J. Biol. Chem., 707: 139, 1941.
- (21) - SCUDI, J.V., KOONES, H.F. y KERESZTESY, J.C., Proc. Am. J. Physiol. 459: 129, 1940.
- (22) - BROWN, E.B., BINA, R.F. y THOMAS, J.M. J. Biol. Chem. 455: 158, 1945.
- (23) - PFIFFNER, J.J., BINKLEY, S.B., BLOOM, E.S. y EMMETT, A.D. U.S. Patent 2.407.096, set. 3, 1946.

- (24) - KLOSE, A.A., STARK, J.B., PURVIS, G.G., PEAT, J. y FEVOLD, H.L., Ind. Eng. Chem., 387:42, 1950.
- (25) - MESSERLI, N., Arch. Internat. Physiol., 103:19, 1922.
- (26) - MELNICK, D., HOCHBERG, M. y OSER, B.L., J. Nutrition, 233:30, 1945.-

A M I N O A C I D O S

La mezcla de aminoácidos libres, o derivados de bajo peso molecular (péptidos, ésteres de fosfatos, etc.) que se encuentran en sistemas biológicos, o humores del cuerpo humano, dializados de tejidos, ó hidrolizados de proteínas, pueden ser parcial o completamente separados en sus componentes constituyentes por diversos medios: distribución a contra corriente ienoforesis, cromatografía en papel y finalmente por intercambio iónico.

Las nuevas resinas sintéticas de intercambio iónico disponibles comercialmente, en virtud de su gran capacidad de intercambio, alta estabilidad química, gran poder de resolución, y la potencialidad de ser sintetizadas con propiedades específicas de intercambio, han demostrado, en general, ser superiores a las zeolitas inorgánicas, tierras blancas u óxidos metálicos en la separación de mezclas de aminoácidos.

Hay tres tipos de aminoácidos: básicos; incluyen de arginina, histidina, lisina y quizás triptofano; ácidos como el glutámico y aspártico y finalmente los neutros como la glicina, alanina y valina. Las características de acidez ó basicidad determinarían la posible reacción con resinas aniónicas y catiónicas, pero otras características pueden estar comprometidas en las reacciones de adsorción directa. Los aminoácidos aromáticos tirosina, triptófano y fenilalanina deben considerarse como un grupo en la consideración del fenómeno de adsorción relativo a los aminoácidos.

Los aminoácidos pueden ser separados de hidrolizados de proteínas y preparaciones similares por una diversidad de materiales. Whitehorn (1923)⁽¹⁾, encontró que con "Permutita", zeolita sintética de ciclo sodio (silicato de sodio y aluminio), podrían ser separadas arginina, lisina y algo de histidina. También poseen un poder similar, "Decalso" (Nelson y colab. 1946)⁽²⁾ y "Silicogel" (Schramm y Primosigh, 1944)⁽³⁾. Además de las zeolitas inorgánicas, también se desempeña efectivamente en la adsorción de aminoácidos básicos (Ackermann y Fuchs, 1936)⁽⁴⁾, el reactivo de "Lloyd". Otra clase general de materiales para separación de aminoácidos básicos son los óxidos metálicos. Por ej., óxido de aluminio para las separaciones de aminoácidos básicos de soluciones neutras, Wieland (1942)⁽⁵⁾.

Klock (1942-1945)⁽⁶⁻⁷⁾, y Fraudenberg y colaboradores (1942)⁽⁸⁾, aplicaron a la separación de aminoácidos básicos las resinas de intercambio catiónico. A partir de sus observaciones estos investigadores desarrollaron una técnica para el fraccionamiento de aminoácidos en tres grupos: los ácidos, retenidos por las resinas de intercambio aniónico; los básicos, retenidos por las resinas de intercambio catiónico y los neutros que no serían retenidos por ningún tipo de resinas de intercambio.

También Tiselius, Drake y Hagdahl⁽⁹⁾, desarrollaron una técnica similar para la separación de aminoácidos. De este modo, es evidente, que los intercambiadores y agentes adsorbentes extraen los aminoácidos básicos y ácidos de sus soluciones.

Según Samuelson⁽¹⁰⁾, con el sistema propuesto por Tiselius, Drake y Hagdahl, se obtienen resultados muy satisfactorios desde el punto de vista analítico.

En 1949, Winter y Kunin⁽¹¹⁾ propusieron un método para la separación de aminoácidos en hidrolizados de proteínas, mediante el empleo de resinas intercambiadoras de iones (Amberlite IR-4B, IRC-50- y IRA-400). Mediante esta técnica se obtiene la separación de los aminoácidos dicarboxílicos (glutámico y aspártico) y de otros aminoácidos como la arginina, lisina é histidina.

Como un factor de complicación para considerar en la aplicación de estas resinas y agentes adsorbentes en medicina, es conocido el hecho de que los aminoácidos aromáticos pueden ser extraídos por carbón activado y que ciertas resinas de intercambio catiónico pueden ser específicas con respecto a un determinado aminoácido como el triptofano (Zurba y colaboradores, 1943)⁽¹²⁾.

Las resinas para cromatografía de aminoácidos, deben ser de partículas muy pequeñas (200-400 mallas) y tener, además, una alta capacidad de intercambio. Estos son requisitos indispensables para una buena separación de los aminoácidos.

Las resinas disponibles, los fabricantes, y el tipo y capacidad de intercambio, han sido reunidos por Kunin y Myers (1950)⁽¹³⁾.

Bibliografía:

- (1) - WHITEHORN, J.C., J.Biol. Chem., 751:56, 1923.
- (2) - NELSON, J.A., MC FARLANE, W.D. y BOULET, M., Federación Proc., 148:5, 1946.
- (3) - SCHRAMM, G. y PRIMOSIGH, J., Ber.Dent.Chem., 417:77B, 1944.
- (4) - ACKERMANN, D. y FUCHS, H.G., Ztschr.Physiol.Chem., 198:204, 1936.
- (5) - WIELAND, T., Naturwissenschaften, 374:30, 1942.
- (6) - BLOCK, R.J., Proc.Soc.Exper.Biol.Med., 252:51, 1942.
- (7) - BLOCK, R.J., U.S.Patent 2.386.926, Octubre 16, 1945.
- (8) - FREUDENBERG, K., WALCH, H. y HOLLER, H., Naturwissenschaften, 87:30, 1942.
- (9) - WISELIUS, A., Adsorption analysis of amino acid mixtures. Entanson M.L., Edsall, J.T., "Advances in protein chemistry" Vol. III, p.67-91. Edit. Academic Press, Inc. Publ. N. York. - (1944).
- (10) - SAMUELSON, O., Ion exchangers in analytical chemistry. Edit. Wiley y Sons, Inc. N. York (1953).
- (11) - WINTERS, J.C., KUNIN, R., Ion exchange resins in the pharmaceutical field. Ind. Eng. Chem., 460-463:41, 1949.
- (12) - TURBA, F., RICHTER, M. y KAUCHAR, F., Naturwissenschaften, 508:31, 1943.
- (13) - KUNIN, R. y MYERS, R.J., Ion Exchange Resins, Wiley, New York, Chapman and Hall Ltd., London, 1950, pp.58-59.

ACIDO NUCLEICO Y COMPUESTOS CON EL RELACIONADOS

La aplicación de cromatografía en "columnas de intercambio iónico", para la separación de mezclas de derivados del ácido nucleico, se debe a la necesidad de estas separaciones, en investigaciones concernientes con la biosíntesis y comportamiento químico de los ácidos nucleicos. Es un traslado directo de los principios desarrollados por Tompkins, Khym y Cohn⁽¹⁾ en sus primeros trabajos en la separación de los radioisotopos producidos en la fisión, por medios de intercambio iónico. Los últimos productos de la división del uranio, fueron separados efectivamente, mediante una elusión diferencial, aprovechando la formación de complejos entre estos y ciertos aniones orgánicos multivalentes, dependiendo esto directamente del pH. A su vez se modificará la carga neta de los iones eluidos.

En los nucleótidos y en compuestos similares derivados del ácido fosfórico ó iones orgánicos, que poseen varias constantes de disociación ácidas, la carga neta puede ser influenciada por el pH en forma similar. La aplicación de este principio en intercambio iónico, ha llevado desde su introducción en 1949⁽²⁾, a algunos descubrimientos bioquímicos muy significativos.

El trifosfato de adenosina (ATP), uno de los más poderosos compuestos de fosfato potencial conocido, se prepara por un proceso simplificado, en el que se emplea intercambio iónico (Polis y Meyerhof, 1947)⁽³⁾. El ATP es obtenido como sal sódica, libre de trazas contaminantes de metales pesados, por intercambio entre una resina catiónica, en ciclo sodio y la solución de ATP, conteniendo metales pesados. Weiler y Mar-

tin (1952)⁽⁴⁾ han usado resinas de intercambio en la separación directa de trifosfato de adenosina, de extractos complejos y relativamente crudos.

Smith y Wender (1948)⁽⁵⁾, han descripto un método para la separación de pequeñas cantidades de xantina y guanina. Este se realiza por absorción de xantina y guanina a pH ácido y la siguiente extracción de la xantina por elusión. No se ha demostrado que estos intercambiadores de cationes, tengan efectos sobre mezclas complejas de purinas y pirimidinas, pero estos trabajos han indicado que la absorción puede ser factible.

Cohn y sus colaboradores (1950 a,b,1951)^(6,7,8,9), han realizado investigaciones sobre la aplicación de materiales intercambiadores de iones en la separación de derivados del ácido nucleico de la levadura. La técnica empleada consiste, en la hidrólisis del ácido ribonucleico, eliminación de ácido sulfúrico y la mayor parte de la guanina, más los fosfatos inorgánicos, por neutralización con hidróxido de bario. Sigue luego la separación de la adenina, guanina y de dos nucleótidos pirimidínicos, por absorción sobre un intercambiador aniónico de tipo base fuerte y subsiguiente elusión ácida, y finalmente la cristalización o precipitación de cada uno de los nucleótidos pirimidínicos, en la porción del efluente que corresponda.

La aplicación de este proceso, en la preparación de los ácidos uridílico y citidílico, no da como resultado un producto altamente purificado, si bien es de uso más práctico.

En general, la técnica de Cohn, puede ser aplicada tanto a la separación de desoxiribonucleotidos como a la de ribonucleótidos (Hurst y colaboradores, 1951; Sinsheimer y

Keerner, 1951; Volkin y colaboradores, 1951)^(10,11,12).

En nuestro país se han realizado varios trabajos de interés biológico con la aplicación de resinas de intercambio^(13,14).

Los jugos intestinales contienen nucleasas y nucleosidasas. Por su actividad, los ácidos nucleicos son degradados en nucleótidos, nucleósidos y finalmente en purinas, pirimidinas y azúcares. Podría suceder que ciertas resinas de intercambio aniónico de tipo base fuerte y algunas de intercambio catiónico de tipo ácido fuerte, puedan alterar la absorción de derivados del ácido nucleico en el tracto gastro-intestinal.- Si ocurriera esto, es poco probable que sobrevinieran efectos perjudiciales, ya que el cuerpo humano puede sintetizar las purinas y piridinas y es por lo tanto independiente de fuentes exógenas.

No obstante, este punto no está enteramente aclarado y podrían producirse situaciones clínicas, en que los adsorbentes intestinales, interferirían con el anabolismo del ácido nucleico.-

Bibliografía

- (1) - TOMPKINS, E.R., KHYM, J.X. y COHN, W.E., J. Am. Chem. Soc., 2769:59, 1947.
- (2) - COHN, W.E., J. Am. Chem. Soc., 1471:72, 1950.
- (3) - POLIS, B.D. y MEYERHOF, O., J. Biol. Chem., 389:169, 1947.
- (4) - BEILER, J.M., GRAFF, M. y MARTIN, G.J., Ion Exchange and Adsorption Agents in Medicine por Martin G.J., 1952.-

- (5) - SMITH, S.C. y WENDER, S.H., J. Am. Chem. Soc., 3719:70, 1948.
- (6) - COHN, W.E., J. Am. Chem. Soc., 1539:73, 1951.
- (7) - COHN, W.E. y CARTER, C.E., J. Am. Chem. Soc., 2606:72, 1950, a.
- (8) - COHN, W.E. y CARTER, C.E., J. Am. Chem. Soc. 4273:72, 1950 b.
- (9) - COHN, W.E. y VOLKIN, E., Nature, 483:167, 1951.
- (10)- HURST, R.O., LITTLE, J.A. y BUTLER, G.C., J. Biol. Chem., 705:188, 1951.
- (11)- SINSHEINER, R.L. y KOERNER, J.F., Science, 42:114, 1951.
- (12)- VOLKIN, E., KHYM, J.X. y COHN, W.E., J. Am. Chem. Soc., 1533:73, 1951.
- (13)- CABIB, E., LELOIR, L.F., Guanosine diphosphate mannose. J. Biol. Chem. 779-790:206, 1954.
- (14)- CABIB, E., LELOIR, L.F., CARDINI, C.E., Uridine diphosphate acetylglucosamine. J. Biol. Chem., 1055-1070:203, 1953.-

C A R B O H I D R A T O S

Las resinas de intercambio se aplican en este tema, principalmente, a la purificación (desmineralización) de soluciones de azúcares.

Los azúcares son electrolitos muy débiles y tienen poca o ninguna tendencia a reaccionar iónicamente con la forma salina de los intercambiadores iónicos. La fijación en un intercambiador aniónico, por atracción iónica, puede efectuarse por uno de estos varios caminos:

1) Por el uso de una resina de intercambio aniónico, base fuerte, en forma OH^- , haciendo de la etapa de absorción, un proceso esencialmente de neutralización, en el cual la formación de agua, actúa como la fuerza impulsante.

2) Incrementando la ionización de los sacáridos a través de la formación de complejos ácidos.

3) Agregando o sustituyendo grupos ionizables en la molécula.

4) También, es posible, la adsorción de carbohidratos naturales o sustituidos, con intercambiadores iónicos poliestirénicos. Puede ser acentuada por fuerzas no iónicas, (per ej., interacciones ión-dipolo o fuerzas de Van der Waals), por solventes menos polares.

1 - Reacciones entre azúcares e intercambiadores aniónicos en su forma OH^- Los grupos alcohólicos de los azúcares son ácidos muy débiles, sus constantes de ionización son tan pequeñas (glucosa $6,6 \times 10^{-13}$, lactosa $6,1 \times 10^{-13}$), que

su absorción de soluciones acuosas como ácidos libres, por las resinas de intercambio iónico, ocurre solamente, cuando éstas están en forma de base libre (R-OH).

Esta reacción fué observada primero en procesos de desionización⁽¹⁾ de los azúcares reductores. Inmediatamente se dieron a conocer trabajos sobre las complicaciones en la interpretación de resultados analíticos^(2,3,4,5), ocasionadas por la retención de azúcares reductores, por resinas en forma de base libre (R-OH). Aunque en un principio esta reacción parecía tener posibilidades de aplicación en el estudio de las separaciones de carbohidratos, se vió luego que sucederían degradaciones y transformaciones de los azúcares, mientras ellos permaneciesen en contacto con el intercambiador base fuerte.- Dado que los azúcares disueltos en soluciones alcalinas, experimentan cambios radicales, no sorprende que ocurran reacciones entre el intercambiador y el azúcar (un intercambiador en la forma OH^- es equivalente a una solución de una base fuerte 6-8N).

Debe hacerse notar, sin embargo, que las resinas base débil, tal como "Permutita W" ó "Amberlite IR-45", pueden ser usadas sin dificultades en soluciones de azúcares para simples procesos de desionización. Este tipo de intercambiador, aún usado en forma de base libre, tiene una baja concentración de ión hidróxido (análogo al NH_3) y por lo tanto no retiene e reacciona químicamente con los azúcares reductores en grado significativo.

2 - Complejos iónicos de los azúcares: Muchos sacáridos reaccionan con ácido bórico, molíbdico y túngstico, e

con los óxidos de antimonio y arsénico para formar complejos en los cuales está comprendida una estructura de tipo quelate⁽⁶⁾. Es un proceso bien conocido, la reacción del bisulfite con compuestos carbonílicos, para formar sales de un ácido fuerte ($R-CHO + HSO_3^- \rightleftharpoons R-CH(OH)SO_3^-$). Muchos de los productos de estas reacciones son sustancias ionizables y se adaptarían a preparaciones con los intercambiadores iónicos en forma de sal.

Siguen esta regla, unidades moleculares del tipo glucosa - 1 - fosfato. La molécula es un ácido fuerte con una alta capacidad de intercambio aniónico (Mc Cready y Hassid, 1944)⁽⁷⁾. La glucosa-1-fosfato, es seguidamente eluida con álcali débil y separada del eluido como la sal dipotásica cristalina; la relativa facilidad de preparación de estos productos usando resinas de intercambio, ha hecho posible la realización de muchas investigaciones bioquímicas, de otra manera necesariamente diferidas, a causa de la escases del producto químico puro.

3 - Acción química para producir grupos funcionales ionizables: La determinación de pesos moleculares de polisacáridos, que tienen grupos finales reductores, fué hecha por Isbell⁽⁸⁾ con $NaC^{14}N$ marcado. Un carbono extraordinario como el C^{14} , contenido en el grupo carboxílico, fué agregado a cada grupo reductor. La radioactividad fija dá una medida directa del número de grupos finales, de los cuales fué calculado el peso molecular. Por pasaje de la mezcla reaccionante a través de una columna de intercambio aniónico, el material no reaccionante pasó sin ser absorbido, mientras que todos los polisacá-

ridos con grupos carboxílicos, fueron retenidos y subsiguientemente recuperados en forma pura.

4 - Interacciones no iónicas de los azúcares con intercambiadores iónicos: Strain⁽⁹⁾ en su reseña de sistemas cromatográficos, señala que las fuerzas adsorbentes en un intercambiador, pueden ser muy complejas. Las simples fuerzas iónicas, aparentemente implicadas en un sistema de solventes, pueden ser reemplazadas en importancia por fuerzas ión-dipolo, dipolo-dipolo ó fuerzas de Van der Waals, en sistemas con solventes menos polares.

Bibliografía:

- (1) - WOOLF, L.I., Nature, 84:171, 1953.
- (2) - HULME, A.C., Nature, 610:171, 1953.
- (3) - PHILLIPS, D. y POLLARD, A., Nature, 41:171, 1953.
- (4) - REBENFELD, L., PACSU, E., J. Am. Chem. Soc. 4370:75, 1953.
- (5) - WILLIAMS, B.L. y WENDER, S.H., J. Am. Chem. Soc., 5919:74, 1952.
- (6) - PIGMAN, W.W. y GOEPP, R.M., Carbohydrate Chemistry Academic Press, New York, 1951, Vol. VI, pág. 253.
- (7) - MC CREADY, R.M. y HASSID, W.Z., J. Am. Chem. Soc. 560:66, 1944.
- (8) - ISBELL, H.S., Science, 532:113, 1951.
- (9) - STRAIN, H.H., Anal. Chem., 25:23, 1951.

V I R U S

Se han propuesto muchos procesos para la purificación y estudio de virus⁽¹⁾. Las técnicas basadas en las resinas de intercambio iónico constituyen otro progreso en la solución de los problemas propios de este tema.

Recientemente, la información obtenida del estudio de la interacción virus-intercambiador iónico, ha proporcionado algunos interesantes detalles, de la relación de los virus con sus células anfitrionas.

El uso de resinas de intercambio en la purificación de virus ha seguido dos caminos: el primero empleado por Müller (1950)⁽²⁾, consistía en la eliminación de impurezas nitrogenadas de los virus neurotrópicos. Las impurezas son retenidas en un intercambiador de cationes de tipo carboxílico "Amberlite XE-64", mientras que el virus queda en el afluente. El segundo produce directamente la absorción de un virus dentro de un intercambiador iónico. Lo Grippe (1950)⁽³⁾, usó una resina de intercambio aniónico de tipo base fuerte y con esta pudo extraer el virus de la poliomielitis de las heces humanas y el virus de Theiler de las heces de los ratones. La extracción de virus fué casi cuantitativa. Se utilizó aproximadamente un 20% de resina "Amberlite XE-67" para extraer el virus de las heces humanas.

Este trabajo tiene gran importancia para la aplicación de resinas de intercambio en medicina. La adsorción de los virus por las partículas de resina transformaría a estos en no infecciosos.

Es evidentemente aconsejable el uso de estas resinas como una medida de profilaxis, contra cualquier tipo de virus de enfermedad conocida, que tiene entrada dentro del cuerpo humano a través del tracto gastro-intestinal. El virus de la poliomielitis sigue este trayecto dentro del cuerpo humano. Sin embargo, por el momento, este proceso, es de difícil aplicación práctica, debido a su aspecto cuantitativo. En el futuro se crearán indudablemente nuevos tipos de resinas con creciente capacidad y especificidad.

Puede aún considerarse la probabilidad de que la reducción de la porción de virus infeccioso, mediante su eliminación con resinas, pueda comprometer el balance de fuerzas invasoras y de mecanismos de defensas del cuerpo, permitiendo el inmediato triunfo del virus atacante.

Müller y Rose⁽⁴⁾, han descrito un método para la rápida concentración y purificación parcial del virus de la influenza, utilizando resinas intercambiadoras de iones.

Bibliografía:

- (1) - SHARP, D.G., "Purification and Properties of Animal Viruses", Smith K.M. y Lauffer M.A., eds., *Advances in Virus Research*, Vol. I, 1953, Academic Press, New York, pp. 277-313.
- (2) - MULLER, R.H., *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 239:73, 1950.
- (3) - LO GRIPPO, G.A., *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 208:74, 1950.
- (4) - MULLER, R.H. y ROSE, H.M., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 27:80, 1952.

B A C T E R I A S

Intercambio iónico por células microbianas: Con anterioridad a 1940, varios investigadores, habían demostrado que las células bacterianas, poseen por lo general una carga eléctrica negativa y habían descrito las combinaciones iónicas con bacterias, como un fenómeno de adsorción. Recien en ese año, Mc Callas⁽¹⁾, comprobó el proceso de intercambio iónico en bacterias y lo describió como similar a las reacciones de intercambio básico, de otras sustancias coloidales. Lo demostró por cuatro métodos utilizando una bacteria común la *Escherichia coli*. Estos métodos fueron: 1) Saturación de las células, con ión hidrógeno; lavado del exceso de ácido libre de las células saturadas y titulación del H^+ adsorbido con hidróxido de calcio. 2) Medición colorimétrica de la adsorción de azul de metileno y el efecto de diversos cationes en este proceso. 3) Reemplazo de los iones Mg adsorbidos por otros cationes. 4) Adsorción del cloruro de mercurio y su reemplazo como medida de la actividad de la célula.

Mc Calla calculó por la fijación de H^+ que había aproximadamente 10^8 centros de adsorción activos en cada célula bacteriana. En un estudio posterior de este proceso, Mc Calla y Faltz⁽²⁾ describieron isotermas típicas de adsorción para la fijación de H^+ y de diferentes cationes de colorantes.

La capacidad que presentan algunas especies de bacterias, de ligarse a determinados cationes, está dada en la tabla siguiente. Los valores dados concuerdan dentro de la misma magnitud, aún cuando fueron utilizados diferentes organismos y procesos en estos estudios.-

Capacidad de Adsorción de diferentes Bacterias^(x)

<u>Bacterias</u>	<u>Sustancia adsorbida</u>	<u>Fijación meq./100 g.</u>	<u>Referencias</u>
Aerobacter aerogenes	crystal violeta	102	Harris (3)
" "	Micramina	41	Terayama (4)
Azotobacter Chroococcum	Crystal violeta	44	Harris (3)
Bacillus bellus	Crystal violeta.	106	Mc Callas y Clark (5)
Bacillus subtilis	H ⁺	57	Harris y Mc Callas (6)
Clostridium sporogense	H ⁺	55	Harris y Mc Calla (6)
Corynebacterium simplex	Crystal violeta	109	Mc Calla y Clark (5)
Escherichia coli	H ⁺	25	Harris y Mc Calla (6)
" "	Azul metileno	38	Mc Calla (1)
" "	Micramina	22	Terayama (4)
Mycobacterium tuberculosis	Micramina	18	Terayama (4)
Rhizobium meliloti	H ⁺	81	Harris y Mc Calla (6)
Rhodospirillum rubrum	Crystal violeta	110	Harris (3)
Salmonella pullorum	Crystal violeta	72	Harris (3)
Serratia marcescens	Micramina	28	Terayama (4)
Staphylococcus aureus	H ⁺	78	Mc Calla (7)

(x) Las capacidades están expresadas como meq de sustancia adsorbida per 100 gramos de bacteria seca.

En el pasado, se dió amplia difusión a las llamadas teorías "físicas" y "químicas" de la combinación de los colores con las células bacterianas.

Con respecto a estas teorías del mecanismo de tinción, Dubes⁽⁸⁾, dice: "La larga controversia existente entre los proponentes de las teorías física y química, ha perdido mucho de su significado, puesto que se ha verificado, que los fenómenos de química de coloides, están gobernados por las mismas fuerzas que operan en la química de las soluciones, solo modificadas en parte, puesto que ellos tienen lugar en superficies".

Se ha demostrado, con varios colorantes comunes, la presencia de intercambio iónico, en el tñido de las células bacterianas. Mc Calla⁽¹⁾ probó, que el azul de metileno, muestra típicos fenómenos de intercambio con las células bacterianas. La adsorción de los iones de cristal violeta ó hidrógeno por los mismos "centros", fué sugerido por Mc Calla y Clark⁽⁵⁾. La influencia de iones H^+ sobre el tñido, se debe en este caso, a una "competencia" directa por los centros de adsorción, o reemplazo de los iones de colorante ya adsorbidos.

Harris⁽⁹⁾ midió la adsorción por bacterias, de una serie de colorantes derivados del fluorano, que poseían diferentes grados de ionización acídica para diversos valores de pH y sugirió que las deficientes propiedades de tñido de los colorantes ácidos, eran debidas a las cargas negativas similares, llevadas por la bacteria y el anión del colorante.

Se demostró, que la mayor adsorción de colorantes ácidos de la serie de las sulfonftaleínas tiene lugar, cuando las condiciones son tales, que la carga eléctrica es "menos" negativa⁽¹⁰⁾. Se logró una disminución en el potencial superficial de la célula por los siguientes medios: 1) bajando el pH de los buffers de suspensión; 2) agregando cationes de metales pesados o agentes de superficie catiónica activa; 3) aumentando la concentración iónica de los buffers.

Las medidas electroforéticas de la carga superficial bacteriana, están en relación con la fijación de los colorantes ácidos.

Uso de intercambiadores iónicos en bacteriología.

1) Aplicación al estudio bioquímico de los microorganismos:
En el último cuarto de siglo, se han hecho grandes avances, en el estudio de la fisiología bacteriana. Los adelantos en el conocimiento de la genética de los microorganismos, la variedad de los requerimientos de crecimiento, la morfología unicelular y muchos otros aspectos hacen de las bacterias un valioso auxiliar para el bioquímico.

Los problemas bioquímicos relacionados con las bacterias, son esencialmente los mismos que se encuentran en otros organismos vivientes. Por ello deben esperarse numerosas aplicaciones del intercambio iónico en la separación y purificación de compuestos específicos; aminoácidos, péptidos, proteínas, nucleoproteínas y otros componentes de las células bacterianas, que han sido aislados junto con muchos otros productos finales e intermediarios del metabolismo microbiano, incluyendo

alcoholes, ácidos orgánicos, antibióticos y otras sustancias.

Las técnicas de separación son únicas para cada compuesto en particular. Como ejemplo de la amplia aplicación de los intercambiadores iónicos, puede mencionarse, que durante el período 1951-1954, fueron publicadas más de cincuenta investigaciones, relacionadas con los compuestos nitrogenados, asociados a los microorganismos y con el uso de resinas de intercambio en su separación.

2) Su uso en la preparación de medios: Un estudio de los elementos inorgánicos requeridos por los microorganismos es difícil de realizar, por el hecho de que solo mínimas cantidades de elementos esenciales, satisfacen las necesidades de muchas bacterias. Varios investigadores han usado resinas de intercambio iónico en la preparación de medios.

Webb^(11,12), con el fin de preparar un medio complejo deficiente en Mg, pasó soluciones de peptona, a través de resinas de intercambio, para eliminar los cationes libres. Una técnica similar fue empleada por Rechford y Mandle⁽¹³⁾ y Walker⁽¹⁴⁾.

Donald, Passey y Swaby⁽¹⁵⁾ probaron 38 métodos para eliminar trazas de minerales y encontraron que la alúmina era eficiente para ciertos cationes. No se hicieron comparaciones con resinas de intercambio sintéticas, las que actuarían más eficientemente en este caso.

La técnica desarrollada por McLeod y Snell⁽¹⁶⁾, ofrece un procedimiento relativamente simple, que tiene una

cantidad de aplicaciones útiles. Demostraron que el crecimiento de ciertas bacterias del ácido láctico, bajo circunstancias favorables en un medio complejo, puede eliminar completamente, trazas de sustancias esenciales para el crecimiento de otros organismos. Este método, fué empleado en la preparación de medios, para el estudio de los requerimientos minerales del leuconostee mesenteroides, streptococcus faecalis y una cantidad de la especie lactebacillus.

3) Adsorción de bacterias en resinas de intercambio o materiales adsorbentes y su significado médico: Gunnisen y Marshall (1937)⁽¹⁷⁾ demostraron la adsorción in vitro de Escherichia coli, Clostridium welchii y Lactobacillus acidophilus por caolín, reactivo de Lloyd's, carbonato de calcio, hidróxido de aluminio y sulfato de bario. El carbón extraje eficazmente el L.acidophilus, pero no afectó significativamente a la Esch.coli y al Clost. welchii. La impresión general dada por esos autores, es que las alteraciones en la flora intestinal, producidas por la administración de agentes inertes particulares, no es debida a la adsorción de células bacterianas.

Recientemente, Martin y sus colaboradores⁽¹⁸⁾, intentaron obtener resultados cuantitativos en la adsorción de bacterias por resinas. Se usaron las bacterias más comúnmente asociadas con trastornos gastrointestinales, en un plan experimental, en que porciones alícuotas de "caldos" de cultivo de 16 a 24 horas de las mismas, fueron agitadas con el adsorbente

durante dos horas a 37°C, filtrados, medidos turbidimétricamente y comparados con controles adecuados. En la tabla siguiente se dan los resultados obtenidos (ver hoja adjunta)

La tabla indica que el silicato de aluminio y sodio, fué el agente más efectivo entre los probados para la eliminación de bacterias. La resina de intercambio aniónico fué solo levemente efectiva a las más altas concentraciones.

Mientras que el significado terapéutico de la adsorción de bacterias, por estos agentes particulares, es discutible, en vista del enorme número de bacterias en el tracto gastrointestinal, la eliminación de toxinas bacterianas y la alteración de la flora del intestino por este agente es indiscutible. Praefladt 1923⁽¹⁹⁾ demostró el efecto neutralizante que tenía el caolín sobre toxinas y productos tóxicos de bacterias patógenas. Su técnica implicaba el tratade de cultivos, centrifugado y luego inyección del líquido sobrenadante a los animales en experimentación.

El éxito obtenido mediante el uso de caolín en el tratamiento del cólera asiático, disenteria bacilar, enteritis aguda, tifoidea, intoxicación por carne y botulismo, se ha explicado como debido a la adsorción de toxinas por este. El caolín se combina con toxinas y productos tóxicos de *Vibrio cholerae*, *Bacillus dysenteriae* (Shiga), *B. enteriditis*, *B. diphtheriae*, *B. botulinus*, *B. typhosus*, *B. paratyphosus* B y parece combinarse con productos tóxicos de las bacterias proteolíticas y putrefactivas.

Adesión de células bacterianas con material de intercambio

Agentes y concenl.
(mg./cm³.)

Lecturas turbidimétricas (x)

Bach. Coli S. typhosa S. Schottmulleri S. Dysenteriae Staph. aureus

Resina de intercambio aniónico base débil.

1	290	144	234	124	107
5	290	141	220	144	106
10	278	141	172	171	89
25	266	112	179	137	56

Silicato de sodio y aluminio.

1	192	52	106	27	46
5	---	10	44	X	X
10	X	X	X	X	X
25	X	X	X	X	X

Resina de intercambio aniónico más silicato de sodio y aluminio.

1 (C/100)	188	68	93	81	13
5 "	90	30	47	34	X
10 "	44	X	---	---	X
25 "	X	X	X	X	X

Hidróxido de aluminio

1	252	---	118	108	78
5	108	---	86	82	56
10	110	---	X	41	61
25	89	---	X	X	26

Control de organismos-Lectura

294	144	224	124	108
-----	-----	-----	-----	-----

X: Significa que el agente fue probablemente efectivo para una eliminación casi completa de organismos.

El caolín cambió la composición de la flora bacteriana del intestino, de una predominantemente proteolítica, a una acídica. Braaflydt usó, también, caolín en el tratamiento de trastornos gastrointestinales, en pacientes tuberculosos con marcado éxito. En 1950 Moss y Martin⁽²⁰⁾ estudiaron la adsorción de toxinas bacterianas por materiales inertes particulares. Las conclusiones de este trabajo indicaron la necesidad del uso de agentes de adsorción múltiples, ya que ningún material aisladamente, tuvo capacidad óptima en los varios sistemas estudiados.

El efecto producido por cualquier agente de intercambio o adsorción dado, o por cualquier combinación de estos será múltiple, pero seguirá tres caminos generales: 1) habrá eliminación de células bacterianas; 2) los productos químicos tóxicos elaborados por las bacterias serán adsorbidos ó absorbidos; 3) la composición del contenido intestinal será modificada con la resultante alteración en el alimento disponible para el desarrollo bacteriano. Esto tenderá a alterar la flora bacteriana. Parece probable que el uso continuo de intercambiadores y agentes adsorbentes, modifique la flora intestinal, y que en general, el cambio será desde un tipo proteolítico a uno acídico.

Bibliografía:

- (1) - MC CALLA, T.M. J. Bacteriol., 23:40, 1940.
- (2) - MC CALLA, T.M. y FOLTZ, V.D., Kansas Acad. Sci. Trans., 46: 44, 1941.-

- (3) - HARRIS, J.O., J.Bacteriol., 649:61, 1951.
- (4) - TERAYAMA, H., Arch. Biochem. and Biophys., 55:50, 1954.
- (5) - MC CALLA, T.M. y CLARK, F.E., Stain Technol., 95:16, 1941.
- (6) - HARRIS, J.O. y MC CALLA, T.M., J.Bacteriol., 57:61, 1951.
- (7) - MC CALLA, T.M., J.Bacteriol., 775:41, 1940.
- (8) - DUBOS, R.J., The Bacterial Cell, Harvard Univ. Press, Cambridge, Mass., 1945.-
- (9) - HARRIS, J.O., Stain Technol., 217:24, 1949.
- (10) - HARRIS J.O., J.Bacteriol., 649:61, 1951.
- (11) - WEBB, M., J.Gen.Microbiol., 410:1, 1949.
- (12) - WINSLOW, C.E.A., FALK, I.S. y CAULFIELD, M.F., J.Gen. Physiol., 177:6, 1923.-
- (13) - ROCHFORD, E.J. y MANDLE, E.J., J.Bacteriol., 554:66, 1953.
- (14) - WALKER, J.B., Arch. Biochem. and Biophys., 1:46, 1953.
- (15) - DONALD, C., PASSEY, B.I. y SWABY, R.J., J.Gen.Microbiol., 211:7, 1952.
- (16) - MAC LEOD, R.A. y SNELL, E.E., J.Bacteriol., 783:59, 1950.
- (17) - GUNNISON, J.B. y MARSHALL, M.S., J.Bacteriol., 401:31, 1937.
- (18) - MARTIN, G.J. y MOSS, J.N., Ion Exchange and Adsorption Agents in Medicine por Martin G.J., Edit. Little Brown & Co., Boston-Toronto, 1955.
- (19) - BRAAFLADT, L.H., J.Infect.Dis., 434:31, 1923.
- (20) - MOSS, J. y MARTIN, G.J., Am.J.Dig.Dis., 18:17, 1950.

ANTIBIOTICOS

En los últimos diez años se ha desarrollado el uso de materiales de intercambio iónico para la separación y purificación de antibióticos. Con la aparición de las resinas de tipo carboxílico, se hizo uso en gran escala de las reacciones de intercambio en la industria farmacéutica, para la separación de antibióticos partiendo de filtrados de caldo de fermentación.

El uso de intercambiadores iónicos, no ha sido confinado a la separación primaria de antibióticos, sino que se ha extendido también a la neutralización de soluciones, a fin de evitar la introducción de sales inorgánicas, como ocurre en la neutralización convencional; se ha aplicado también a la conversión de una forma salina a otra (estreptomina sulfato a cloruro).

Las aplicaciones más notables de los intercambiadores iónicos, han sido la producción comercial de estreptomina y neomicina. Estos antibióticos, no son extraíbles de caldos de fermentación por ninguno de los solventes comunes⁽¹⁾. El rendimiento de los primeros procesos fué pobre, pues eran difíciles de realizar prácticamente y además la pureza del producto final distaba mucho de ser la deseada.

Estreptomina: El primer proceso para la separación de estreptomina consistió en la adsorción del antibiótico contenido en el caldo filtrado, en carbón activado y su posterior elusión por medio del ácido metanólico acuoso^(2,3,4,5).

Se recuperó entre el 30-60% de un producto de baja pureza.

En 1946 Coppock y Short establecieron que los silicoaluminatos sintéticos eran particularmente útiles para la separación de estreptomina de sus soluciones⁽⁶⁾. Demostraron que estos agentes, eran más eficaces que el carbón en la adsorción de estreptomina y el producto obtenido, por elusión, con solución diluida de cloruro de sodio (5%), era de mayor pureza. Una de las dificultades de este proceso, era que la solución a ser absorbida, debía tener un bajo contenido salino.

Le Page y Campbell⁽⁷⁾, sin embargo, establecieron en sus investigaciones que las zeolitas no demostraron ser mejores que el carbón, para la purificación de estreptomina.

El uso de intercambiadores catiónicos orgánicos, precedió, probablemente, el uso de intercambiadores inorgánicos para la preparación de antibióticos. En Enero de 1945, Van Dolak, Christensen y Shelton⁽⁸⁾, obtuvieron una patente protegiendo el uso de intercambiadores catiónicos orgánicos, para la purificación de estreptomina y estreptetrisina.

En una patente de Ayerst, Mc Kenna y Harrison Ltd.⁽⁹⁾ y en otra concedida a Richardson y Grant⁽¹⁰⁾, se menciona un intercambiador catiónico, de tipo fenolsulfónico, para la purificación de estreptomina.

Actualmente se sabe que las resinas fenolsulfónicas, tales como "Amberlite MB-100", "Ionac C-200", "Dowex 30" y "Zeo-Rax", si bien son buenos absorbentes para los antibióticos básicos, tales como la estreptomina, no son adaptables para aplicaciones comerciales, por que su capacidad, así como la eficacia en la elusión son bajas. Con el desarrollo de intercam-

biadores carboxílicos de alta capacidad, tales como "Amberlite IRC-50" y "Permutit H-70"^(11,12,13,14) hay resinas disponibles que no solo poseen alta capacidad para fijar estreptomicina, sino también una eficacia en la elusión, prácticamente cuantitativa.-

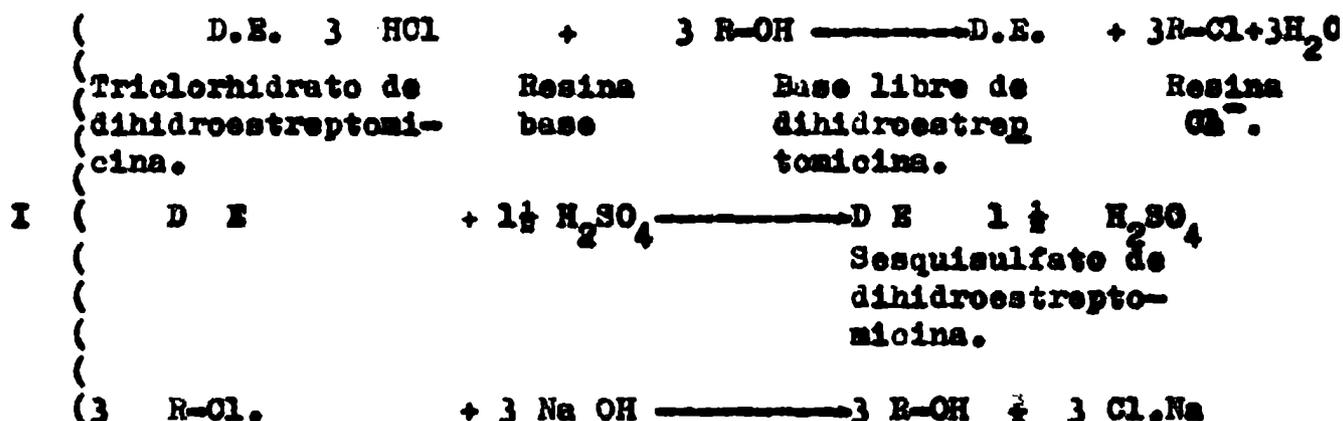
Comparación de adsorbentes y de varias resinas de intercambio iónico en la recuperación de estreptomicina(11,14).-

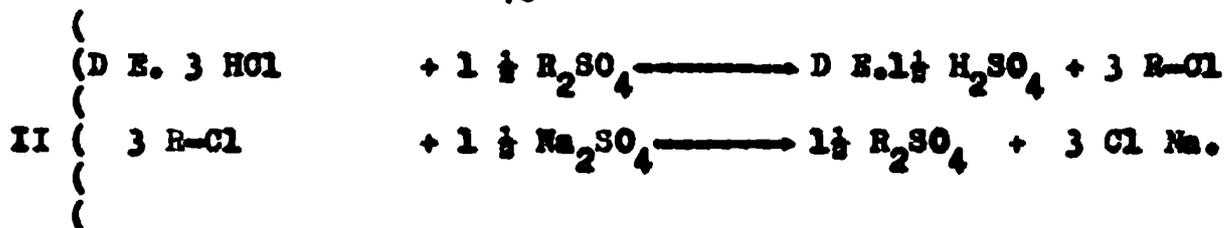
<u>Tipo de material</u>	<u>Capacidad para estreptomina mg./g.</u>	<u>Agente de elusión.</u>	<u>Recuperación en la elusión %</u>	<u>Potencia del producto obtenido. Unidades/mg.</u>
Resina fenol formaldehído sulfonada	10	ClNa ac. SO ₄ H ₂ ac.	30-50 40	ca.100
Silicato intercambiador	40	ClNa ac.	100	ca. 50
Carbón sulfonado	12	ClNa ac. SO ₄ H ₂ ac.	40-60 40	ca.100
Carbón	20	Metanol ácido-H ₂ O	60-75	200-350
Tierra de fuller	50	Clorh.de Piridina	ac.30-40	75
Copolímero de ácido metacrílico y divinilbenceno(5%)	600-1500	ClH ac.	100	600
Copolímero de ácido metacrílico y divinilbenceno (10%)	300-800	ClH ac	100	600
Resina carboxílica(que se cree es de tipo fenol formaldehído) conocida como "Permutit XHC"	500-900	ClH ac	100	650

La potencia del clorhidrato de estreptomina puro es de: 840 unidades/mg. Como se observa, mediante el empleo de intercambiadores catiónicos de tipo carboxílico, se obtiene el producto con una pureza del 70% partiendo directamente de los caldos de fermentación.

También se han usado las resinas de intercambio iónico en muchas otras operaciones, tales como: a) neutralización de soluciones para evitar la adición de sales al producto^(9,15,16,17); b) eliminación de impurezas⁽¹⁸⁾; c) decoloración de soluciones; d) conversión de una sal iónica en otra, o bien, la conversión de una sal a la base libre del antibiótico. Con respecto a este último punto, Berk y Martels⁽¹⁹⁾, han descrito dos procesos para la conversión del clorhidrato de dihidroestreptomina, al correspondiente sulfato, por medio de una resina de intercambio aniónico del tipo base fuerte.-

Las reacciones son las siguientes:





Neomicina: Nager⁽²⁰⁾, dió a conocer un proceso en el que emplea un intercambiador catiónico carboxílico (por ej. "Amberlite IRC-50") para la separación de neomicina. El $OHNH_4$ es usado generalmente como agente de elusión en una concentración aproximada del 3,5%. Mediante el uso del $OHNH_4$ como agente eluyente, el Na y otros iones inorgánicos adsorbidos en la columna, no son eluidos por este. El eluido es luego concentrado para eliminar el NH_3 . Sin embargo, las soluciones son generalmente coloreadas. Este último se evita pasando la solución a través de una resina de intercambio aniónico del tipo base fuerte, poco polimerizada (malla ancha) (por ej. "Amberlite XE-75")⁽²¹⁾.

La neomicina puede ser eluida de "Amberlite IRC-50" con NH_3 pues es una base extremadamente débil (el pH de los 4 grupos básicos es 7,8). Las ventajas de la elusión con NH_3 no pueden ser aplicadas en el proceso de la estreptomina, pues esta es una base mucho más fuerte.

Swart, Hatchinson y Waksman⁽²²⁾ han descrito también un método para la purificación de neomicina. Los concentrados parcialmente purificados son adsorbidos con "Decalco" y luego eluidos fraccionariamente; la mayor parte de la neomicina es obtenida en las primeras fracciones.

Penicilina: El éxito en la separación y purificación de estreptomina, por medio de resinas de intercambio iónico, incitó a muchos investigadores a buscar procesos análogos

aplicables a la penicilina. Sin embargo, el éxito obtenido con la penicilina, ha sido mucho más limitado y no se han desarrollado todavía procedimientos prácticos, a partir de caldos de penicilina.

Martin y Sullivan (1949)⁽²³⁾ han extraído penicilina, mediante resinas de intercambio aniónico, a partir de una solución de penicilina sódica (mezcla comercial).

Los datos obtenidos son los siguientes:

<u>Tiempo en contacto con la resina (mín.)</u>	<u>pH del filtrado después de la experiencia</u>	<u>Unidades de penicilina por ml. de filtrado</u>	<u>Unidades de penicilina adsorbida per Gm. de resina.</u>
1	3,48	850	230.000
5	3,27	340	332.000
10	2,98	250	350.000
20	2,84	300	340.000

El proceso utilizado fué el siguiente: Se agitan 0,1 gramo de resina de intercambio aniónico, sometido a lavado ácido previo, con 20 ml. de solución de penicilina conteniendo 2.000 unidades por ml. La resina se elimina por filtración y el filtrado se analiza. Los resultados de una serie similar de experiencias con penicilina G, se indican en el cuadro siguiente:

Tiempo de contacto con la resina(min.)	pH del filtrado después de la experiencia	Unidades de penicilina per mil.de filtrado	Unidades de penicilina adsorbida por gr.de resina
1	3,35	522	296.000
5	3,16	400	320.000
10	3,16	310	338.000
20	3,02	320	336.000

De estos resultados se deduce que la adsorción tiene lugar en grado apreciable y el equilibrio se alcanza rápida y fácilmente. El intercambiador de aniones no adsorbió penicilina a pH 7-8. Para probar esto la resina tratada con ácido, se lavó con solución de bicarbonato de sodio 0,5M antes de intentar la absorción de penicilina.

Es de interés fijar las condiciones bajo las cuales la penicilina puede ser extraída de la combinación penicilina-resina.-

Extracción de la penicilina absorbida en 0,1 gr.de resina que contenía 397.000 unidades de penicilina por gr.después de agitarla con 20 ml.de la solución indicada en cada caso:

Solución usada para la extracción de penicilina.	Tiempo de agitación (min.)	pH del filtrado después de la experiencia	Por ciento de penicilina extraída de la resina.-
0,01 M HCl	20	2,1	12,0
0,1 M NaHCO ₃	60	8,7	41,0
0,1 M Na HCO ₃	120	8,8	41,0
0,05 M NaCO ₃	20	10,3	23,9
0,5 M Na CO ₃	20	10,9	20,2

Estos resultados indican claramente, que los ácidos no extraerían tanta penicilina de la resina, como las bases. Esto no es inesperado en vista del hecho previamente indicado de que la resina no adsorbe penicilina a pH 7-8, por cuanto la adsorción tiene lugar fácilmente en solución ácida.

Martin y colaboradores (1952)⁽²⁴⁾ estudiaron la adsorción de antibióticos, por intercambiadores de cationes. Soluciones acuosas de penicilina G, fueron tratadas con cantidades variables de resina carboxílica de intercambio catiónico, agitando la mezcla, a la temperatura ambiente y variando los intervalos de tiempo. En el filtrado de esta mezcla se determinó la penicilina residual. Con un tiempo máximo de una hora un gramo de resina extrajo un poco más de 110.000 unidades de penicilina, de una solución que contenía 500.000. Bajo condiciones similares, la resina solo extrajo trazas de estreptomocina, aureomicina y cloromicetina. Cuando se usó una resina de intercambio catiónico de tipo sulfónico, se obtuvieron resultados parecidos, sin embargo, en el caso de penicilina G, se extrajo un 90% indicando una mayor tendencia para la adsorción e absorción de penicilina. Con posterioridad fracasaron los intentos realizados para extraer la penicilina de la resina, por medios químicos (ácidos y bases).-

Estreptotricina: Hutchinson, Swart y Wakeman⁽¹⁾ han aislado el antibiótico estreptotricina, producido por el "Streptomyces lavendulae" y en el curso de esta purificación, el

antibiótico presente en filtrados de cultivos neutros, se fijó sobre "Decalco". Para la elusión se procede fraccionalmente usándose soluciones de Cl NH_4 al 10%. Luego las fracciones con mayor potencia son combinadas y purificadas por otros medios. Kocholaty y Junowicz-Kocholaty⁽²⁵⁾ han descrito otro método de concentración y purificación de estreptotricina, usando como eluyente soluciones saturadas de ClNa .-

Bibliografía:

- (1) - HUTCHINSON, D., SWART, E.A. y WAKSMAN, S.A., Arch. Biochem., 16:22, 1949.-
- (2) - CARTER, H.E., CLARK, R.K., DICKMAN, S.R., LOO, Y.H., SKELL, P.S. y STRONG, W.A., J. Biol. Chem., 337:160, 1945.-
- (3) - FRIED, J. y WINTERSTEINER, O., Science, 613:101, 1945.
- (4) - KUEHL, F.A., PECK, R.L., WALTI, A. y FOLKERS, K., Science, 34:102, 1945.-
- (5) - SCHATZ, A., BUGIL, E. y WAKSMAN, S.A., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 66:55, 1944.
- (6) - COPPOCK, P.D. y SHORT, J.F., Pat. Británica N° 616.935, Enero 28 de 1949.-
- (7) - LE PAGE, G.A. y CAMPBELL, E., J. Biol. Chem., 163:162, 1949.
- (8) - VAN DOLAH, R.W., CHRISTENSON, G.L. y SHELTON, R.S., Patente USA N° 2.528.022 (Octubre 31, 1950).-
- (9) - AYE ST, MC KENNA y HARRISON, Ltd., Patente Británica N° 638.664 (Junio 14, 1950).-
- (10) - RICHARDSON, E.M. y GRANT, G.A., Patent USA N° 2.550.939 (Mayo 1, 1951).-

- (11) - HOWE, E.E. y PATTER, I., Patente USA N° 2.541.420 (Febrero 13, 1951).
- (12) - KORZYBSKI, T. y KOWCZYK, Z., *Med. Doswiadczalna i Mikrobiol.*, 13:6, 1954, ver *Chem. Abstracts*, 9018:48, 1954.
- (13) - MERCK & Co., Patente Británica N° 687.476, Febrero 18, 1953
- (14) - MERCK & Co., Patente Británica N° 691.786, Mayo 20, 1953.-
- (15) - O'KEEFE, A.E., DOLLIVER, M.A. y STILLER, E.T., *J. Am. Chem. Soc.*, 2452:71, 1949.
- (16) - RICHARDSON, E.M. y GRANT, G.A., Patente USA N° 2.550.939. (Mayo 1, 1951).
- (17) - BRODHAMEL, H.W., MC CORMICK, S.L. y KERN, S.F., *Science*, 233:111, 1950.
- (18) - DORRY, H.M., MASON, E.C. y WEISS, D.E., *Anal. Chem.*, 1038:22, 1950.
- (19) - BERK, B. y BARTELS, C.R., *Chem. Eng. News*, 309:27, 1949.
- (20) - NAGER, U.F., Patente USA N° 2.667.441, Enero 26, 1954.
- (21) - LEVINE, J., SELZER, C. y WRIGHT, W.W., *Anal. Chem.*, 671:25, 1930.
- (22) - SWART, E.A., HUTCHINSON, D. y WAKSMAN, S.A., *Arch. Biochem.* 92:4, 1949.
- (23) - MARTIN, G.J. y SULLIVAN, M.J., *Ion Exchange and Adsorption Agents in Medicine* per Martin G.J., 1952.
- (24) - MARTIN, G.J. / MOSS, J.M. y BELLER, J.M., *Ion Exchange and Adsorption Agents in Medicine*, per Martin G.J., 1952.
- (25) - KOCHOLATY, W. y JUNOWICZ-KOCHOLATY, R. *Arch. Biochem.*, 55:15, 1947.-

ALCALOIDES

Los alcaloides tienen carácter básico y pueden por lo tanto utilizarse materiales de intercambio iónico para su extracción.

Lloyd⁽¹⁾, propuso en una patente otorgada en 1919, el uso de silicato de magnesia, como intercambiador, para purificar extractos de alcaloides.

En 1923, Wittehorn⁽²⁾ empleó una zeolita sintética. Servía para separar sales nitrogenadas relativamente fuertes (pK₃ 8.3), de bases débiles y sustancias no básicas. En base a estos estudios propuso un método para la estimación de adrenalina, en líquidos biológicos. Posteriormente⁽³⁾ describió un método para dosar adrenalina en sangre, utilizando sílice como adsorbente y SO₄H₂ como eluyente.

Ungerer⁽⁴⁾, 1925, estudió la fijación de diversas bases nitrogenadas, incluyendo cinconina, estricnina y quinina, por una zeolita cálcica. Encontró que los resultados podrían expresarse cuantitativamente por la ecuación de adsorción de Freundlich.

La primera aplicación de un proceso de adsorción, para la obtención de alcaloides, fue hecha por Fink (1937)⁽⁵⁾, quien empleó una mezcla de cuolín y asbesto, para la separación de los alcaloides de la cinchona.

En 1938, Oberst⁽⁶⁾, usó una zeolita sintética, en la determinación de morfina en orina de adictos.

El desarrollo de intercambiadores orgánicos sintéticos estables, cuyas propiedades son bien conocidas, ha despertado gran interés, por la aplicación de intercambio iónico, en el estudio de los alcaloides.

Applesweig (1944)⁽⁷⁾ y Applesweig y Ronzoni (1946)⁽⁸⁾, emplearon un intercambiador catiónico de tipo sulfónico, para la recuperación de atropina, escopolamina, morfina, totaquina, quinina y compuestos similares. Estudios de Sussman y colaboradores (1945)⁽⁹⁾, dieron por resultado el uso de intercambiadores, para la recuperación de totaquina, de la corteza de la cinchona y escopolamina de la Datura (Estramnio).-

Según lo señalaron Applesweig y Nachod (1949)⁽¹⁰⁾, la base de esta interacción, reside en la formación de grandes cationes por los alcaloides, los cuales una vez adheridos al intercambiador, deben ser extraídos por técnica especiales, implicando la extracción con solventes. Ciertos alcaloides del curaré, tales como cloruro de δ -tubocurarina, han sido obtenidos por intercambio, usando materiales aniónicos⁽¹¹⁾.

Recientemente, se han realizado una cantidad considerable de investigaciones, encaminadas a simplificar la determinación cuantitativa de los alcaloides contenidos en sus sales y en preparaciones medicinales.

Los métodos convencionales para la determinación de alcaloides, comprenden la liberación del alcaloide de su sal, se añade NH_3 a la solución acuosa de esta, luego se ex-

trae el alcaloide con un solvente adecuado, por ejemplo, cloroformo, que es inmisible con H_2O . Luego de varias extracciones sucesivas, la solución cloroformica se lava con H_2O y es evaporada a sequedad. El alcaloide se valora luego por titulación, con ácido, o por otro medio adecuado.

Este proceso es tedioso y en su realización existen muchas probabilidades de error, debido a las numerosas manipulaciones. El intercambio, iónico, ofrece en cambio la posibilidad de desarrollar métodos de ensayos simples, y probablemente más seguros.

Franek⁽¹²⁾ observó, que cuando se pasaba una solución de una droga alcaloídica en etanol, a través de una columna de alúmina, especialmente preparada, las materias colorantes y los aniones, eran adsorbidos y la solución de bases alcaloídicas resultante, casi incolora, podía ser determinada por evaporación a sequedad y titulación con ácido. Reimers⁽¹³⁾ y Björling⁽¹⁴⁾ han desarrollado y mejorado este método.

Jindra⁽¹⁵⁾ usó una resina de intercambio aniónico, del tipo base débil "Amberlite IB-4B", en lugar de alúminas, para eliminar los aniones, de las soluciones de sales alcaloídicas.

Jindra y Pohorsky⁽¹⁶⁾, realizaron investigaciones sobre la determinación por intercambio iónico, de los contenidos en alcaloides de corteza de cinchona, raíz de ipecacuana, semillas de nuez vómica, hierba de belladona, hierba hiosciamus y sus preparaciones. Los métodos comprendían la extracción directa del material, o bien de extractos acuosos con éter y, ó,

cloroforme amoniacal. El solvente orgánico es evaporado a sequedad, el residuo se disuelve en etanol y SO_4H_2 y se pasa a través de la columna de intercambio aniónico, el efluyente se titula potenciométricamente con ClH . Este método da resultados análogos a los métodos oficiales.

Baggesgaard-Rasmussen, Fuchs y Lundberg⁽¹⁷⁾ han usado el intercambiador aniónico, del tipo base fuerte "Amberlite IRA-400", para la determinación directa de alcaloides, contenidos en sus sales. Muchas de las sales alcaloidicas puras, incluyendo aquellas de bases fuertes, dieron una recuperación mínima del 98% del teórico. Las sales de morfina, dieron resultados bajos, posiblemente debido a los grupos fenólicos presentes en la droga.

El error de estos métodos, reside en que se supone, que no hay otras sales presentes, tales como impurezas en la sal alcaloidica. Usando un intercambiador aniónico del tipo base fuerte aniónico cuaternario-la titulación final determina, de hecho, todos los cationes presentes en la sustancia y esto puede ser diferente, del contenido en alcaloides, particularmente en comprimidos y preparaciones galénicas (Específicos).

Para eliminar este error, Saunders, Elworthy y Fleming⁽¹⁸⁾, han propuesto un proceso que involucra dos etapas, que pueden llevarse a cabo juntas. La solución de la sal alcaloidica, se pasa a través de una columna de intercambiador aniónico, del tipo base fuerte, que libera los alcaloides. Estos pasan luego a través de una columna de inter-

cambiador catiónico, del tipo base débil, donde son absorbidos. Finalmente son desplazados del segundo intercambiador, por medio de etanol, ó, metanol saturado con amoníaco anhidro. El efluente es evaporado a sequedad y el alcaloide estimado por un método adecuado. El uso de un intercambiador catiónico, del tipo ácido débil, para la etapa de absorción es necesario, debido a la dificultad de obtener desplazamientos cuantitativos, de un intercambiador catiónico, del tipo ácido fuerte.

Achor y Gailing⁽²⁰⁾, han descripto un proceso de este tipo, para la determinación de morfina, en plantas, preparaciones farmacéuticas y tejidos animales.

Grant y Hilty⁽²¹⁾, han investigado la separación cuantitativa de morfina y codeína, por intercambio iónico, basados en el hecho, de que el grupo fenólico de la morfina, determina que esta sea absorbida por un intercambiador, aniónico, del tipo base fuerte, mientras que la codeína, sin grupos fenólicos, no es absorbida.

Bibliografía:

- (1) - LLOYD, J.U., Patente USA N° 1.300.747, 15 Abril 1919; Chem. Abstracts, 1901:11, 1919.
- (2) - WHITEHORN, J.C., J. Biol. Chem., 751:26, 1923.
- (3) - WHITEHORN, J.C., J. Biol. Chem., 633:108, 1935.
- (4) - UNGERER, E., Kolloid Z., 228:36, 1925; Chem. Abstracts, 2431:19, 1925.
- (5) - FINK, H., Patente USA N° 2.072.089, Marzo 2 de 1937.

- (6) - OBERST, F.W., J.Lab.Clin.Med., 318:24, 1938.
- (7) - APPELZWEIG, N., J.Am.Chem.Soc., 1990:66, 1944.
- (8) - APPELZWEIG, N. y BONZONI, S.F., Ind.Eng.Chem., 576:38, 1946.
- (9) - SUSSMAN S., MINDLER, A.B. y WOOD, W., Chemistry and Industry, 455:27, 1945.
- (10) - APPELZWEIG, N. y NACHOD, F.C., en Nachod F.C., Ion Exchange Theory and application, New York, Academic Press, 1949.
- (11) - BASHOUR, J.T., Patente USA N° 2.409.241, Octubre 15, 1946.
- (12) - FRANCK, R., Conferencia de Königsberg, 1936.
- (13) - REIMERS, F., GOTTLIEB, K.R. y CHRISTENSEN, V.A., Quart.J.Pharm.and Pharmacol., 99:20, 1947.
- (14) - BJORLING, C.O., Acta Chem.Scand., 392:1, 1947; Chem.Abstracts, 5614:42, 1948.
- (15) - JINDRA, A. y POHORSKY, J., J.Pharm.and Pharmacol., 361:2, 1950.
- (16) - JINDRA A. y POHORSKY, J., J.Pharm.and Pharmacol., 344:1, 1951.
- (17) - BAGGESGAARD-RASMUSSEN, H., FUCHS, D. y LUNDBERG, L., J.Pharm.and Pharmacol., 566:4, 1952.
- (18) - SAUNDERS, L., ELWORTHY, P.H. y FLEMING, R., J.Pharm. and Pharmacol., 32:6, 1954.
- (19) - HERR, D.S., Ind.Eng.Chem., 631:37, 1945.
- (20) - ACHOR, L.B. y GEILING, E.M.K., Anal.Chem., 1061:26, 1954.
- (21) - GRANT, E.W. y HILTY, W.W., J.Am.Pharm.Assoc., 150:42, 1953.

INVESTIGACIONES CROMATOGRAFICAS DE HORMONAS

NO ESTEROIDES

El uso de materiales de intercambio iónico, en la purificación de hormonas, no se ha limitado a casos, en que pueden lograrse las condiciones de equilibrio adecuadas, para el análisis del eluido. Se han realizado separaciones muy útiles y muchas purificaciones, por medio de adsorbentes, que no retienen la molécula activa, aunque retienen considerable cantidad de proteínas inertes. Además, en su bibliografía se encuentran procesos, en los cuales los materiales de intercambio iónico, se han usado para efectuar separaciones groseras.

Por otra parte, se han realizado separaciones basadas en procesos de intercambio iónico, con muchos tipos de adsorbentes diferentes de las resinas, las cuales tienen lugar, sea parcial o completamente, por medio de un mecanismo de intercambio iónico, ó desplazamiento iónico. Entre estos materiales, los varios tipos de polisacáridos modificados, introducidos por Mc Intire y sus ayudantes^(1,2) y más tarde desarrollados por varios otros investigadores^(3,4,5), han sido de particular importancia y continúan siéndolo, en el estudio de hormonas no esteroides.

El ACTH y la hormona melanocita-estimulante (MSH), en solución de ácido acético 0,1N, son fijados por la oxice-lulosa. Puede efectuarse una relativa separación de MSH y ACTH, por elusión de MSH con acético 80%⁽⁶⁾, que eluye el ACTH incompletamente⁽⁷⁾, ó bien eluyendo ambas hormonas con

ácido clorhídrico 0,1N y luego readsorbiendo el ACTH en una pequeña cantidad de oxichelulosa⁽⁸⁾.

La hormona del crecimiento y el prolactin, no son adsorbidos por la oxichelulosa.

Gran parte de la hormona oxitócica (pituitaria posterior) en solución de acético 0,1N, es adsorbida también en la oxichelulosa, pero no es eluida en cantidad apreciable, con ácido clorhídrico 0,1N⁽⁹⁾. La hormona tirotrópica (T.S.H.) en acético 0,1N es irreversiblemente adsorbida, pero cuando es tratada con el adsorbente en ácido más diluido, queda en el líquido sobrenadante y por lo tanto puede ser separada del ACTH⁽¹⁰⁾.

Otro adsorbente de aplicación general es "Amberlite XE-97". La hormona del crecimiento, es adsorbida por este a pH 5,2 de soluciones buffers que contienen 12% de solución de sulfato de amonio saturado⁽¹¹⁾. Bajo estas condiciones, el ACTH y la hormona folículo estimulante (F.S.H.) y probablemente TSH, no son adsorbidas, o lo son solo ligeramente. Puesto que la FSH es adsorbida a pH 5,2 de soluciones buffers diluidas, en ausencia de sulfato de amonio^(12,13) y que la TSH se adsorbe a pH 7,5 de una solución buffers de fosfato 0,05M⁽¹⁴⁾, será posible efectuar una separación de estas hormonas, en una columna de resina "Amberlite XE-97", por ajuste apropiado de las concentraciones salinas, ó del pH del solvente, o bien de ambos.

La hormona gonodetrópica de la pituitaria anterior, puede aislarse de la orina, agitando esta con "Permutita" du-

rante varias horas y luego eluyendo la hormona con hidróxido de amonio diluido (Lejwa, 1932)⁽¹⁵⁾. Katzman y colaboradores⁽¹⁶⁾ han realizado una aplicación similar de las técnicas de adsorción en la preparación de concentrados de hormonas gonodotrópicas, con potencias de 85.000 U.I. por mg.

Heideman⁽¹⁷⁾, halló que puede lograrse una retención completa de la hormona tirotrópica, con "Amberlite IRC-50", en forma sódica, entre pH 7-8, dado que el comportamiento de la hormona frente a la resina, coincide, con el de las sustancias, que tienen un punto isoeléctrico cercano a pH 8⁽¹⁸⁾. La TSH puede eluirse cuantitativamente del intercambiador catiónico, con solución de cloruro de sodio ó calcio.

Mo Shan y colaboradores⁽¹⁹⁾, han usado la resina de intercambio aniónico "Amberlite XE-59", en forma de cloruro, para concentrar la FSH, de extractos impuros provenientes de la glándula pituitaria de ovejas. La adsorción se efectúa a pH 5,8 y la elusión con acetato de sodio 3,72%. En esta forma puede eliminarse el 80% de la proteína inerte. Mo Shan y Meyer⁽¹²⁾ han purificado la FSH, presente en los concentrados anteriores, mediante columnas de "Amberlite XE-97".

La resina de intercambio catiónico "Amberlite RC-50", se ha empleado ampliamente en la purificación de adrenalina y noradrenalina. De acuerdo al procedimiento descrito por Bergstrom y Hansson⁽²⁰⁾, las hormonas son adsorbidas de soluciones buffer de fosfatos de pH 6,5 y eluidas con HCl diluido. Para separarlas de las proteínas y otras sustancias del suero, este se pasa a través de una pequeña columna de "Amberlite IRC-50", en forma sódica; la columna se lava con cloruro

de sodio 0,2M y luego se eluyen con ácido sulfúrico diluido.

Bibliografía:

- (1) - MC INTIRE, F.C., ROTH, L.W. y SHAW, J.L., J. Biol. Chem. 537:170, 1947.
- (2) - MC INTIRE, F.C. y SCHENCK, J.R., J. Am. Chem. Soc., 1193:70, 1948.
- (3) - ASTWOOD, E.B., RABEN, M.S., PAYNE, R.W. y GRADY, A.B., J. Am. Chem. Soc., 2969:73, 1951.
- (4) - PAYNE, R.W., RABEN, M.S. y ASTWOOD, E.B., J. Biol. Chem., 719:187, 1951.
- (5) - SOBER, H.A. y PETERSON, E.A., J. Am. Chem. Soc., 1711:76, 1954.
- (6) - LEHNER, A.B. y LEE, T.H., J. Am. Chem. Soc., 1066:77, 1955.
- (7) - ASTWOOD, E.B., RABEN, M.S. y PAYNE, R.W., en: Recent Progress in Hormone Research, Pincus G., ed., Vol. 7, Academic Press, New York, 1952, pag. 1.
- (8) - RABEN, M.S., ROSENBERG, I.N. y ASTWOOD, E.B., Federation Proc., 126:11, 1952.
- (9) - COHEN, H. y KLEINBERG, W., Endocrinology, 357:52, 1953.
- (10) - FELS, I.G., SIMPSON, M.E. y EVANS, H.M., J. Biol. Chem., 311:213, 1955.
- (11) - PAPPKOFF, H. y LI, C.H., Ion Exchangers in Organic and Biochemistry por Calmon G. y Kressman, T.R.E., eds. Interscience Publishers, Inc., New York, 1957, pag. 374.
- (12) - MC SHAN, W.H. y MEYER, R.K., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 278:88, 1955.

- (13) - RAACKE, I.D. y LI, C.H., Ion Exchangers in Organic and Biochemistry per Calmon C. y Kressman, T.E.R., eds. Interscience Publishers, Inc., New York, 1957, pag.374.
- (14) - CRIGLER, J.F., Jr., y WAUGH, D.F., J.Am.Chem.Soc., 4407:77, 1955.
- (15) - LEJWA, A., Biochem.Ztschr., 236:256, 1932.
- (16) - KATZMAN, P.A., GODFRID, M., CAIN, C.K. y BOISY, E.A., J.Biol.Chem. 501:148, 1943.
- (17) - HEIDEMAN, M.L., Jr., Endocrinology, 640:53, 1953.
- (18) - STEELMAN, S.L., GIFFCE, J.W., Jr., y HAWRYLEWICZ, E.J., Federation Proc., 292:11, 1952.
- (19) - MC SHAN, W.H., KAGAWA, C.M. y MEYER, R.K., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 393:85, 1954.
- (20) - BERGSTROM, S. y HANSSON, G., Acta Physiol. Scand., 87:22, 1950.-

RESUMEN

El uso de las resinas de intercambio iónico, proporciona un método conveniente, para la eliminación de iones inorgánicos de las enzimas. Estas, en común con todas las proteínas, son muy sensibles a las variaciones iónicas. Algunos iones poseen un efecto activante en la acción enzimática, mientras otros, producen una marcada inhibición o inactivación de las enzimas. Las resinas de intercambio iónico, permiten la pronta eliminación de iones activantes ó inhibidores y su reemplazo por otros inocuos, ó que poseen el efecto opuesto.

Así en el caso de la enzima, hexokinasa, aislada de cerebros de rata, el ión amonio es un activador, mientras que ión sodio, no activa ni inhibe. Durante la purificación de la enzima, la presencia de amonio, produce una considerable activación, debido presumiblemente, a la acción enzimática sobre sustratos naturales, presentes en el extracto de cerebro. Por pasaje del extracto, que contiene iones amonio, a través de una columna de "Amberlite IRC-50" en forma sódica, estos, son reemplazados por iones sodio y así se evita la activación de la enzima⁽¹⁾. Esta resina también se ha usado para reemplazar iones potasio y amonio, por sodio, en preparaciones de fosfohexokinasa.- Se ha empleado "Amberlite IR-4B" y "Wofatit M" para reemplazar iones, sulfato, por iones acetato, en soluciones de -amilasa salivar⁽²⁾.

La concentración de iones interferentes, pueden reducirse a muy bajos niveles, por pasaje a través de columnas de

intercambio. Cuando se empleó como sustrato el trifosfato de adenosina (A.T.P), purificado por pasaje a través de "Amberlite IR-100", el glutation⁽³⁾ y la glicina⁽⁴⁾, no ejercieron durante largo tiempo, un efecto activante sobre la miocina adenosintrifosfatasa⁽⁵⁾.

Aparentemente, el efecto activante de estos compuestos, reside en su capacidad para eliminar iones metálicos inhibidores, normalmente presentes en las preparaciones de ATP, pero ausentes en las preparaciones tratadas con resinas.

También se ha usado "Amberlite IR-100" en forma sódica, para eliminar iones cúpricos de soluciones de la oxidasa del ácido ascórbico⁽⁶⁾ y de la tirosinasa⁽⁷⁾. Se ha desarrollado un método para evitar la coagulación de la sangre, basado en la anulación de la actividad de la protrombinasa, por eliminación de los iones calcio, con "Amberlite IR-100"⁽⁸⁾.

Bibliografía:

- (1) - MUNTZ, J.A. y HURWITZ, J., Arch. Biochem and Biophys., 137:32, 1951.
- (2) - MEYER, K.H., FISCHER, E.H., BERNFIKED, P. y STRAUB, A., Experientia, 455:1, 1947.
- (3) - ZIFF, M., J. Biol. Chem., 25:153, 1944.
- (4) - BAILEY, K., Biochem. J. (London), 121:36, 1942.
- (5) - POLIS, B.D. y MEYERHOF, O., J. Biol. Chem., 389:169, 1947.
- (6) - BAKER, C.G. y SOBER, H.A., J. Am. Chem. Soc., 4058:75, 1953.
- (7) - DRESSLER, H. y DAWSON, C.R., Ion Exchangers in Organic and Biochemistry por Calmon C. y Kressman, T.E.R., eds. Interscience Publishers, Inc., New York, 1957, pag. 380.
- (8) - STEINBERG, A., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 124:56, 1944.

APLICACIONES DE LAS RESINAS DE INTERCAMBIO EN HEMATOLOGIA

El uso de intercambiadores iónicos en hematología ha encontrado múltiples aplicaciones. Sin embargo, muy pocos trabajos relacionados con la determinación de los constituyentes del plasma y suero, pueden encontrarse en la literatura anterior a 1940.

Los intercambiadores iónicos por eliminación del calcio, permiten la recolección de sangre en su estado natural, sin que coagule. Este procedimiento, ha facilitado grandemente la separación de elementos figurados de la sangre y de ciertas fracciones del plasma.

También se han aplicado con éxito a la separación preliminar de otros constituyentes químicos de la sangre. Estos se determinan con mayor precisión una vez asegurada su separación de las sustancias interferentes.

Coagulación de la sangre

Steinberg (1944)⁽¹⁻²⁾, fué el primero en proponer el uso de un intercambiador catiónico, en ciclo sodio, en la extracción del calcio de la sangre, para evitar su coagulación. La extracción de calcio se llevó a cabo, pasando la sangre a través de una columna de la resina, o por simple mezcla de la resina con la muestra de sangre. Los análisis indicaron que la sangre tratada con resina difería significativamente de la sangre oxalata en algunos aspectos.

Influencia del tratamiento con oxalato o con resina intercam-
biadora sobre las propiedades de la sangre (1)

<u>Determinación</u>	<u>Muestra</u>	<u>Tratada con resina</u>	<u>Normal ó oxalata</u>	(x)
Recuento de Hematíes (millones/mm ³)	1	4,85	4,78	
	2	4,76	4,60	
	3	4,73	4,53	
	4	4,09	4,05	
	5	5,21	5,00	
Hemoglobina (Gm/100cc)	1	14,80	14,50	
	2	13,5	13,2	
	3	12,5	11,6	
	4	14,5	14,2	
	5	14,0	13,5	
Eritrosedimentación (mm/hora)	1	3,5	9,2	
	2	8,0	13,5	
	3	15,0	22,0	
Volumen globular(%)	1	37,0	32,0	
	2	33,0	28,5	
Recuento de glóbulos blancos (por mm ³)	1	6250	5200	
	2	7400	6700	
	3	10500	8800	
Recuento de plaquetas (por mm ³)	1	310000	260000	
	2	240000	220000	
	3	375000	320000	
	4	260000	250000	
Tiempo de protrombina (en segundos)	1	16,8	21,2	
	2	24,2	25,6	
	3	13,6	15,4	
	4	15,4	17,2	

(x) Resultados obtenidos con sangre capilar.

Usando una resina purificada "Amberlite IR-100", Stefanini (1948)^(3,4,5) trató muestras de sangre y encontró que tal procedimiento disminuía la velocidad de sedimentación, pero no modificaba las propiedades morfológicas, químicas o físicas de la sangre.

Estudios serológicos y químicos de sangre tratada con resina y con oxalato⁽¹⁾.

<u>Determinación</u>	<u>Tratado con resina.</u>	<u>Tratado con oxalato(x) (xx)</u>
Glucosa (mg.%)	111,2	114,0
Nitrógeno de urea(%)	14,3	13,8
Acido úrico (%)	4,1	4,4
Proteínas totales (Gm)	7,31	7,25
Relación A/G	2,03	2,16
Albumina (Gm)	4,90	4,75
Globulina (Gm)	2,41	2,20
Fibrinógeno	0,268	0,324
Nitrógeno no proteico(mg.%)	29,1	26,4
Fósforo inorgánico(mg.%)	2,6	2,2
Glucosa(24 horas) (mg.%)	22,5	45,0
Peso específico,sangre entera	1,0623	1,0278
" " ,plasma	1,0285	1,0278
Capacidad de oxígeno (cc)	22,73	21,99
Prueba de floculación cefalina-colesterol	Negativo	Negativo
Creatinina (mg.%)	1,2	1,2
Colesterol (mg.%)	182,0	194,0

Suerología: (xx)

Reacción de Wassermann	Negativa	Negativa
" " "	XXXX	XXXX
Reacción de Kahn	Negativa	Negativa
" " "	XXXX	XXXX
" " Mazzini	Negativa	Negativa

(x) Promedio de cinco muestras.

(xx) Suero para suerología.

Específicamente hubo cambios en: protrombina, fibrinógeno y en el factor lábil de Quick (1947)⁽⁶⁾. En muestras de sangre tratada y luego recalcificadas, se encontró que coagulaban en mucho menor tiempo de lo que lo hacía la sangre normal, pero como fué indicado por Stefanini, esta es también una característica de la sangre oxalatada y citratada.

Appelzweig y Rice (1949)⁽⁷⁾, determinaron la cantidad de calcio extraído de la sangre por el tratamiento con resinas. Hallaron que un 80% del calcio sanguíneo era extraído; lo cual dejaría un contenido residual de calcio adecuado para permitir la coagulación y como la muestra no coaguló, se creyó que el calcio remanente debía estar complejado.

Con anterioridad a la fecha de este trabajo, Quick (1947)^(8,6) habían empleado resinas para estudiar la relación cuantitativa entre calcio y protrombina. Llegó a la conclusión de que la concentración óptima ó crítica de calcio, para la máxima actividad de protrombina, era menor que la cantidad de calcio libre ó ionizado. Recientemente, este mismo

grupo (Hussey y colaboradores, 1950)⁽⁹⁾, hizo un estudio de la influencia de la heparina y el citrato de sodio, en la absorción de calcio por "Amberlite IB-100" en ciclo sodio. La heparina no modificó la acción descalcificadora del intercambiador de iones. El citrato produjo un efecto, que mantuvo una relación lineal inversa, desde el punto de vista de la molaridad del citrato de sodio, a la cantidad de calcio eliminado de las preparaciones probadas.

La eliminación de calcio sanguíneo por intercambio iónico, tiene gran importancia también en su aplicación a los procedimientos de "bancos de sangre" (10,11,12).

Las probabilidades de que ocurran hemorragias, contraindicando el uso medicinal de resinas de intercambio catiónico, son remotas, las cantidades de resinas presentes tendrían que ser muy grandes. En las condiciones de la aplicación práctica de estos agentes, la eliminación de calcio, esencial para la prevención de la coagulación no puede ser alcanzada.

Determinaciones químicas cuantitativas de los constituyentes de la sangre

a) Ergotionina: ⁽¹³⁾ Su determinación se basa en su copulación con el ácido sulfanílico diazotado; una reacción muy sensible para ergotionina y además específica. Pueden ocurrir, sin embargo, varias reacciones interferentes entre el diazoreactivo y la ergotionina, ej.: algunas sustancias, entre ellas tiro-sina, desarrollan un color naranja que enmascara el color magenta dado por la ergotionina, mientras otras sustancias (glutati6n), pueden inhibir la formación de color.

Las sustancias interferentes, pueden ser eliminadas por extracción con solventes orgánicos y pasaje de la sangre filtrada através de resina de intercambio aniónico altamente básica "Amberlite IRA-410", que adsorbe los citados cuerpos interferentes tirosina y glutatión.

b) Coolesterol en suero: Forbes é Irving⁽¹⁴⁾, han descripto un método para la determinación de coolesterol, basado en el uso del intercambiador iónico inorgánico "Doucil". Cuando es tratado con cloroformo, el "Doucil", absorbe todos los compuestos proteicos, pero no absorbe coolesterol ú otras sustancias, similares. Para su uso, el intercambiador es mezclado con cloroformo. La sangre, plasma, é suero, son luego tratados con el intercambiador, en presencia de un pequeño volumen de agua, que es necesaria para extraer todo el coolesterol del cloroformo.

La adición de un gran volumen de cloroformo, liberará luego el coolesterol directamente, sin contaminación con otros componentes de la sangre, que interfieren con la reacción de Lieberman-Bouchard.

c) Concentración salina total en suero sanguíneo: La determinación de bases totales en suero sanguíneo, ha sido acortada considerablemente por Polis y Reinhold⁽¹⁵⁾, empleando la técnica siguiente: 0,2 ml. de suero se pasan a través de una microcolumna, llenada con una resina sulfónica en su forma ácida (R-H). La resina se eluye con agua y el efluente que contiene ClH , PO_4H_3 , CO_2 , proteínas, etc., se trata con aire, libre de CO_2 , para eliminar el dióxido de carbono presente y

se titula con álcali estandarizado hasta el pH de una muestra de suero, que ha sido aerada, pero no tratada con intercambiador de iones.

Dado que las bases presentes con CO_3H^- no están incluidas en esta titulación, se realiza una determinación separada de CO_2 combinado por medición gasométrica.

Los resultados logrados con el método de intercambio iónico, están de acuerdo con los obtenidos mediante el método electrolítico de tiempo-consumo eléctrico.

Un método similar ha sido usado por Gorter y van Royen⁽¹⁶⁾. Estos autores recogen el afluyente de la columna de intercambio catiónico, en un frasco conteniendo HONa 0,1N en exceso; después que la columna se lava con agua libre de CO_2 , el exceso de álcali es titulado con ácido en presencia de azul de bromo timol. Según los mismos autores no es necesario para fines prácticos efectuar correcciones por diferencias de pH, entre el punto final de la titulación y el original del suero.

d) Acido láctico: Markus⁽¹⁷⁾, aplicó una resina de intercambio catiónico, para eliminar sustancias que interfieren con la determinación colorimétrica de ácido láctico, en sangre y otros humores orgánicos. Las etapas en el método son: 1) desproteínización; 2) eliminación de azúcares; 3) intercambio catiónico; 4) determinación colorimétrica con p-hidroxidifenilo.

En la etapa de intercambio iónico se usa una columna llena con resina sulfónica en su forma ácida (R-H).

Todos los cationes incluyendo Cu^{++} son eliminados, así como los aminoácidos presentes. El ácido láctico es determinado en una parte alícuota del efluente. El intercambiador puede absorber parte del ácido. Esta fuente de error debe ser eliminada lavando la resina después de la absorción.

e) Fraccionamiento de las proteínas del plasma sanguíneo:
La precipitación fraccionada de las proteínas del plasma sanguíneo puede realizarse por disminución de la concentración iónica de la solución, mediante dilución o diálisis de la misma. Otra manera conveniente, es disminuir la concentración salina, por medio de un intercambiador de iones. Este principio ha sido usado por Reid y Jones^(18,19). Deben tomarse precauciones especiales para evitar la desnaturalización de las proteínas, lo que ocurre si el pH del suero sanguíneo no se mantiene cercano al neutro. Los autores recomiendan un proceso por lotes ("batch") (se mezcla la solución a tratar con una cantidad de resina y se agita), con agregados progresivos de una mezcla de una resina sulfónica, en su forma ácida (R-H) y una resina básica fuerte, en su forma básica (R-OH)⁽¹⁹⁾. Cuando se alcanza la concentración salina requerida para que precipite la primera fracción (gama globulina), la solución es separada de la resina, por filtración y centrifugada para separar la gama globulina. Con la progresiva eliminación de sales (reducción de la fuerza iónica) son precipitadas la beta y alfa globulinas. También han publicado trabajos sobre este tópico Hill, Habermann y Guy⁽²⁰⁾. Se han realizado experiencias sobre elec-

troforesis con proteínas, empleando un intercambiador de cationes⁽²¹⁾. Una resina sulfónica colocada en un brazo del tubo en U no modificó la distribución de las cargas de las proteínas.

f) Histamina: Hasta el momento se han publicado solo pocos procedimientos analíticos sobre la separación de aminas por medio de intercambiadores de iones. Witehorn⁽²²⁾, realizó la separación de varias aminas por medio de zeolitas sintéticas.

Se ha logrado la separación de histamina de la sangre y otros líquidos biológicos por medio de zeolitas sintéticas⁽²³⁾ y "succinato ácido de algodón"⁽²⁴⁾.

Se han obtenido resultados más favorables en experiencias con una resina carboxílica, con la cual se puede efectuar una fácil y completa elusión mediante un ácido diluido. Este método ha sido usado por Lubsches⁽²⁵⁾ así como por Bergström y Hansson⁽²⁶⁾.

g) Separación de aureomicina: La zeolita sintética "Decalco" ha sido utilizada por Saltzman⁽²⁷⁾ en la determinación de aureomicina en sangre y orina.

La aureomicina, en soluciones diluidas es retenida por la zeolita. La elusión se efectúa por medio de una solución de CO_3Na_2 al 5% a elevada temperatura. La aureomicina es determinada fluoroscintométricamente en el eluido.

Bibliografía

- (1) - STEINBERG, A., Proc. Sec. Exper. Biol. Med., 124:56, 1944.
- (2) - SWEET, W. J. y SWEENEY, O. R., Proc. Iowa Acad. Sc., 299:51, 1944.
- (3) - STEFANINI, M., Proc. Sec. Exper. Biol. Med., 22:67, 1948.
- (4) - STEFANINI, M., Acta Med. Scand., 250:136, 1950.
- (5) - STEFANINI, M y QUICK, A. J., Am. J. Phys., 389:152, 1948.
- (6) - QUICK, A. J., Am. J. Phys., 211:148, 1947.
- (7) - APPLEZWEIG, N. y RICE, M., Nached P. O., Ion Exchange Theory and Application, New York Academic Press, 1949.
- (8) - QUICK, A. J., Science 591:106, 1947.
- (9) - HUSSEY, C. V., QUICK, A. J., STEFANINI, M., CONBOLAZIO, C. F. y SARGENT, F., J. Biol. Chem., 105:184, 1950.
- (10) - STEFANINI, M. y DAMESHEK, W., New Engl., J. Med., 797:248, 1953.
- (11) - TULLIS, J. L., New York State J. Med., 525:53, 1953.
- (12) - WALTER, C. W., Proc. Congr. Am. Coll. Surgeons, 483, 1950.
- (13) - MELVILLE, D. B. y LUBSCHEZ, R., J. Biol. Chem., 275:200, 1953.
- (14) - FORBES, J. C. y IRVING, H., J. Lab. Clin. Med., 909:16, 1930-1931.
- (15) - POLIS, R. D. y REINHOLD?, J. G., J. Biol. Chem., 231:156, 1944.
- (16) - GORTER, E. y van ROYEN, A., Koninkl. Nederland Akad. Wetenschap. Proc., 824:51, 1948.
- (17) - MARKUS, R. L., Arch. Biochem., 159:29, 1950.
- (18) - REID, A. F. y JONES, F., Am. J. Clin. Path., 10:19, 1949.
- (19) - REID, A. F. y JONES, F., Ind. Eng. Chem., 1074:43, 1951.
- (20) - HILL, J. M., HABERMAN, S. y GUY, R., Am. J. Clin. Path., 134:19, 1949.

- (21) - SOBER, H.A., KEGELES, G. y GUTTER, F.J., Science, 564:110, 1949.
- (22) - WITBORN, J.C., J.Biol.Chem., 751:56, 1923.
- (23) - ROBERTS, M. y ADAM, H.M., Brit. J.Pharmacol., 525:5, 1950.
- (24) - MC INTIRE, P.C., ROTH, L.W. y SHAW, J.L., J.Biol.Chem., 537:170, 1947.
- (25) - LUBSCHEZ, R., J.Biol.Chem., 731:183, 1950.
- (26) - BERGSTROM, S. y HANSSON, G., Acta Physiol.Scand., 87:22, 1951.
- (27) - SALTZMAN, A., J.Lab.Clin.Med., 123:35, 1950.

APLICACIONES DE SUSTANCIAS INTERCAMBIADORAS DE IONES
EN UROLOGIA

La orina contiene una gran variedad de sustancias, muchas de ellas en pequeñas cantidades. Su análisis presenta frecuentemente dificultades, debido a la similitud química y a la carencia de métodos analíticos específicos para la detección de sus componentes. Es por lo tanto muy conveniente y aún necesario, separar una sustancia ó grupo de sustancias afines, de los otros numerosos componentes de la orina.

En los últimos años, los intercambiadores de iones, se han convertido en "auxiliares" del análisis, muy adecuados para esta tarea. Los métodos de separación por intercambio iónico, han tomado lugar al lado de los métodos clásicos, tales como extracción, destilación y precipitación y han sido aplicados a análisis cuantitativos, así como a la separación de los constituyentes de la orina. En este último caso, el intercambio iónico, puede ser usado en conjunción con cualquiera de los viejos métodos de separación.

Los intercambiadores de iones, se han usado en el análisis cuantitativo, de los componentes urinarios, ya sea para fijar el componente deseado, que es seguidamente eluido, o para eliminar sustancias interferentes. En ambos casos es importante que la recuperación del componente deseado sea completa.

Existen dos caminos para la separación de los constituyentes urinarios, por medio de intercambiadores de iones,

cualquiera que sea el propósito buscado: 1°) El proceso de intercambio iónico, se usa para fijar un único componente, que es luego eluido y determinado cuantitativamente, o bien purificado. Como los intercambiadores de iones, reaccionan con grupos de sustancias que tienen la misma carga, es a menudo difícil conseguir la separación de un único componente iónico. Las condiciones deben ser rigurosamente controladas y los métodos ejecutados en forma adecuada, ya sea para diversas fijaciones o diversas eluciones.

Si las separaciones efectuadas no son definidas y varias sustancias son fijadas y eluidas juntas, deben ser aplicados métodos analíticos específicos, para las sustancias bajo investigación, además, debe considerarse siempre la posible, presencia de sustancias desconocidas en la orina.-

2) El proceso de intercambio iónico se usa para dividir la orina en varias fracciones, de carácter ácido, básico y neutro. Cada una de estas puede ser luego analizada cuantitativamente por sus constituyentes individuales, ó posteriormente tratadas para separar componentes aislados. Tales fracciones son especialmente adaptables a procesos cromatográficos. De esta forma se adquiere un conocimiento de la compleja composición de la orina. El análisis para cualquier componente, se facilita por uno o más fraccionamientos preliminares.

I - Separación de componentes de la orina.

1 - Intercambiadores catiónicos: Los intercambiadores catiónicos

nicos, se han utilizado en la separación de una gran variedad de sustancias de la orina. Muchas de estas separaciones, fueron en parte, debidas a la temprana disponibilidad comercial de los intercambiadores catiónicos y al gran interés en las bases nitrogenadas de la orina, como productos finales de metabolismo del nitrógeno.

Hay dos tipos de intercambiadores catiónicos disponibles: el intercambiador catiónico del tipo ácido fuerte, que contiene primariamente grupos de ácidos sulfónicos y el tipo ácido débil, que son, o bien, resinas que contienen grupos carboxílicos, ó intercambiadores inorgánicos, tales como los silicatos de aluminio. Ambos tipos de intercambiadores-sulfónicos y carboxílicos- pueden extraer cationes, por intercambio con iones de hidrógeno. En una primera aproximación, las reacciones de intercambio iónico, siguen la ley de acción de masas y todas las reacciones son reversibles. El que un catión dado sea fijado, dependerá de la concentración de los otros cationes presentes y de la afinidad química de los diferentes iones, por el intercambiador.

Los intercambiadores catiónicos del tipo ácido fuerte, fijan los cationes en casi toda la escala de pH; frecuentemente lo fijan tan firmemente, que la elusión es difícil y requiere grandes volúmenes de ácido mineral muy concentrado (iones hidrógeno).-

Por otra parte, los intercambiadores del tipo ácido débil, reaccionan con los cationes, solo a pH relativamente alto, pues solo bajo estas condiciones, los intercam-

biadores están en su forma disociada. La elusión puede ser efectuada fácilmente, con pequeños volúmenes de ácidos diluidos, debido a la gran afinidad de los intercambiadores, por el ión hidrógeno.

En ambos tipos de intercambiadores, ácido débil y fuerte, pueden usarse otros cationes para reemplazar a los ya ligados, por su mayor afinidad con los grupos de intercambio.

a) Cationes inorgánicos: El intercambio iónico, se ha usado para la concentración y subsiguiente determinación, de pequeñas cantidades de elementos radiactivos en la orina (1,2,3,4).

El itrium (Y 91), presente en orina acidificada, se fija en una columna de resina de intercambio catiónico ácido fuerte⁽³⁾. Como el ión itrium, trivalente, tiene gran afinidad con el intercambiador, otros cationes presentes, uni y bivalentes, pueden ser eluidos, primero con clorhídrico diluido (0,4 molar); luego el itrium es eluido cuantitativamente, con un pequeño volumen de clorhídrico 7 M se lleva a sequedad y su radioactividad se mide luego de humedecer las cenizas, con ácido nítrico y evaporar casi a sequedad, para destruir materias orgánicas.

Los iones sodio de la orina, han sido determinados cuantitativamente, pasando 1 a 2 ml. de orina, a través de una columna de resina de intercambio catiónico del tipo ácido fuerte⁽⁵⁾. Una solución 0,05 M de cloruro de bario, eluye primero el sodio y amonio dejando el potasio y otros catio-

nes en la columna. En el eluido, previa precipitación del Bario como sulfato, el cloruro de sodio, es convertido en hidróxido de sodio, por pasaje a través de una columna de resina de intercambio aniónico del tipo base fuerte, en su forma base libre. El amonio, es eliminado de este efluente por ebullición y el hidróxido de sodio, se titula con clorhídrico 0,01 M, para obtener la concentración de ión sodio en la muestra. No obstante, una sustancia desconocida que se eluye junto con el sodio, puede causar inconvenientes.

Para retener iones amonio y magnesio de la orina, puede usarse un intercambiador catiónico del tipo ácido fuerte, así como una de tipo ácido débil⁽⁶⁻⁷⁾. El clorhídrico 0,1 M eluye primero el amonio y luego el magnesio bivalente. También este último puede ser eluido con clorhídrico M, de una resina de intercambio catiónico del tipo ácido fuerte. Ambos iones pueden determinarse cuantitativamente en el eluido.

Amonio: Folin, en 1919, fue el primero en introducir intercambio iónico en análisis biológicos⁽⁸⁾.

En su ya clásico método, la zeolita sintética "Permutita", un silicato de aluminio y sodio insoluble, se usa para la separación de amonio de la orina. En soluciones neutras ó débilmente ácidas, la "Permutita" intercambia parte de sus iones sodio, por iones amonio. Después de agitar la "Permutita" con orina por breves minutos, se deja sedimentar, se decanta el líquido sobrenadante y se lava la "Permutita" con agua destilada. La reacción es reversible, luego en presencia de un exceso de hidróxido de sodio, el amonio es puesto en libertad e-

tra vez. Esta elusión es facilitada, por la supresión de la ionización del amonio, en solución fuertemente alcalina. El amonio puede ser luego determinado colorimétricamente por nesslerización.

El mismo método puede utilizarse con buenos resultados, para eliminar amoniaco de soluciones de ureasa, ⁽⁹⁾ ó de orina, antes de determinar úrea per ureasa, seguida por nesslerización directa ó aereación ⁽¹⁰⁻¹¹⁾.

Cuando la "Permutita" se usa para eliminar amoniaco, para determinar el contenido en aminoácidos de la orina, con 4-sulfonato de 1-2 Naftoquinona ⁽¹²⁾ se introduce un error, debido a la eliminación simultánea de los aminoácidos básicos ⁽¹³⁾.

El uso de carbón tratado con ácido sulfúrico, como intercambiador de ión hidrógeno, ó bien de zeolita natural ó artificial, para extraer amoniaco de la orina, despues del tratamiento con ureasa, ha sido propuesto como un método para la producción comercial de amoniaco en China ⁽¹⁴⁾.

Derivados de la guanidina: Como se mencionó antes, los intercambiadores del tipo ácido débil, funcionarán sólo en su forma disociada, a pH elevado o próximo a la neutralidad. Ellos son completamente inefectivos debajo de pH 3,5 ó 4, en relación con el pK del grupo de intercambio. Por otra parte, las bases para poder ser fijadas deben estar siempre disociadas. Consecuentemente, sólo bases relativamente fuertes, pueden reaccionar con intercambiadores del tipo ácido débil.

Whitehorn ⁽¹³⁾ determinó, que solo las bases con un

pK de 5,7 (constante de disociación en la terminología de Bronsted) o más, son retenidas por la "Permutita". Para "Amberlite IRC-50" este pK debe ser de 4 ó más⁽¹⁵⁾.

De este modo, los intercambiadores del tipo ácido débil, son un medio para la separación de bases fuertes y han sido usados, en la separación de derivados de guanidina de la orina. Esta separación es necesaria, antes de usar el reactivo de Sakaguchi, porque este reacciona en igual forma con arginina, ácido guanidoacético (glicocianina) y otros derivados mono sustituidos de la guanidina, todos presentes normalmente en la orina. La arginina (pK₂ 9,04) es fija diluyendo la orina 5 a 10 veces y filtrando 5 ml., a través de una columna de seolita sintética (0,9 grms.). El ácido guanidoacético, pasa a través de la resina, de lo cual se puede inferir, que este no está como catión en solución neutra. El reactivo de Sakaguchi, puede entonces usarse para determinar ácido guanidoacético, en el efluente⁽¹⁶⁾ y arginina en el eluido, luego de la elusión de la columna de intercambiador, con 10 ml. de cloruro de sodio al 3%⁽¹⁷⁾. Estos autores, han publicado resultados satisfactorios para orinas normales, aunque admiten que la fracción de la arginina, puede contener otros derivados monosustituidos que son bases fuertes, tales como monometilguanidina. En otro método, el contenido en arginina, se estima por la diferencia en intensidad de color, de la reacción de Sakaguchi, realizada sobre partes alícuotas de orina, antes y después del tratamiento con la seolita sintética⁽¹⁸⁾. Se ha intentado el uso de la forma sódica, de una resina de intercambio catiónico de tipo sulfónico, en lugar de silicatos de aluminio sintéticos⁽¹⁹⁾, pero la elusión de arginina, de

este tipo de resina, es difícil.

c) Vitaminas: Los intercambiadores de iones de tipo ácido débil, han sido también usados, para la determinación cuantitativa de ciertas vitaminas del grupo B, en la orina.

La eliminación de tiamina, de la orina a pH 5, por agitación con arcilla ácida, fué dada a conocer por primera vez en 1936 ⁽²⁰⁾. La arcilla fué administrada a ratas para efectuar ensayos biológicos (método de bradicardia). La primera prueba química, de la presencia de tiamina en orina, fué obtenida por el mismo proceso de intercambio iónico, elusión con barita y subsiguiente oxidación de tiamina a tiocromo ⁽²¹⁾.

Los silicatos de aluminio y sodio, se han usado extensivamente, para la separación de tiamina de orina a pH 4 a 4,5. Después de lavar el intercambiador con agua, se efectúa la elusión con cloruro de potasio al 25% acidificado. La tiamina presente en el eluido, es estimada luego, como tal, colorimétricamente ⁽²²⁾, ó oxidada a tiocromo con ferricianuro alcalino, extraído con isobutanol y determinado fluorescimétricamente o colorimétricamente.

Este método no es enteramente satisfactorio cuando se aplica a orina; por ello tiene gran número de modificaciones ^(23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33). La orina contiene otras sustancias, (por ejemplo, N^1 -metilnicotinamida), que son tan similares a la tiamina en su comportamiento, con un intercambiador de tipo ácido débil, que no son separadas de la tiamina en este proceso. Además, la N^1 -metilnicotinamida, que de

por sí es fluorescente, puede ser oxidada a un segundo compuesto, también fluorescente⁽³⁰⁾. En los intentos para mejorar este método analítico, se efectúan diversos ensayos en blanco^(23,27,28,29,30,31,33) y se mide la absorción de la luz⁽³³⁾ del tiocromo, en lugar de su fluorescencia.

Más efectiva es la separación de tiamina, de N¹-metilnicotinamida, por elusión diferencial. Cuando un pequeño volumen de orina es agitado con "Permutita" ó "Decalco", la N¹-metilnicotinamida y la tiamina son ambas retenidas, la primera puede ser eluida con ácido diluido⁽²⁶⁾, mientras que la última está más fuertemente ligada y puede ser eluida posteriormente con cloruro de potasio al 25%. Con estas técnicas, pueden determinarse cantidades, tan pequeñas como 0,1 /ug. por ml. de orina. La recuperación promedio de tiamina agregada es del 92 al 96%⁽³²⁾.

Un método idéntico, excepto por la omisión del paso de oxidación^(34,35,36), se utiliza para la separación^(37,38,39,40), así como para la determinación cuantitativa^(41,42) de N¹-metilnicotinamida, el principal producto final, del metabolismo del ácido nicotínico en orina. En todas las modificaciones de este método, la recuperación de la columna de "Permutita", es de un 85% en el mejor de los casos; pérdidas adicionales, se cometen en la conversión de N¹-metilnicotinamida, en el derivado fluorescente y en su extracción con isobutanol^(41,42). Recientemente se ha hecho más específica la etapa inicial⁽⁴³⁾, elevando el pH de fijación a 7. Esto lleva a la eliminación, en el efluente, de dos bases relativamente débiles, que son la nicotinamida y el N¹-metil-6-

piridona-3-carboxamida, otro producto del metabolismo del ácido nicotínico. La N^1 -metilnicotinamida, es retenida y subsiguientemente determinada colorimétricamente, en el eluido, con recuperación de N^1 -metilnicotinamida agregada, muy elevados: 96%.

El ácido pantoténico, ha sido estimado cuantitativamente en orina, como B-alanina, después de su hidrólisis ácida⁽⁴⁴⁾. La B-alanina, fué separada cromatográficamente, de otros aminoácidos, en una columna de resina de intercambio catiónico, de tipo ácido fuerte, en su forma sódica, por elusión con un "buffer" de pH 4,9.

d) Aminas: Los procedimientos de intercambio iónico, facilitan grandemente la valoración de compuestos, presentes en la orina, en concentraciones extremadamente bajas (10 a 30/ μ g. por 24 horas-individuo), como puede demostrarse con varias aminas fisiológicamente activas.

Algunas de estas son excretadas, en gran parte, en forma conjugada y son retenidas por intercambiadores catiónicos, luego de una hidrólisis ácida moderada. Generalmente, estas aminas, son fijadas por intercambiadores de tipo ácido débil a pH 6-8; en estas condiciones las aminas se encuentran como cationes. La noradrenalina, adrenalina e hidroxitiramina, son fijadas por hidróxido de aluminio^(45,46,47), ó per la resina carboxílica "Amberlite IRC-50"⁽⁴⁵⁾. La histamina es fijada por "Decalso"⁽⁴⁸⁾ o por "Amberlite IRC-50"⁽⁴⁵⁾. Como la alanina es anfótera, el proceso descrito, es semejante a un mecanismo de intercambio iónico. Las aminas son eluidas, ya sea con ácido ó con álcalis, que suprimen la ionización del intercambia-

dor ó de la amina.

Se han dado a conocer procesos similares, para la separación de cantidades apreciables de etanolamina de la orina (49,50,51).

e) Aminoácidos: Puesto que los aminoácidos, pueden existir, tanto como cationes ó aniones, es posible su retención en columnas de intercambio aniónicas e catiónicas. Una resina de intercambio catiónico de tipo sulfónico "Dowex 50-Na", se ha empleado para fijar los aminoácidos, así como otros cationes presentes en la orina humana a pH 2,5⁽⁵²⁾. Para separar los aminoácidos uno de otros, fué necesario una elusión cromatográfica con "buffers" de pH creciente, manteniendo un cuidadoso control de temperatura. El gran número de aminoácidos y otros constituyentes presentes en el eluido, que reaccionan con la ninhidrina, han sido estimados cuantitativamente. Para la recuperación cuantitativa de los aminoácidos básicos, se utilizó una segunda columna de "Dowex 50" y "buffers" de un pH inferior a 7, sin embargo, se obtuvieron separaciones de bajo rendimiento. Recientemente el método ha sido mejorado y aplicado a orina de gato⁽⁵³⁾. Incrementando la concentración de los "buffers" de elusión, así como el pH (pH 5), los aminoácidos básicos, pueden ser eluidos y recobrados cuantitativamente, no siendo necesaria la segunda columna.

Por el procedimiento anteriormente mencionado, fué aislado un nuevo aminoácido, la 3-metil histidina⁽⁵⁴⁾. Un derivado del ácido glutámico, lábil al calor, fue aislado de la

orina de ratas deficientes en ácido fórmico. Se absorbió en "Dowex 50", procediéndose luego a su elusión con ácido⁽⁵⁵⁾.

Cuando la elusión se lleva a cabo con ácido, el orden de salida de los aminoácidos, en el eluido de una columna de resina sulfónica, es determinado exclusivamente, por la afinidad de los aminoácidos con la resina⁽⁵⁶⁾. Cuando se usan "buffers" para la elusión, el orden de salida, está determinado por su afinidad con la resina y por sus constantes de disociación (pK_1 para los aminoácidos ácidos y neutros, pK_2 para los aminoácidos básicos).

f) Hormonas proteicas: La gonadotropina coriónica de la orina de embarazo, fué retenida por "Permutita" a pH 3,5 a 4 y subsiguientemente eluida, con una solución de hidróxido de amonio diluido⁽⁵⁷⁾, ó con una solución alcohólica de acetato de amonio⁽⁵⁸⁾.

Si la hormona actúa como un catión, el pH al cual ocurre la fijación, deberá estar debajo de su punto isoelectrico. Como el punto isoelectrico de la hormona, es de 3,2 a 3,3⁽⁵⁹⁾, es dudoso que el mecanismo de esta reacción sea de intercambio iónico. Este método fué aplicado para separar y concentrar gonadotropina urinaria, previamente al ensayo de preñez, con hembras de sapo (*xenopus laevis*), sin tal concentración, sería necesario inyectar mayores cantidades de orina, para obtener ovulación⁽⁶⁰⁾.

El hidróxido de aluminio se demostró que fija gonadotropinas urinarias a pH 4 las que pueden ser eluidas a pH 10⁽⁶¹⁾.

Esto sin embargo puede ser interpretado como un proceso de intercambio aniónico.

g) Drogas (aureomicina, morfina): De las otras posibles aplicaciones de los intercambiadores catiónicos en orina, las dos siguientes, pueden mencionarse como ejemplo en el análisis de drogas ingeridas. La aureomicina es retenida por "Decalco" en su forma hidrógena⁽⁶²⁾. La morfina es extraída de la orina con un solvente orgánico, que luego es evaporado; el residuo se disuelve en agua. La morfina se fija con una zeolita sintética⁽⁶³⁾.

2 - Intercambiadores aniónicos: Hay comparativamente pocas aplicaciones de intercambiadores aniónicos, a la separación y determinación cuantitativa, de los componentes de la orina. Los intercambiadores aniónicos disponibles son, o bien bases débiles, conteniendo grupos de aminas primarias o secundarias, ó bases fuertes, conteniendo guanidina ó grupos amonio cuaternarios. El reciente desarrollo de los intercambiadores aniónicos, de tipo base fuerte, ha hecho posible realizar intercambios aniónicos a elevado pH y en consecuencia analizar, tanto ácidos débiles como fuertes. Las mismas consideraciones hechas para intercambiadores catiónicos se aplican aquí, excepto que la retención por intercambiadores de tipo base débil, se realiza a pH relativamente bajo y frecuentemente se usa una base, en lugar de un ácido para la elusión.

a) Esteroides: Los métodos de intercambio iónico, pueden usarse para la separación de esteroides conjugados, presentes en la orina. Se ha establecido que la fijación de andró-

genos conjugados, por intercambiadores aniónicos de tipo base débil, es prácticamente cuantitativa⁽⁶⁴⁾. Cuando se usó "De Acidite B" como intercambiador, la concentración de los conjugados, aumentó al triple en el eluido.

b) Acido Ascórbico: AsH_2 , está disociado como un anión. Se fijó de la orina de rata, con la resina de intercambio aniónico, de tipo base débil "Amberlite IR-4B"⁽⁶⁵⁾ y se eluyó como ácido libre con clorhidrico N. La recuperación de ácido es de 85-90%.

La pérdida (10-15%) es en parte causada, por la eliminación previa con acetato de plomo, de sales interferentes (especialmente oxalato agregado como conservador).

c) Acido Quinolínico: El ácido quinolínico fué aislado de la orina de ratas, mantenidas a una dieta baja en ácido nicotínico y alta en triptófano. Se usó alúmina, de la cual fué eluido con Amoníaco⁽⁶⁶⁾, luego se agregó "Amberlite IR-100-H" para bajar el pH y el ácido libre fué cristalizado en el filtrado.

d) Acidos carboxílicos: Las resinas de tipo base fuerte "Dowex" 1 y 2, al estado de formiato, fijan los aniones de los acidos del grupo del ácido cítrico. De este modo el succinato, así como el malonate inyectados, fueron separados de la orina de ratas y luego eluidos diferencialmente, con concentraciones crecientes de ácido fórmico⁽⁶⁷⁾.

Por un proceso diferente, todos los ácidos orgánicos de la orina, con la aparente excepción de parte del ácido acotínico, fueron eluidos juntos, mediante ácido fórmico 6 N.

El eluido contenía también sulfato y fosfato. Luego de apropiada concentración del eluido, se identificaron once ácidos, por cromatografía sobre papel⁽⁶⁸⁾.

e) Perfobilinógeno: Los intercambiadores aniónicos de tipo base fuerte, han sido usados también para la separación de componentes urinarios, en conjunción con otros métodos; por ejemplo, "Dowex 2" para la separación de perfobilinógeno de una orina patológica, luego de la precipitación con acetato de mercurio⁽⁶⁹⁾. Después de la elusión con acetato de amonio 0,1 M y luego de una segunda precipitación con acetato de mercurio tratamiento con alúmina de lavado ácido y elusión con amoníaco 0,1 M restaría el perfobilinógeno, contaminado solamente con amoníaco y acetato de amonio.

f) Purinas: Se utilizó la resina "Dowex" 1" en forma de fosfato, para la separación y purificación a pH4 de ácido 1-3-dimetilúrico; un producto del metabolismo de la teofilina de la orina. La elusión fue efectuada con clorhídrico 0,1M⁽⁷⁰⁾.

g) Aminoácidos y sus derivados: Generalmente la separación y determinación de aminoácidos en orina, se ha efectuado con intercambiadores catiónicos. Los intercambiadores aniónicos fueron aplicados en los siguientes casos: Se usó una resina de intercambio aniónico de tipo base débil, para la separación del ácido alfa-amino adipico⁽⁷¹⁾; una de tipo base fuerte para la separación del ácido imidazolacético^(72,73) y para la estimación de dos aminoácidos conjugados: ácido fenil acetil glutámico y ácido hipúrico⁽⁷⁴⁾.

II - Fraccionamiento completo de la orina.

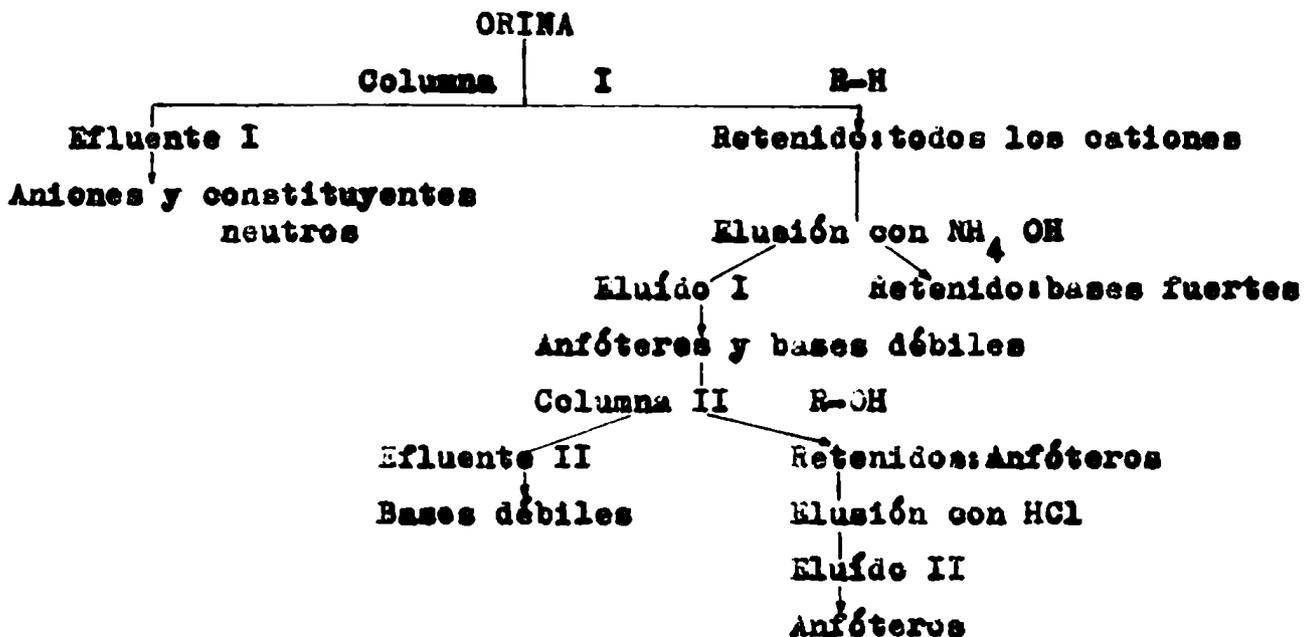
Este procedimiento, o sus etapas individuales, es adecuado para la separación, así como para el análisis cuantitativo, de cualquier componente ó grupo de componentes de la orina.

El uso de dos o mas intercambiadores diferentes, hace posible separar unos de otros, los cationes, aniones, anfóteros y los constituyentes no iónicos de la orina. El fraccionamiento requiere las siguientes etapas (ver gráfico 1)^(76,77)

Una muestra de orina de 24 horas se pasa primero a través de una columna (columna 1) de resina sulfónica "Amberlite IR-100", "Amberlite IR-120" ó "Duelite C-3" en su forma ácido libre (R-H). Esta columna, retiene todos los cationes inorgánicos y orgánicos, tales como creatinina y aún urea, incluyendo los anfóteros, tales como aminoácidos, creatina y pequeños péptidos. No es necesario un control de pH, puesto que los aminoácidos, en su forma dipolar, están fuertemente ligados por R-H⁽⁵⁶⁾ y además la orina que pasa por la columna, se volverá ácida, debido al intercambio de iones hidrógeno, de la resina, por cationes inorgánicos de la orina, así que aún las bases débiles, estarán presentes como cationes y serán retenidas. Las resinas, sin embargo, no retienen la taurina anfótera⁽⁴⁴⁾, porque su grupo sulfónico, es tan fuerte, que el compuesto no reacciona como un catión, para con la forma hidrógena, de una resina sulfónica. La taurina, en consecuencia, aparece en el efluente, junto con los aniones, presentes como ácidos libres, con las sustancias neutras y con los péptidos que no son retenidos (efluente I). 2°) Las bases dé-

biles y los anfóteros (con la posible excepción de arginina debido a su fuerte basicidad), son luego eluidos con amoníaco 2 M (eluido I). 3°) Después de concentrar al vacío el eluido I, se pasa a través de una columna de resina de intercambio aniónico, de tipo base fuerte, en su forma base libre (R-OH). Esta columna retiene los anfóteros y rechaza las bases débiles, incluyendo úrea y parte de la creatinina (efluente II). 4°) La fracción de anfóteros, es luego eluida con clorhídrico 1M (eluido II) y nuevamente concentrada al vacío.

GRAFICO I
Fraccionamiento de orina



La elusión de los anfóteros, de una u otra columna, tiene lugar, debido a un cambio en la carga neta de los compuestos anfóteros. La cantidad de resina de intercambio iónico, usada en la columna I, debe tener obviamente, una capaci-

dad mayor que el contenido en cationes, de la muestra de orina a analizar. Una cantidad mucho menor de resina, será suficiente en la columna II, ya que muchos de los aniones de la orina, han sido eliminados en la primera etapa.

En este proceso, los anfóteros son cuantitativamente recuperados. Son obtenidos en un pequeño volumen, debido a la concentración al vacío antes mencionada. Como los anfóteros y las bases débiles, son obtenidos en forma de sal libre, su análisis posterior por cromatografía sobre papel, así como por cromatografía de intercambio iónico, es tarea fácil. La identificación de cada componente en tales cromatogramas, presenta solo pequeñas dificultades. Solo la fracción de los anfóteros, ha sido analizada cuantitativamente⁽⁷⁷⁾ por cromatografía de intercambio iónico sobre "Dowex 50-H". La elusión se efectuó con concentraciones crecientes de HCl. La estimación de cada uno de los aminoácidos y péptidos, por el método colorimétrico con ninhidrina⁽⁷⁸⁾ y la identificación por cromatografía sobre papel, de las fracciones eluidas y por reacciones específicas.

Otros dos grupos de investigadores, uno en Francia⁽⁷⁹⁻⁸⁰⁾ y otro en Inglaterra⁽⁸¹⁾, han ideado procedimientos similares, pero sin intentar análisis cuantitativos. El primero fraccionó, además, el efluente I, usando un intercambiador aniónico de tipo base débil. Este retiene péptidos ácidos y ácidos orgánicos, tales como ácido pantoténico, mientras que las sustancias neutras (varias pentosas y hexosas), taurina y péptidos no ácidos, aparecen en el efluente. Una

elusión diferencial, con concentraciones crecientes de ácido acético y acetato de amonio, permite la separación en fracciones, conteniendo péptidos de acidez creciente.

El grupo inglés⁽⁸¹⁾ aplicó fraccionamientos con columnas de intercambio iónico a la orina de gato, logrando aislar varios aminoácidos raros; ácido B-aminoisobutírico⁽⁸²⁾, metilhistidina⁽⁸³⁾ y felinina⁽⁸⁴⁾. La separación del ácido B-aminoisobutírico fué también efectuada por un método similar por Fink y colaboradores⁽⁸⁵⁾.

Resumen: Los procesos de intercambio iónico, son particularmente aptos, para el análisis de mezclas complejas, tales como la orina.

Con ayuda de los intercambiadores citados se han separado, y también identificado diversas sustancias en la orina.

Grupos de sustancias afines, así separadas, fueron examinadas por cromatografía sobre papel, demostrándose de esta forma, la presencia en la orina, de sus integrantes.

Estos grupos incluyen ácidos carboxílicos, aminas, purinas y azúcares y sus derivados. Ningún intento sistemático, se ha realizado todavía, para la estimación cuantitativa, de los constituyentes de estos grupos, por medio de cromatografía de intercambio iónico.

En cuanto a los péptidos y conjugados, se han realizado muy pocas investigaciones.

Bibliografía:

- (1) - RUSSEL, E.R., LESKO, R.C. y SCHUBERT, J., *Nucleonios*, 7, 60:1, 1950.
- (2) - SCHUBERT, J., *Anal. Chem.*, 1359:22, 1950.
- (3) - SCHUBERT, J., RUSSEL, E.R. y FARABEE, L.B., *Science*, 316:109, 1949.
- (4) - TOMPKINS, P.C., FARABEE, L.B. y KHYM, J.X., *U.A. Atomic. Energ. y Comm. AEC* 2692, 1949.
- (5) - VANATTA, J.C. y COX, C.C., *J. Biol. Chem.*, 599:212, 1955.
- (6) - YOSHINO, Y., *J. Chem. Soc. Japan, Pure Chem. Sect.*, 457:72, 1951.
- (7) - YOSHINO, Y., *Science, Papers Coll. Gen. Educ. Univ. Tokyo*, 41:2, 1, 1952.
- (8) - FOLIN, O., BELL, R.D., *J. Biol. Chem.*, 329:29, 1917.
- (9) - FOLIN, O. y YOUNGBURG, G.E., *J. Biol. Chem.*, 111:38, 1919.
- (10) - POHORECKA-LELESZ, B., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 178:8, 1926.
- (11) - YOUNGBURG, G.E., *J. Biol. Chem.*, 391:45, 1921.
- (12) - FOLIN, O., *J. Biol. Chem.*, 393:51, 1922.
- (13) - WHITEHORN, J.C., *J. Biol. Chem.*, 751:56, 1923.
- (14) - YEN, P.C., *J. Chinese Chem. Soc.*, 19:12, 1945.
- (15) - WINTERS, J.C. y KUNIN, R., *Ind. Eng. Chem.*, 460:41, 1949.
- (16) - DUBNOFF, J.W. y BORSOOK, H., *J. Biol. Chem.*, 331:138, 1941.
- (17) - DUBNOFF, J.W., *J. Biol. Chem.*, 711:141, 1941.
- (18) - ALBANESE, A.A. y BRANKSTON, J.E., *J. Biol. Chem.*, 185:159, 1945.
- (19) - SIMS, E.A.W., *J. Biol. Chem.*, 239:158, 1945.
- (20) - HARRIS, L.J. y LEONG, P.C., *Lancet*, 886:230, 1936.
- (21) - WIDENBAUER, F., HUHN, O. y BECKER, G., *Z. Ges. Exptl. Med.*, 170:101, 1937.

- (22) - HOCHBERG, M. y MELNICK, D., J. Biol. Chem., 53:156, 1944.
- (23) - EGANA, E. y MEIKLEJOHN, A. P. J. Biol. Chem., 859:141, 1941.
- (24) - HENNESSY, D. J., Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 216:11, 1941.
- (25) - HENNESSY, D. J. y CLRECELO, L. R., J. Am. Chem. Soc. 179:61, 1939.
- (26) - JOHNSON, R. E., SARGENT, F., ROBINSON, P. F. y CONSOLAZIO, F. C., Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 384:17, 1945.
- (27) - MASON, H. L. y WILLIAMS, R. D., J. Biol. Chem., 589:146, 1942.
- (28) - MAWSON, E. H. y THOMPSON, S. Y., Biochem. J. (London), 2:41, 1948.
- (29) - MICKELSEN, O., CONDIEFF, A. y KEYS, A., J. Biol. Chem. 361:160, 1945.
- (30) - NAJJAR, V. A. y KETRON, K. C., J. Biol. Chem., 579:152, 1944.
- (31) - NOSE, Y. y TASHIRO, T., J. Japan. Biochem. Soc., 130:21, 1949. por Chem. Abstracts, 1190:45, 1951.
- (32) - PAPAGEORGE, E. y LAMAR, M. V., Arch. Biochem., 315:14, 1947.
- (33) - URBAN, F. y GOLDMAN, M. L., J. Biol. Chem., 329:152, 1944.
- (34) - NAJJAR, V. A., Bull. Johns Hopkins Hosp., 392:74, 1944.
- (35) - NAJJAR, V. A. y HOLT, L. E., Science, 20:91, 1941. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 413:48, 1941.
- (36) - NAJJAR, V. A. y WOOD, R. W., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 386:44, 1940.
- (37) - COULSON, R. A. y ELLINGER, P., Biochem. J. (London), 37:17, 1943.
- (38) - ELLINGER, P. y COULSON, R. A., Nature, 383:152, 1943.
- (39) - HUFF, J. W. y PERLZWEIG, W. A., Science, 538:97, 1943.
- (40) - HUFF, J. W. y PERLZWEIG, W. A., J. Biol. Chem., 395:150, 1943.
- (41) - COULSON, R. A., ELLINGER, P. y HOLDEN, M., Biochem. J., (London), 150:38, 1944.

- (42) - HOCHBERG, M., MELNICK, D. y OSER, B. L., J. Biol. Chem., 265: 158, 1945.
- (43) - HOLMAN, W. I. M., Biochem. J. (London), 513: 56, 1954.
- (44) - CROKAERT, R. MOORE, S. y BIGWOOD, E. J., Bull. Soc. Chim. Biol., 1209: 33, 1951.
- (45) - v. EULER, U. S. y HELLNER, S., Acta Physiol. Scand., 161: 22, 1951.
- (46) - HOLTZ, P., CRADNER, K. y KOEPP, W., Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol., 356: 200, 1942.
- (47) - RICHTER, D., J. Physiol. (London), 361: 98, 1940.
- (48) - ROBERTS, H. y ADAM, H. M., Brit. J. Pharmacol., 526: 5, 1950.
- (49) - DENT, C. E., FOWLER, D. L. y WALSH, J. M., Biochem. J. (London), 48: 13, 1951.
- (50) - FISHMAN, W. H. y ARTOM, C., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 288: 60, 1945.
- (51) - LUCK, J. M. y WILCOX, A., J. Biol. Chem., 859: 205, 1953.
- (52) - STEIN, W. H., J. Biol. Chem., 45: 201, 1953.
- (53) - TALLAN, H. H., MOORE, S. y STEIN, W. H., J. Biol. Chem., 927: 211, 1954.
- (54) - TALLAN, H. H., STEIN, W. H. y MOORE, S., J. Biol. Chem., 825: 206, 1954.
- (55) - SILVERMAN, M., GARDINER, R. C. y BAKERMAN, H. A., J. Biol. Chem., 815: 194, 1952.
- (56) - CARSTEN, M. E. y CANNAN, R. X., J. Am. Chem. Soc., 5950: 74, 1952.
- (57) - LEJWA, A., Biochem. Z., 236: 256, 1932.

- (58) - KATZMAN, P.A., GODFRID, M., GAIN, C.K. y DOISY, E.A.
J. Biol. Chem., 501: 148, 1943.
- (59) - GURIN, S. BACHMAN, C. y WILSON, D.W., J. Biol. Chem.,
477: 133, 1940.
- (60) - MILTON, R.F., Brit. Med. J., 328: II, 1946.
- (61) - MALBURG, R.F. y GOODMAN, J.R., J. Clin. Endocrinol. and
Metabolism., 666: 14, 1954.
- (62) - SALTZMAN, A., Lab. Clin. Med., 123: 35, 1950.
- (63) - OBERST, F.W., J. Lab. Clin. Med., 318: 24, 1938.
- (64) - ANDERSON, A.J. y WARREN, F.L., J. Endocrinol., 7: LXV, 1951.
- (65) - JACKLL, S.S., MOSBACH, E.H. y KING, C.G., Arch. Biochem. and
Biophys., 442: 31, 1951.
- (66) - HENDERSON, L.M. y HIRSCH, H.M., J. Biol. Chem., 667: 181, 1949.
- (67) - BUSCH, H. y POTTER, V.R., J. Biol. Chem., 71: 198, 1952.
- (68) - NORDMANN, R., GAUCHERY, O., DU RUISSEAU, J.P., THOMAS, Y.
y NORDMANN, J., Compt. Rend., 2459: 238, 1954.
- (69) - WESTALL, R.G., Nature, 614: 170, 1952.
- (70) - BRODIE, B.B., AXELROD, J. y REICHTHAL, J., J. Biol. Chem.,
215: 194, 1952.
- (71) - BOUJANGLER, P. y BISERTE, G., Compt. Rend., 1451: 232, 1951.
- (72) - MEHLER, A.H., TABOR, H. y BAUER, H., J. Biol. Chem.,
475: 197, 1952.
- (73) - TABOR, H., MEHLER, A.H. y SCHAYER, R.W., J. Biol. Chem.,
605: 200, 1953.
- (74) - STEIN, W.H., PALADINI, A.C., HIRS, C.H.W. y MOORE, S.,
J. Am. Chem. Soc., 2848: 76, 1954.
- (75) - CARSTEN, M.E., Federation Proc., 170: 10, 1951.
- (76) - CARSTEN, M.E., J. Am. Chem. Soc., 5954: 74, 1952.

- (77) - TROLL, W. y CANNAN, R.K., J.Biol.Chem., 803:200, 1953.
- (78) - BOULANGER, P. y BISEPTE, G., J.Med.Lyon, 55:35, 1954.
- (79) - BOULANGER, P., BISEPTE, G. y COURTOT, F., Bull.Soc.Chim. Biol., 366:34, 1952.
- (80) - WESTALL, R.G., Biochem.J. (London), 638:52, 1952.
- (81) - CRUMPLER, H.R., DENT, C.E., HARRIS, H. y WESTALL, R.G., Nature, 307:167,
- (82) - SEARLE, J.M. y WESTALL, R.G., Biochem.J. (London), 1:48, 1951
- (83) - WESTALL, R.G., Biochem.J. (London), 244:55, 1953.
- (84) - FINK, K., HENDERSON, R.P. y FINK, R.M., Proc. Soc. Exptl. Biol.Med., 135:78, 1951.

BASES TOTALES EN LIQUIDOS BIOLÓGICOS

Haremos un breve resumen de los diferentes métodos empleados, para la determinación de bases totales en líquidos biológicos.

En el año 1922, Piase⁽¹⁾, dió a conocer un método, para la determinación de bases totales en orina, que reemplazó los métodos anteriores, basados en la suma de las determinaciones parciales de los diferentes cationes.

En el método de Piase, la orina se calienta con ácido sulfúrico y nítrico, hasta humos blancos, para eliminarla materia orgánica; luego se neutraliza con carbonato de amonio en polvo y rojo de metilo como indicador; se trata con cloruro férrico, para eliminar los fosfatos y con acetato de amonio para eliminar el exceso de hierro, como acetato básico. El filtrado de estas operaciones contiene las bases, (que son finalmente obtenidas como sulfatos) libres de sustancias interferentes, se lleva a seco con ácido sulfúrico y luego con carbonato de amonio. En el residuo final se determinan sulfatos por el método de la bencidina y la cantidad total de base 0,1N presente, es calculada por el resultado de este análisis.

En la eliminación de fosfatos é iones férricos, en exceso, es necesario realizar una neutralización perfecta, para evitar que cantidades apreciables de fosfatos alcalinos térreos, coprecipiten con el precipitado de hierro.

Además, es recomendable efectuar una determinación de fosfatos, para conocer la cantidad de acetato férrico, a

utilizar en su eliminación. Puede también agregarse acetato férrico, hasta que no se observe más precipitación, pero un gran exceso de acetato básico, dificultará la posterior filtración, haciéndola muy lenta.

Van Slyke, Wu y Mo Lean⁽²⁾, aplicaron el principio del método de Fiske, a la determinación de bases totales en sangre, previa eliminación de las proteínas con ácido tricloroacético. Se determinaban los sulfatos como sulfato de bario.

Posteriormente, Stadie y Ross⁽³⁾, perfeccionaron un micro método, basado en el método de Fiske, para la determinación de bases totales en sangre, suero, orina y otros materiales biológicos.

Al igual que en el método anterior, las bases son convertidas en sulfatos por ignición con ácido sulfúrico y los sulfatos son precipitados con clorhidrato de bencidina. Se diferencia del método de Fiske, (en el cual el precipitado es directamente titulado con álcali) en que los sulfatos de las bases presentes, son determinados por titulación de una parte alícuota del filtrado, del sulfato de bencidina. De este valor y el título del reactivo, clorhidrato de bencidina, se calcula la concentración de bases.

Las reacciones son las siguientes:



Este método tiene algunas ventajas con respecto al anterior de Fiske, dado que mediante la titulación indirecta,

se evitan ciertas operaciones, por ej., se elimina la transferencia cuantitativa de un pequeño precipitado, el lavado de este precipitado con acetona (error por solubilidad). Se evita además, la titulación en caliente, del precipitado de sulfato de bencidina.

En 1927 Van Slyke, Hiller y Berthelsen⁽⁴⁾, aplicaron un micro método gasométrico, para la determinación de iodatos y sulfatos, a la valoración de bases totales en suero sanguíneo. Este método puede también aplicarse a orina y otros líquidos biológicos.

En este método, las bases son transformadas en sulfatos, según el procedimiento de Stadie y Ross. Luego los sulfatos alcalinos, son agitados con un exceso de iodato de bario en polvo; esta es una sal insoluble, pero el sulfato de bario lo es más y tiene lugar una doble descomposición. El iodato se solubiliza y el sulfato es precipitado:



La mezola pasa luego a través de un filtro seco y una parte alícuota del filtrado es colocada dentro del aparato manométrico de gases (5,6) en el cual se ha colocado un exceso de sal alcalina de hidrazina. Tiene lugar una reacción instantánea y cuantitativa:



Si la reacción a) se desplazara completamente de izquierda a derecha como lo hace la b), 1 mol de sulfato daría 3 moles de nitrógeno y un equivalente combinado de sulfato

1,5 moles de nitrógeno. Luego el contenido en sulfato puede ser calculado por el nitrógeno desprendido.

Equivalentes de sulfato = $\frac{\text{moles nitrógeno}}{1,5} = 0,667 \times$
moles nitrógeno.

Pero la reacción a) no se desplaza completamente de izquierda a derecha. La diferencia en solubilidad entre el sulfato de bario y el iodato de bario no es suficientemente grande para permitir la completa reacción. Se alcanza el equilibrio cuando hay aún una parte apreciable de sulfato en solución no reemplazada por iodato. La relación real está dada por la siguiente ecuación empírica (con un factor relativamente grande para nitrógeno y un término aditivo).

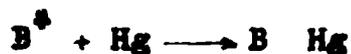
$\text{Meq SO}_4 \text{ por litro} = 0,724 \times \text{milimoles de nitrógeno dados por litro} + 1,123.$

El equilibrio se alcanza en una hora.

Los autores determinaron las bases totales en 0,16 cc. de suero, con un error promedio de 0,8% de la cantidad determinada.

La aplicación de la electrodiálisis a la determinación de bases totales, en líquidos biológicos, se debe a Keys (1936)⁽⁷⁾. La característica principal del método, es que los cationes, son electrodiálizados de la solución en análisis, a través de una membrana de colodio ó celofán, a mercurio cargado negativamente, sobre el cual hay una cantidad conocida de ácido valorado. Cuando la diálisis se ha completado (no más desprendimiento de burbujas de H₂), el circuito se

abre, la amalgama de Hg y base es descompuesta por agitación con el ácido y el exceso de ácido, es titulado, sin retirarlo del vaso en que está contenido.



En este método se determinan, no sólo las bases fijas, sino también el NH_4^+ y por esto no es estrictamente comparable a los métodos de Piske (1922), Stadie y Bass (1925), Van Slyke y colaboradores (1927) y otros ya citados, que han prescindido de iones NH_4 . En sangre fresca y en plasma, la concentración de iones NH_4 , es sólo del orden de 0,1 a 0,2 meq. por litro. Luego las diferencias entre este método y los anteriores será pequeña. Pero en orina, las diferencias son mucho mayores y los métodos no pueden ser comparados directamente.

El método da resultados con una exactitud del 1% con muestras de 0,2 cc. de líquidos biológicos.

Sunderman⁽⁸⁾ propuso en 1942, la determinación de las bases totales en suero, por medida de la conductividad del mismo.

Los viejos métodos, basados en el análisis por separado de los principales cationes, son muy largos y debido a las numerosas manipulaciones, adolecen de errores por razones técnicas, muy difíciles de evitar. Además, estos errores, que se producen en las diferentes determinaciones parciales,

se suman en el dato final.

En los métodos en que los cationes se convierten en los correspondientes sulfatos y por subsiguiente determinación de estos, se obtiene el dato final, se pueden hacer consideraciones análogas al párrafo anterior. Así, a pesar de haberse disminuído considerablemente el tiempo, con respecto a los métodos anteriores, son aún demasiado largos y engorrosos, por lo que los datos son de dudosa seguridad. En estos métodos, es necesario una técnica operativa muy cuidadosa, para evitar errores en los distintos pasos de la determinación.

En el método de Van Slyke, Wu y Mc Lean, es necesario el uso del aparato manométrico de gases, el que por su costo, no es fácilmente accesible a todos los laboratorios de análisis. Además, para su utilización, es necesario que el operador esté perfectamente adiestrado en su manejo.

El método por electrodíalisis, introducido por Key's, ha hecho posible análisis de mayor seguridad, exactitud y rapidez, que por los métodos anteriores. Pero a pesar de esto, es aún algo complicado en cuanto a su técnica y a la construcción del aparato. Además, con respecto a este método dicen Polia y Reinhold⁽⁹⁾: "por nuestra experiencia, así como la de otros, la electrodíalisis no siempre dá un dato seguro de bases totales, a menos que se continúe por 12 a 18 horas, a densidades de corriente relativamente bajas".

En el método conductimétrico de Sunderman, es ne-

cesario el uso de un factor de conversión determinado estadísticamente, por el cual las desviaciones individuales en algunos casos, pueden causar un error significativo.

Con la aplicación de resinas de intercambio iónico a esta determinación, se ha logrado una apreciable reducción en el tiempo empleado, así como también se han eliminado los errores de los otros métodos citados, obteniéndose por consiguiente, datos más reproducibles, rápidos y seguros.

Los primeros en proponer una técnica, basada en reacciones de intercambio iónico, para esta determinación, fueron Polis y Reinhold⁽⁹⁾. El método consiste en el intercambio de iones hidrógeno, por cationes presentes en la muestra, mediante la resina sintética "Amberlite IR-100" y en la siguiente titulación de los aniones eluidos, con una base tipo. Las bases presentes como CO_3H^- , son determinadas separadamente, por medida gasométrica del CO_2 combinado.

Un método similar ha sido propuesto por Gorter y Van Royen⁽¹⁰⁾. Se diferencia del anterior, en que el afluente es recogido directamente en un frasco que contiene HONa 0,1N en exceso, luego se lava la columna con agua destilada, libre de CO_2 y el exceso de álcali, se titula con ácido en presencia de azul de Bromotimol. Según los autores, para propósitos prácticos, no son necesarias correcciones por diferencia de pH, entre el punto final de la titulación y el original del suero.

Un intercambiador de tipo base fuerte, puede

emplearse para la determinación de las bases totales, contenidas en la orina, así como en otros humores humanos, líquido intraocular y líquido cefalorraquídeo.

La "Amberlite IRA-400" como base libre, o preferiblemente como borato, debido a su gran estabilidad, retiene todos los aniones de la orina.

Los cationes se obtienen en el efluente como bases libres, o como boratos respectivamente. De la cantidad de ácido usado, para titular el efluente, hasta el punto final, con Rojo de Metilo, se obtienen las bases totales⁽¹¹⁻¹²⁾.

Alimentos Acidificantes y Alcalizantes^(13,14);

Los alimentos acidificantes ó alcalizantes modifican la reacción de la orina. Ciertos alimentos tales como frutas y verduras, al quemarse fuera y dentro del organismo, dejan un residuo mineral o cenizas, en el cual predominan los elementos básicos -sodio, potasio, calcio y magnesio - . Los cereales, la carne, el pescado, dejan cenizas en las cuales predominan los elementos formadores de ácidos -cloro, fósforo y azufre- El azufre aunque está presente en la mayoría de los alimentos en forma neutra, se oxida y al dar ácido sulfúrico, se incluye entre los acidificantes.

Las frutas cítricas, contienen ácido cítrico y citrato de potasio, cuyos radicales citrato, son completamente oxidados en el cuerpo hasta ácido carbónico, dejando carbonato de potasio con reacción alcalina. Por lo tanto, mu-

chas frutas ácidas, son formadoras de bases en el organismo.

La uva disminuye la acidez de la orina en menor grado que la naranja, pues el ácido tartrico que contiene, no es completamente oxidado, eliminándose como tal en la orina. Otras frutas contienen ácido benzoico y quínico, que se oxidan débilmente en el cuerpo, siendo eliminados por la orina al estado de ácido hipúrico, el cual aumenta la acidez de la misma (15,16,17,18).

Puede entonces modificarse la reacción de la orina de ácida en alcalina, cambiando por ejemplo el pH de la misma de 5,5 a 7,5 ya sea por la ingestión de ciertas sustancias -(el $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$, baja el pH, en tanto que el CO_3HNa ó CH_3COONa , lo aumentan)- ó por un régimen alimenticio adecuado (19,20,21).

Las modificaciones de la acidez o de la alcalinidad excesivas de la orina, tiene importancia para evitar la formación de ciertos cálculos (de ácido úrico en unos casos y de fosfatos en otros). Por ello se requiere un balance apropiado ácido-básico en los alimentos.

El organismo tiende a una regulación automática, mediante la producción de amoníaco, que neutraliza el exceso de acidez. También puede lograrse ese efecto por otros medios.

Con excepción de los alimentos conteniendo ácidos orgánicos incompletamente oxidados, los valores acidifi-

cantes ó alcalizantes de los alimentos, pueden ser calculados, obteniendo las diferencias, entre los equivalentes de ácido normal, calculados del contenido en azufre, fósforo (en ácido fosfórico considerado divalente) y cloro y los de álcali normal, calculados del contenido en sodio, potasio, calcio y magnesio^(22,23).

Cantidad en exceso de elementos formadores de ácidos o bases expresados en c.c. de soluciones normales por 100 gramos de sustancia:^(13,14)

	<u>Acidos(c.c.)</u>	<u>Bases (c.c.)</u>
Manzana	—	3,76
Espárrago	—	0,81
Banana	—	5,56
Perote seco	—	23,87
Haba	—	41,65
Remolacha	—	10,86
Col	—	4,34
Melón	—	7,47
Zanahoria	—	20,81
Coliflor	—	5,33
Apio	—	7,78
Huevo	11,10	—
Clara de huevo	5,24	—
Yema de huevo	26,69	—
Pescado(merluza)	16,07	—
Limón	—	5,54
Lechuga	—	7,37

Carne vacuna(magra)	13,91	—
Leche de vaca	—	2,37
Harina de avena	12,93	—
Naranja	—	5,61
Ciruclas	—	24,4
Pasas de uvas	—	23,68
Trigo (entero)	9,66	—
Papa	—	7,19
Arroz	8,10	—
Pan blanco	6,0	—
Galletitas	7,81	—

Las cifras que se indican para estos alimentos varían notablemente según los distintos suelos y climas. A simple título informativo, insertamos a continuación un cuadro de Clark⁽²⁴⁾, sobre los constituyentes minerales de algunos alimentos.-

	Ca	Mg	Na	K	Cl	P.	S.	N.
Pan blanco	14	12	447	103	582	86	95	1.429
" de Graham	29	37	321	151	628	135	102	1.245
Arroz	4	11	40	95	38	94	65	976
Leche de vaca (por 100 ml.)	115	11	65	138	102	95	31	486
Queso mantecoso	543	49	550	170	917	490	168	3.976
Roast beef	18	19	554	207	839	157	195	3.489
Huevos	43	11	12	123	155	190	158	7.767
Patatas	4	22	13	282	44	45	26	319
Tomates	5	12	107	232	188	19	24	166
Pasas de uvas	47	41	30	530	48	101	42	374

Los datos están expresados en mg. por 100 grs. de sustancia y hay que tener en cuenta igual que en el cuadro anterior que las cifras varían según suelos y climas

Bibliografía:

- (1) - FISKE G., J. Biol. Chem., 51: 55, 1922.
- (2) - VAN SLYKE, D. D., WU, H. y MC LEAN, F. C., J. Biol. Chem., 56: 763, 1923.
- (3) - STADIE, W. C. y ROSS, E. C., J. Biol. Chem., 65: 735, 1925.
- (4) - VAN SLYKE, D. D., HILLER, A. y BERTHELSEN, K. C., J. Biol. Chem., 74: 659, 1927.
- (5) - VAN SLYKE, D. D. y NEILL, J. M., J. Biol. Chem., 61: 527, 1924.
- (6) - VAN SLYKE, D. D. y NEILL, J. M., J. Biol. Chem., 73: 121, 1927.
- (7) - KEYS, A., J. Biol. Chem., 114: 449, 1936.
- (8) - SUNDERMAN, F. W., J. Biol. Chem., 143: 185, 1942.
- (9) - POLIS, B. D. y REINHOLD, G. J., J. Biol. Chem., 156: 231, 1944.
- (10) - GORTER, R. y VAN ROYEN, A., Koninkl. Nederland. Akad. Wetenschap. Proc., 824: 51, 1948.
- (11) - BONTING, S. L., "Improved Total-Base Determination in Serums, Urine and Tissue Ash", J. Lab. Clin. Med., 968: 41, 1953.
- (12) - SULLMANN H., Klin. Wochschr., 185: 30, 1952.
- (13) - HAWK, P. y BERGEIN, O., Practical Physiological Chemistry ed. Blakiston's Son and Co., 1937, 11a. edic.
- (14) - TRELLES, R. A., Manual para el médico en sus relaciones con el Laboratorio Químico de Análisis Clínicos. Ed. Tomás Palumbo, Bs. As., 1946, pag. 44.

- (15) - BLATHERWICH, N.R., Arch.Int.Med., 409, 14, 1914.
- (16) - BLATHERWICH, N.R. y LONG, M.L., J.Biol.Chem., 815: 57, 1923.
- (17) - BLATHERWICH, N.R. y LONG, M.L., J.Biol.Chem., 103: 53, 1922.
- (18) - QUICK, A.J., J.Biol.Chem., 65: 92, 1931.
- (19) - HENDERSON, L.J. y PALMER, W.W., J.Biol.Chem., 393: 13, 1913.
- (20) - HENDERSON, L.J. y PALMER, W.W., J.Biol.Chem., 81: 14, 1913.
- (21) - HENDERSON, L.J. y PALMER, W.W., J.Biol.Chem., 555: 17, 1917.
- (22) - SHERMAN, A.C. y GETTLER, A.O., J.Biol.Chem., 323: 11, 1912.
- (23) - SHERMAN, A.G. y GETTLER, A.O., J.Biol.Chem., 597: 65, 1915.
- (24) - CLARK, A.L., "Acid and Base forming elements in food",
J.Biol.Chem., 597: 64, 1915.-

PART B EXPERIMENTAL

DETERMINACION DE BASES TOTALES EN ORINA

En 1952, Sullmann⁽¹⁾ propuso un micrométodo basado en la utilización de resinas de intercambio aniónico fuertemente básicas.

Este método tiene ventajas sobre el de Polis y Reinhold⁽²⁾, puesto que no es necesario dosar las bases presentes como CO_3H^- por separado. Es decir, se determinan las bases totales en una sola operación.

Se utiliza la resina "Amberlite IRA-400" como base libre ó preferentemente como borato (por su gran estabilidad), la cual debido a su alto poder de intercambio, retiene todos los aniones presentes: $\text{R} - \text{OH} + \text{B} - \text{X} = \text{R} - \text{X} + \text{B} - \text{OH}$.

Los cationes salen en el efluente al estado de bases libres, ó como boratos, respectivamente. La cantidad de ácido SO_4H_2 usado para titular este efluente hasta virar el rojo de metilo, nos permitirá calcular las bases totales presentes.

La primera fase del proceso consiste, en el intercambio de los cationes presentes en la orina, por iones hidrógeno o borato, mediante el uso de una resina de intercambio aniónico, fuertemente básica.

La resina utilizada es "Amberlite IRA-400", que se obtiene en el comercio al estado de cloruro. Se presenta en forma de gránulos pequeños, resistentes a la fricción, completamente "hinchados" y húmedos.

Tipo: Intercambiador aniónico fuertemente básico. Se

obtiene por aminación con trimetilamina del copolímero estire-nodivinilbenceno clorometilado (patente USA N° 2.591.573).

Tamaño de las partículas: 20 - 60 mallas (0,85-0,29 mm.Ø).

"Hinchamiento": Al convertir la resina de su forma Cl^- a HO^- se "hincha" aproximadamente un 20%.

Espacio inerte: 40-45%.

Densidad de la malla(enlaces cruzados): 3-5% de divi-nilbenceno.

Densidad (promedio): 0,65 gramos por ml. (lavada y es-currida).

Capacidad de intercambio total: 3,0 milieq. por gramo (seco) mínimo; 1,0 milieq. por ml. mínimo.

Estabilidad química: Esencialmente insoluble y quími-camente inerte en ácidos fuertes, álcalis concentrados, hi-drocarburos alifáticos y aromáticos, alcoholes, éteres y o-tros solventes comunes. En medios moderadamente oxidantes o re-ductores, la "Amberlite IRA-400" es una de las resinas (del ti-po de amina cuaternaria) más estable, sin embargo es sensi-ble a altas concentraciones de oxidantes químicos. Cuando se guarda en su forma HO^- , por largo tiempo, pueden formarse a-minas libres en la resina. Estas aminas se eliminan solamen-te por un lavado pronunciado. También puede absorber CO_2 , si se la almacena en su forma OH^- .

Estabilidad a altas temperaturas: En su forma HO^- es

Para formar el lecho de resina se procede en la siguiente forma: se afirma la bureta y su tubo de salida a un pié con dos pinzas, de forma tal, que el tubo de salida, supere en 5 cms. la altura a la cual llegará el lecho de resina. Luego se llena la bureta de agua (el exceso desborda por el tubo de salida), se coloca un embudo en la bureta, dentro del cual finalmente se coloca la resina, tal cual se obtiene en el comercio, es decir, en forma de Cl^P . Se hace correr agua, que irá arrastrando la resina al interior de la bureta, hasta formar el lecho de la altura deseada.

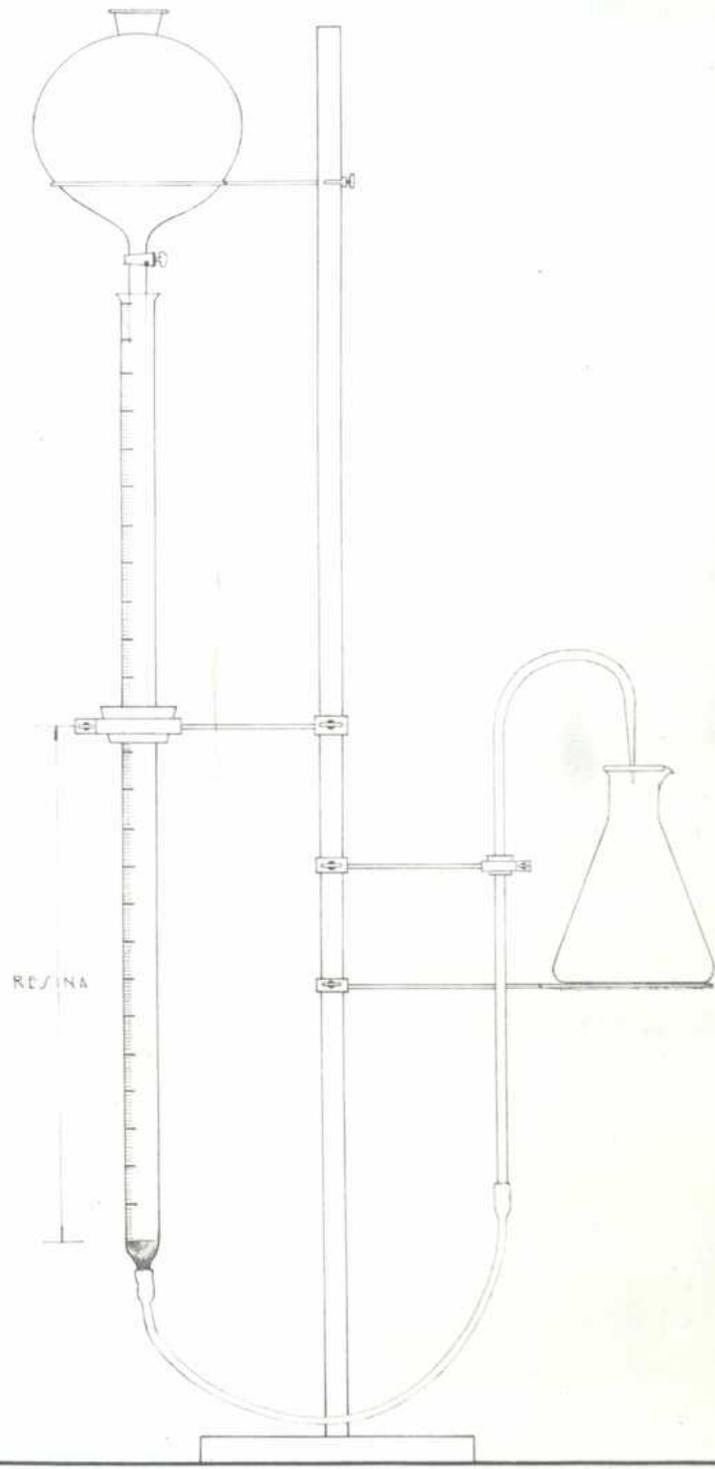
De esta manera se procederá rápidamente, evitando que se formen burbujas de aire en el interior del lecho, que producirían canalizaciones y reducirían la eficiencia de la columna.

En caso de observarse burbujas en el interior del lecho debe procederse a vaciar la columna y armarla de nuevo. Para evitar la entrada de aire durante las determinaciones se mantendrá siempre el tubo de salida sobre el nivel superior del lecho de resina.

En cuanto a las dimensiones de la columna, se han seguido las indicaciones de Samuelson⁽³⁾:

Diámetro de la bureta:	9,5 mm.
Altura del lecho:	188,0 "
Volumen de resina:	13,7 cc.
Superf. del corte transversal:	0,72 cm ² .
Diámetro de las partículas: entre mallas 30 y 50.	

La resina tal cual se adquiere en el comercio, contiene partículas de diámetro variable entre 20-50 mallas (0,85 a



0,29 mm). Se eliminan las mayores pasándola a través de un tamiz de malla 30 (0,5 mm. de ϕ).

El lecho de resina (como base libre), produce con el tiempo, notables cantidades de sustancias alcalinas solubles, las cuales se separan por medio de agua destilada, inmediatamente antes de realizar el análisis.

Es difícil llegar a resultados cuantitativos con la resina así preparada (base libre). En el recorrido de soluciones de sales que contienen en un litro, 10 a 20 meq. de Ca^{++} ó Mg^{++} se recogerán demasiado pocas equivalencias básicas. El déficit determinado en varios ensayos del intercambiador no es constante. Aún con soluciones de cloruro de sodio se obtendrán valores no satisfactorios, con punto final no siempre nítido en la titulación. Debe considerarse la solubilidad limitada de los hidróxidos alcalinos terrosos, además del contenido de carbonatos generalmente elevado, independientemente de la conservación de la resina.

Las mencionadas dificultades, pueden eliminarse tratando la resina al estado de base libre, con ácido bórico al 4%. El ácido bórico en exceso se lava.

Una vez dispuesta la columna se procederá a ponerla en "régimen" mediante sucesivos ciclos de agotamiento y regeneración.

En la columna, la resina se encuentra al estado de cloruro; luego la trataremos con hidróxido de sodio. N, hasta

transformar todos sus grupos activos al estado de hidróxido. Seguidamente lavaremos el exceso de hidróxido de sodio con agua destilada y volveremos la resina a su estado primitivo de cloruro, tratándola con una solución de ácido clorhídrico N, lavando posteriormente con agua destilada.

Los ciclos efectuados fueron los siguientes:

- a) Agotamiento con hidróxido de sodio N : 50 cc.
- b) Lavado con agua destilada: hasta reacción negativa a la fenolftaleína y reacción de cloruros negativa: 150 cc.
- e) Regeneración con ClH N : 50 cc.
- d) Lavado con agua destilada: hasta reacción negativa de cloruros y pH 7 con indicador de Yamada: 250 cc.

El presente ciclo se repitió cinco veces a una velocidad de pasaje fija de 9 ml. por cm². y por minuto.

Como se observará, se pasó un gran exceso de hidróxido de sodio y ácido clorhídrico, con respecto a la capacidad del lecho de resina que es de 13.7 meq. Se trata de esta forma, de transformar todos los grupos activos, en grupos HO⁻ ó Cl⁻, según el caso.

En el ciclo descripto fué muy difícil de lavar el exceso de ácido clorhídrico. Se obtuvo reacción positiva de cloruro y acidez aún después de lavar con 250 cc. de agua destilada y fueron necesarios hasta 400 cc. para lograr un lavado perfecto. Esto puede obedecer a una posible adsorción física del exceso de ClH sobre las partículas de resina.

Para evitar este inconveniente se usó como regenerante cloruro de sodio al 5%, efectuándose otros cinco ciclos, a diferentes velocidades, entre 5 y 10 ml./cm². minuto, no observándose diferencias, en cuanto a la perfección de los lavados.

- a) Agotamiento con HONa N : 50 cc.
- b) Lavado con H₂O destilada: hasta reacción negativa de cloruros y reacción negativa a la fenolftaleína: 150 cc.
- c) Regeneración con cloruro de sodio 5% : 60 cc.
- d) Lavado con H₂O destilada: hasta reacción negativa de cloruros y reacción negativa a la fenolftaleína: 150 cc.

Luego de poner en régimen la columna se procedió a transformarla al estado de borato, para lo cual se utilizó una solución de borato de sodio al 4%.

- a) Resina como cloruro.
- b) Agotamiento con HONa N : 50 cc.
- c) Lavado con H₂O destilada: hasta reacción negativa de cloruros y reacción negativa a la fenolftaleína: 150 cc.
- d) Regeneración con solución de borato de sodio al 4%: 70 cc.
- e) Lavado con H₂O destilada: hasta reacción negativa de boratos con papel de cúrcuma: 150 cc.

En las sucesivas regeneraciones efectuadas en el presente trabajo, se efectuó siempre la transformación de la resina al estado de HO⁻, previa a la transformación a BO₃⁻, para una mayor seguridad en la transformación de todos los gru-

pos activos al estado BO_3^{III} .

También aquí se efectuaron cinco ciclos variando la velocidad de pasaje entre 5-10 ml/cm². min., no observándose diferencia en la perfección del lavado.

Una vez que se tiene la columna en condiciones operativas se procede a la determinación propiamente dicha.

Se pasa una cantidad de orina en una dilución adecuada y se lava con agua destilada. Los líquidos de pasaje se recogen en un Erlenmeyer y se titulan con ácido sulfúrico 0,02M y rojo de metilo como indicador. Previamente se efectuará un ensayo en blanco, pasando a través de la columna una cantidad de agua destilada igual a la suma de la orina y líquido de lavados. El volumen gastado en este ensayo se resta del anterior.

La dilución de la orina es necesaria, para solubilizar el sedimento en su mayor parte. Este sedimento puede contener fosfatos, urates, etc., que como se comprende falsearían las determinaciones al no estar en solución.

Se realizaron determinaciones con una misma orina a diferentes diluciones. En todos los casos se pasaron 10 ml. de orina en la dilución correspondiente, lavando luego con 50 ml. de agua destilada. Los datos obtenidos son los siguientes:

Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3	
diluc.Bases Totales		diluc.Bases Totales		diluc.B.Totales	
1/20	264 meq/lt.	1/20	320 meq/lt.	1/20	288 meq/lt.
1/20	264 "	1/20	324 "	1/20	288 "
1/30	266 "	1/30	321 "	1/30	291 "
1/30	266 "	1/30	321 "	1/30	291 "
1/40	264 "	1/40	320 "	1/40	288 "
1/40	264 "	1/40	320 "	1/40	288 "
1/50	260 "	1/50	320 "	1/50	290 "
1/50	260 "	1/50	320 "	1/50	290 "

Como se observará los datos obtenidos son concordantes dentro del método operativo.

Se varió la cantidad de orina que pasa através de la columna, para una misma dilución no observándose mayores diferencias en los resultados. Es decir, que todas las bases presentes son fijadas por la resina dentro de los límites ensayados.

	10 ml.	25 ml.	50 ml.
dilución 1/20	264	264	264
" 1/30	266	264,1	263,8
" 1/40	264	263,6	264
" 1/50	260	264	264

Los resultados anteriores son promedio de tres determinaciones particulares en cada caso.

Se comprobó la reproductibilidad de los datos a través de 50 determinaciones consecutivas con una misma e-

rina. En todos los casos, se pasaron 10 ml. de orina diluída 1/50, lavando posteriormente con 50 ml. de agua destilada. La velocidad de pasaje fué siempre constante: 10 ml. por cm². y por segundo. Ver cuadro A.

También se realizaron 50 determinaciones con una misma orina diluída 1/50, pero pasando 25 ml. de orina diluída y lavando en todos los casos con 100 ml. de agua destilada. Se mantuvo también en este caso la velocidad de 10 ml. por cm². y por segundo. Ver cuadro B.-

"

C u a d r o A

Determi. N°	Bases totales meq/lt.	Determ. N°	Bases totales meq/lt.	Determ. N°	Bases totales meq/lt.
1	320	18	320	35	320
2	320	19	330	36	320
3	330	20	330	37	320
4	320	21	320	38	320
5	320	22	320	39	310
6	310	23	320	40	320
7	330	24	320	41	320
8	320	25	320	42	320
9	320	26	320	43	320
10	320	27	320	44	320
11	320	28	320	45	320
12	320	29	320	46	320
13	330	30	320	47	320
14	320	31	320	48	320
15	320	32	320	49	320
16	320	33	330	50	320
17	320	34	320		

Quadro B

Determ. Bases totales N°	meq/lt.	Determ. Bases totales N°	meq/lt.	Determ. Bases totales N°	meq/lt.
1	360	18	360	35	364
2	364	19	364	36	360
3	360	20	360	37	360
4	360	21	360	38	356
5	360	22	360	39	360
6	356	23	360	40	360
7	360	24	356	41	356
8	360	25	360	42	360
9	360	26	364	43	360
10	360	27	360	44	360
11	364	28	360	45	360
12	364	29	360	46	360
13	364	30	360	47	364
14	360	31	360	48	360
15	356	32	360	49	360
16	360	33	364	50	360
17	360	34	360		

En el primer caso, se observó gran concordancia en los datos, obteniéndose diferencias de solo 10 meq. en más o en menos. Estas corresponden a la menor diferencia apreciable en la lectura de la bureta que es de 0,05 ml. (una gota) lo que significan exactamente 10 meq., debido a la cantidad de orina pasada.

Si se quiere una mayor aproximación en los datos, es aconsejable usar la otra técnica, es decir, pasar

25 ml. y lavar con 100 ml. de agua destilada, aunque en este caso sacrificuemos algo de rapidez.

Conservadores: Se comprobó que el uso de timol, toluol, ó formol como conservadores, no afectaba la determinación del contenido en bases totales.

Para comprobarlo se realizaron las determinaciones sobre dos muestras de una misma orina, conteniendo una de ellas conservador. En todos los casos, las muestras eran de 24 horas y se procedió pasando 25 ml. de orina diluida 1/50, lavándose con 100 ml. de agua destilada. Los líquidos de pasaje y lavados, se titularon como siempre, con ácido sulfúrico 0,02N y anaranjado de metilo como indicador.

Datos promedio de tres determinaciones:

Nº Orina	con timol (algunos crist./lt.)	con toluol (5 ml/lt.)	con formol (3 g/lt.)
1 360 meq/lt.	360	360	361,3
2 284	284	284	284
3 328	328	328	328

**DETERMINACION DE BASES TOTALES EN ORINAS DE PERSONAS SOMETIDAS
A DIETAS ALCALIZANTES, ACIDIFICANTES Y MIXTAS**

Se ingirió durante una semana, una dieta integrada exclusivamente por alimentos alcalizantes: porotos, habas, lechuga, papas, leche, remolacha, ciruelas, manzanas y bananas.

En la semana siguiente se cambió el régimen ingiriendo alimentos acidificantes: carne, arroz, huevos, pan y pescado. Finalmente y también durante una semana se ingirió una dieta mixta.

En todos los casos, a partir del segundo día, se comenzó a recoger orina, en muestras de 24 y 48 horas.

Se pasaron 25 ml. de orina diluida 1/50, lavando luego con 100 ml. de H₂O destilada. La velocidad de pasaje fue de 10ml. por cm². y por segundo. El efluente y aguas de lavado se titularon con SO₄H₂ 0,02 M. y rojo de metilo.

Esta experiencia se realizó con tres personas a las que se suministró las siguientes dietas:

Dieta diaria alcalizante:

<u>Sujetos</u>	<u>J.D.B.</u>	<u>R.M.S.</u>	<u>O.H.S.</u>
Porotos	200 grs.	200 grs.	200 grs.
Papas	500 "	500 "	500 "
Lechuga	—	150 "	150 "
Habas	100 grs.	100 "	100 "
Leche	750 cc.	500 cc.	500 cc.
Remolacha	200 grs.	150 grs.	150 grs.
Manzanas	700 "	700 "	500 "
Ciruelas	100 "	100 "	100 "

<u>Sujeto</u>	<u>J.D.B.</u>	<u>R.M.S.</u>	<u>O.H.S.</u>
Bananas	—	—	150 grs.
Calorías: (valor aprox.)	2600	2500	2400

Dieta diaria acidificante:

<u>Sujeto</u>	<u>J.D.B.</u>	<u>R.M.S.</u>	<u>O.H.S.</u>
Huevos	2	3	2
Pan	400 grs.	500 grs.	400 grs.
Arroz	150 "	200 "	150 "
Carne	500 "	200 "	300 "
Pescado	—	—	200 "
Calorías (valor aprox.)	3000	2500	2700

Dieta diaria mixta:

<u>Sujeto</u>	<u>J.D.B.</u>	<u>R.M.S.</u>	<u>O.H.S.</u>
Papas	300 grs.	150 grs.	—
Leche	500 cc.	500 cc.	600 cc.
Pan	250 grs.	250 grs.	250 grs.
Carne	200 "	200 "	250 "
Huevos	2	2	—
Pescado	100 grs.	—	150 grs.
Arroz	—	150 grs.	—
Patates	—	—	100 grs.
Lechuga	150 grs.	—	100 "
Remolacha	—	150 grs.	100 grs.
Manzana	500 grs.	400 grs.	500 grs.
Banana	100 "	100 "	—
Calorías: (valor aproxin.)	2700	2800	2700

El análisis de las diferentes muestras de orina dió los siguientes resultados:

Dieta alcalizante:

Sujetos:	J.D.B.	R.M.S.	O.H.S.
Muestras	Bases Totales meq/lt.		Bases Totales meq/lt.
	c/24 hs. o/48 hs.	c/24 hs. o/48 hs.	c/24 hs. o/48 hs.
1)	356	384	396
2)	358,6	384	388
3)	360	384	380
4)	368	384	384
5)	372	388	381,3
6)	376	392	380
7)	376	388	380
8)	376	386,6	380
9)	376	384	380

Dieta acidificante

Sujetos:	J.D.B.	R.M.S.	O.H.S.
Muestra	Bases Totales meq/lt.		Bases Totales meq/lt.
	c/24 hs. o/48 hs.	c/24 hs. o/48 hs.	c/24 hs. o/48 hs.
1)	224	236	192
2)	220	236	192
3)	216	235,3	192
4)	212	228	200
5)	210,6	225,3	200
6)	208	224	196
7)	212	228	196
8)	208	238	192
9)	204	236	188

Dieta mixta:

Sujeto:	J.D.B.		R.M.S.		O.H.S.	
	Bases Totales		Bases Totales		Bases Totales	
	meq/lt.		meq/lt.		meq/lt.	
Muestra	c/24 hs.	c/48 hs.	c/24 hs.	c/48 hs.	c/24 hs.	c/48 hs.
1)	304		296		328	
2)		305,3		294		326
3)	306,6		292		324	
4)	304		300		324	
5)		302		298		322
6)	300		296		320	
7)	304		296		324	
8)		304		298		325,3
9)	304		300		326,6	

En todos los casos se realizaron tres determinaciones con cada muestra promediándose los resultados. Las muestras se conservaron en heladera.

Existen en la bibliografía muy pocos datos citados sobre valores normales de bases totales en orina. Sullman cita los siguientes datos utilizando 1,0; 2,0; 3,0 y 4,0 cc. de una misma orina diluida 1/50, 251, 253, 251, 250 meq/lt. no indicando la dieta a que estuvo sometido el paciente.-

Determinación de bases totales en orinas de diabéticos

En la diabetes la orina debería tener un contenido muy bajo de bases totales. Se realizó esta comprobación con orinas obtenidas en el Instituto Nacional de la Nutrición.

En todos los casos se pasaron 25 ml. de orina diluida 1/50 con agua destilada, lavándose luego la columna con 100 ml. de agua destilada. El efluente y aguas de lavado se titularon con SO_4H_2 0,02M y rojo de metilo.

Los datos obtenidos se consignan en los cuadros que se insertan a continuación:

Orinas de diabéticos con cuerpos cetónicos

Cama	Fecha recolec.	pH	Dens.	Glucosa	Cuerpos cetonicos.	Bases Total. meq/lit	Observaciones
47	12/10/58	6	1.025	18,8	regul.	152	de 24 horas
51	"	6	1.020	38	vest.	112	de 24 horas
47	15/10/58	6	1.026	26,2	"	180	12 hs.N.400 cc.
47	"	6	1.025	34	reg.	160	12 hs.D.370 cc.
51	"	6	1.022	49	vest.	140	12 hs.D.2000 cc.
51	"	6	1.016	No	vest.	92	12 hs.N.550 cc.
Ext.	"	6,5	1.017	20,8	reg.	140	de 24 horas
49	20/10/58	6	1.031	56,7	vest.	108	24 hs.1100 cc.
Ext.	"	6,5	1.020	No	"	240	12 hs. D.
"	"	6	1.020	No	"	240	12 hs. N.
18	"	6	1.021	No	"	212	
Ext.)	"	6	1.025	28,4	"	180	12 hs.D.1100 cc.
")	"	6	1.030	38	"	150	12 hs.N.2200 cc.

Ext.)	20/10/58	6	1.023	8,2	vest.	180	
"	"	6	1.022	8,5	"	280	
"	21/10/58	6	1.030	24,4	"	120	24 hs. 1800 cc.
24	"	6	1.023	31,10	"	160	24 hs.
13	13/10/58	6	1.023	26,20	"	200	1er. parcial
1	"	6	1.026	17,90	reg.	140	"
1	"	6	1.028	16	"	140	2° "
1	"	6	1.027	17	"	132	3° "
43	"	6,5	1.012	—	vest.	148	de 24 hs.
45	27/10/58	5	1.026	38	acetona y diacet.	108	12 hs. D. 1900 cc.
45	"	5,5	1.035	32	"	140	12 hs. N. 1000 cc.
46	27/10/58	6	1.027	20	reg.	280	12 hs. D. 370 cc.
46	"	6	1.027	28,40	"	280	12 hs. N. 700 cc.
49	"	6,5	1.010	—	vest.	100	de 24 hs.
37	29/10/58	6	1.031	35	acetona y diacet.	128	de 24 hs.
Ext.)	"	6	1.016	33,8	"	108	12 hs. D.
Ext.)	"	6	1.018	38,5	"	108	12 hs. N.
43	"	6	1.014	8	vest.	140	24 hs.
Ext.	"	6	1.017	—	"	160	24 hs.

Orinas de diabéticos sin cuerpos cetónicos

Cama	Fecha recolec.	pH	Dens.	Glucosa	Bases Total. meq./lt.	Observaciones
39	13/10/58	6	1.015	14.7	160	de 24 horas.
2	"	6	1.026	16,5	100	12 hs. D. 700 cc.
2	"	6	1.020	20	120	12 hs. N. 600 cc.

6	16/10/58	6	1.030	22,7	140	de 24 horas.
44	"	6,5	1.027	17	340	12 hs. D.560 cc.
44	"	6	1.015	No	200	12 hs.N.450 cc.
Ext.)	"	6	1.015	No	180	12 hs.D.1100 cc.
")	"	6	1.017	No	180	12 hs.N.700 cc.
4	20/10/58	6	1.030	28,4	140	12 hs.D.1000 cc.
4	"	6	1.026	22,7	228	12 hs.N.660 cc.
10	30/10/58	6	1.012	—	140	de 24 horas.
49	"	6	1.020	21,5	180	12 hs.D. 505 cc.
49	"	6	1.022	29,3	108	12 hs.N.1460 cc.

Los promedios de las valoraciones de bases totales efectuados en orinas de diabéticos, con y sin cuerpos cetónicos, no muestran apreciables diferencias entre ambos grupos.

Separación de los ácidos b-hidroxibutírico y acetoacético de la acetona en orina mediante resinas intercambiadoras (4,5,6,7,8).

Como hemos dicho anteriormente estas sustancias se encuentran presentes en las orinas de diabéticos, en cantidades relativamente elevadas.

En el presente trabajo se ha intentado su separación mediante intercambio iónico aprovechando el carácter no iónico de la acetona.

Para este fin se utilizó una columna de resina "Amberlite IRA-400" de idénticas características a la empleada para la determinación de bases totales.

El proceso es el siguiente: 50 ml. de orina conteniendo acetona, ácido acetoacético y ácido b-hidroxibutírico, se pasan a través de la columna, se lava luego la misma con 25 ml. de agua destilada - no más para evitar una excesiva dilución de los cuerpos cetónicos presentes -. En el eluido y agua de lavado de la columna, se ensaya la presencia de acetona, acetoacético y b-hidroxibutírico.

Para acetona utilizamos las reacciones de Gunning, Imbert, Frommer y Behre. Para el ácido acetoacético la reacción de Gerhardt y la de Lipiliawski y finalmente para el ácido b-hidroxibutírico la reacción de Hart.

En todos los casos se han utilizado orinas de diabéticos de reciente recolección, ó conservadas en heladera, para evitar la descomposición del ácido acetoacético y la fer-

mentación de los hidratos de carbono.

Reacciones para acetona:

Las reacciones para acetona no son completamente satisfactorias, cuando se aplican directamente a la orina. Esta debe ser destilada en medio ácido, para obtener la acetona pura. En la destilación el ácido acetoacético presente se descompone y la acetona proveniente de este pasa también al destilado. Luego las reacciones sobre el destilado son solo específicas para acetona en ausencia de acetoacético.

Reacciones sobre el destilado ú orina directamente:

Modificación de Gunning a la reacción de Lieben: Para prevenir la confusión con alcohol, Gunning propone el siguiente método: 10 ml. de orina ó 2 ml. de destilado, se alcaliniza con NH_3 y luego se agrega gota a gota, una solución de iodo iodurada. Se forman copos parduzcos que desaparecen agitando (ioduro de nitrógeno). No calentar la mezcla. Se sigue agregando gota a gota el reactivo y en presencia de acetona, se formará un precipitado amarillento de iodoformo.

Modificación de Imbert a la reacción de Legal: El reactivo de Imbert, posee la ventaja de su mayor conservación. (nitroprusiato de sodio en solución al 10% mezclada en partes iguales con ácido acético). A 5 ml. de orina ó 2 ml. de destilado, se agrega 20 gotas del reactivo y se mezcla. Luego por las paredes del tubo se agrega amoníaco de manera de sobrepenerlo a la mezcla. En caso de existir acetona, se for-

na un anillo de color rojo violáceo, que desaparece por el calor, carácter que sirve para diferenciarlo de algunos componentes medicamentosos, capaces de dar falsas reacciones positivas (entre estos se encuentra principalmente el ácido acetil-salicílico).

Reacción de Frommer: Colocar 10 cc. de orina en un tubo de ensayo. Agregar 1 gr. de HOK. Sin esperar su completa disolución agregar 10 a 20 gotas de solución alcohólica de aldehído salicílico al 10%. Calentar luego hasta 70°C. La presencia de acetona dará un anillo rojo púrpura intenso en el punto de contacto.

Reacción de Behre ⁽⁹⁾: Colocar 3 cc. de orina en un tubo de ensayo limpio (2 x 12 cms). Agregar 1 gota de SO_4H_2 (1:1) para facilitar la conversión del ácido acetoacético a acetona. En el centro de un cuadrado de algodón, pequeño, delgado y limpio, colocar una gota de aldehído salicílico seguida por 2 gotas de NaOH 32%. Estos reactivos forman un disco plano amarillo. Colocar el algodón sobre el tubo, de forma que la mancha mire a la orina, pero no toque los costados del tubo. Colocar el tubo en un baño de H_2O hirviendo durante 8 minutos. La presencia de acetona es revelada por un color anaranjado de la mancha, que se intensifica luego de quitar el algodón del tubo. Las reacciones dudosas deben examinarse 10 a 15 minutos después de exponer al aire. El efecto interferente del formaldehído, se evita agregando una gota de $\text{Cr}_2\text{O}_7\text{K}_2$ al 0,2% a la orina antes de calentar.-

Reacciones para el ácido acetoacético

Reacción de Gerhardt: Colocar 5 cc. de orina en un tubo de ensayo. Agregar solución de Cl_3Fe al 10%, gota a gota, hasta que no se produzca más precipitación. En presencia de ácido acetoacético se produce un color rojo violáceo. El color puede ser a veces enmascarado por el precipitado de fosfato férrico. En tal caso el líquido debe filtrarse. Un resultado positivo indica la posible presencia de acetoacético.

Reacciones de confirmación

a) Colocar 5 cc. de orina en un tubo de ensayo o Erlenmeyer y hervir durante 3 a 5 minutos. Enfriar y efectuar la reacción anterior. Si la reacción anterior fué debida a la presencia de ácido acetoacético esta última deberá ser negativa, pues por efecto del calor el ácido acetoacético se descompondrá dando anhídrido carbónico y acetona que no dá la reacción.

b) Colocar 5 cc. de orina en un tubo de ensayo. Acidificar con SO_4H_2 para liberar el ácido acetoacético. Agitar la mezcla con éter para extraer el ácido. Decantar el éter etílico y evaporar luego a sequedad. Disolver el residuo en 1-2 cc de H_2O y agregar 3 a 5 gotas de solución de Cl_3Fe . Una reacción positiva indica la presencia de acetoacético.

El color de la reacción desaparece espontáneamente en 24 a 48 horas. Sustancias como la antipirina, fenacetina, ácido salicílico, salicilatos, acetato de sodio, cianatos y fenoles, dan un color rojo similar ba-

jo estas condiciones, pero cuando es debido a la presencia de cualquiera de estas sustancias, el color no desaparece espontáneamente y puede permanecer por días. Muchas de estas sustancias interferentes son solubles en benceno ó cloroformo y pueden ser eliminadas de la orina por este medio antes de extraer con éter como antes. El ácido acetoacético es insoluble en benceno o cloroformo. Maxwell señaló un posible error en el uso de la reacción con Cl_3Fe en orinas de pacientes que toman CO_3HNa ⁽¹⁰⁾.

Reacción de Arnold modificada por Lipliawski⁽⁵⁾;

Soluc. I: Para-amido-aceto-fenona	1 gr.
H ₂ O destilada	100 cc
HCl conc.	2 cc

Soluc. II: Nitrito de Potasio	1 gr.
H ₂ O destilada	100 cc

Colocar en un tubo de ensayo 6 cc de solución I y 3 cc. de solución II. Agregar igual volumen de orina y una gota de NH_3 concentrado; agitar la mezcla hasta que tome color rojo ladrillo.

Tratar de 10 gotas hasta 2 cc de esta mezcla (de acuerdo a la probable cantidad de diacético presente) con 15 a 20 cc de ClH concentrado, 3 cc de cloroformo y 2 a 4 gotas de una solución acuosa de Cl_3Fe . Tapar el tubo con un corcho y agitar suavemente, de medio a un minuto. En presencia de ácido diacético, el cloroformo toma un tinte violáceo; en caso contrario el color será amarillo

o rosado.

Reacción para el ácido b-hidroxibutírico

Reacción de Hart: A 20 cc de orina se agregan 20 cc de H₂O destilada y unas gotas de ácido acético. Se hace hervir hasta reducir el volumen a 10 cc. De esta forma se elimina la acetona y el ácido diacético presente.- Luego se diluye a 20 cc. con H₂O destilada. Se mezcla y divide en partes iguales. A una de ellas se le agraga 1 cc. de H₂O₂. Se calienta suavemente y se deja enfriar. Luego se practicará sobre ambos tubos una reacción de Legal ó de Imbert. En caso de que esta sea positiva en el tubo que contiene agua oxigenada, significa la presencia de ácido b-hidroxibutírico transformado por oxidación en acetona. En el otro tubo la reacción debe permanecer negativa.

Los datos obtenidos están resumidos en el siguiente cuadro:

Muestra	A C E T O N A				ACIDO ACETO- ACETICO		ACIDO B-HIDRO Xi- BUTIRICO
	Re. Gun.	Re. Imb.	Re. Fron.	Re. Lehre	Reac. Gerhardt	Reac. Lipl.	Reac. Hart
	orina	+	+	+	+	+	+
N° 1							
efluente	+	+	+	+	-	-	-
orina	+	+	-	+	+	+	+
N°2							
efluente	+	+	+	+	+	-	-

	orina	+	+	+	+	+	+	+
N° 3	efluente	+	+	+	+	-	-	-
	orina	+	+	+	+	+	+	+
N° 4	efluente	+	+	+	-	-	-	-
	orina	+	+	+	+	+	+	+
N° 5	efluente	+	+	+	+	+	+	+
	orina	+	+	+	+	+	+	-
N° 6	efluente	+	+	+	+	-	-	-
	orina	+	+	+	+	+	+	+
N° 7	efluente	+	+	+	+	-	-	-
	orina	+	+	+	+	+	+	-
N° 8	efluente	+	+	-	+	-	+	-
	orina	+	+	+	+	+	+	-
N° 9	efluente	+	+	+	+	-	-	-
	orina	+	+	+	+	+	+	+
N° 10	efluente	+	+	+	-	+	-	-

Por los resultados obtenidos se deduce que es realizable la separación de la acetona de los ácidos acetoacético y

β -hidroxibutírico mediante el uso de una columna de resina "Amberlite IRA-400". La acetona debido a su carácter no iónico no es absorbida, en tanto que los ácidos sí lo son, encontrándose probablemente presentes en la orina al estado de sales.

La muestra N° 5 se aparta de lo dicho, pudiéndose interpretar como una determinación fallida, debido probablemente a una mala absorción en la columna de resina (probables canalizaciones).-

Bibliografía:

- (1) - SOLEMAN H., Klin. Wochschr., 185:30, 1952.
- (2) - POLIS, B.D. y REINHOLD, G.J., J. Biol. Chem., 156:211, 1944.
- (3) - SAMUELSON, O., Ion Exchangers in Analytical chemistry, ed. J. Wiley & Sons, New York, pág. 72-101, 1954.
- (4) - HAWK, P. y BERGMAN, O., Practical Physiological Chemistry, ed. Blakiston's Son and Co., 1937, 11a. edic.
- (5) - GRANDWORTL, R.B.E., "Clinical Laboratory Methods and Diagnosis", Ed. The C.V. Mosby Company, San Louis, 4a. edic. 1949. Tomo I, pág. 76-77.
- (6) - HARROW, B., Tratado de Bioquímica. Ed. Atlante S.A., México 1946, pag. 318-428.
- (7) - MARENZI, A., CARDINI, C., BANFI, R. y VILLALONGA, F., Bioquímica Analítica Cuantitativa. Ed. El Ateneo. Buenos Aires, 1947
- (8) - LEVINSON, S.A. y MAC FATE, R.P., Diagnóstico Clínico de Laboratorio. Ed. El Ateneo, Buenos Aires, 1a. edic. en

castellano de la 4a. edic. inglesa, 1956, pag. 425-428.

- (9) - BEHRE, J.A., J.Lab.Clin.Med.770:13, 1928.
- (10) - MAXWELL, L.A.I., Med.J.Australia, 458:1, 1920.

CONCLUSIONES

- 1 - Se ha revisado la bibliografía existente sobre las aplicaciones biológicas de las resinas intercambiadoras de iones, especialmente las que se refieren a sangre y orina.
- 2 - Se ensayó la técnica de Sullmann para determinación de bases totales en diferentes muestras de orina, habiéndose encontrado resultados reproducibles.
- 3 - Se valoraron las bases totales por dicha técnica en orina de personas normales sometidas a dietas acidificantes, alcalizantes y mixtas.
 - En personas normales con dietas acidificantes se obtuvieron cifras comprendidas entre 192 y 238 meq/lt. (7,68-9,52 g.HONa/lt.)
 - En personas normales con dietas alcalizantes se obtuvieron cifras comprendidas entre 358,6 y 388 meq/lt. (13,344-15,52 g. HONa/lt.)
 - En personas normales con dietas mixtas se obtuvieron cifras comprendidas entre 294 y 326 meq/lt. (11,76-13,04g.HONa/lt.)
- 4 - Sobre 13 orinas de diabéticos sin cuerpos cetónicos se ha encontrado un valor mínimo de 100 meq/lt. (4 g.HONa/lt.) y un máximo de 340 meq/lt (13,6 g. HONa/lt.).
- 5 - Sobre 32 orinas de diabéticos conteniendo cuerpos cetónicos se ha observado un valor mínimo de 92 meq/lt. (3,68 grs.HONa/lt.) y un máximo de 280 meq/lt. (11,20 grs.HONa/lt.)
- 6 - Se realizaron también algunos ensayos aislados para tratar de separar entre sí los cuerpos cetónicos en orina.
- 7 - Los ensayos cualitativos realizados revelan en la mayoría de los casos (7 sobre 9) una fijación del ácido aceto-acético o de sus compuestos por la resina empleada. Estos últimos resultados muestran una interesante vía para estudios futuros.

