

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

FACULTAD DE QUIMICA.

1967.

EMPLEO DEL BAGAZO DE CAÑA EN LA SINTESIS DE  
ADSORBENTES INTERCAMBIADORES DE IONES Y SU  
USO EN EL FRACCIONAMIENTO DE PROTEINAS.

FRANCISCO J. MIGUELEZ PRIETO  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CAPITULOS.

I. INTRODUCCION.

II. MATERIAL Y REACTIVOS.

III. METODOLOGIA.

IV. PARTE EXPERIMENTAL.

V. RESULTADOS.

VI. DISCUSION Y CONCLUSIONES.

VII. BIBLIOGRAFIA.

## INTRODUCCION

Las necesidades creadas por el rápido desarrollo de la broquímica han obligado a los investigadores a idear nuevos métodos de análisis y fraccionamiento que no alteren la estructura de las proteínas: dichos métodos de separación han permitido el aislamiento de numerosas fracciones protéicas tanto del plasma como de otros orígenes.

De los métodos más empleados en el fraccionamiento de proteínas del plasma se señalan los desarrollados por E.J. Cohn (1,2) y sus colaboradores, que se basa en diferencias de solubilidad de las distintas proteínas plasmáticas, empleando mezclas de alcohol y agua a un pH y fuerza iónica definidos.

Otros autores (3) emplean en sus métodos soluciones de sulfato de amonio a diferentes concentraciones.

La desnaturalización de las proteínas provocada por la aplicación de condiciones drásticas para lograr los fraccionamientos han hecho pensar en métodos más adecuados que no presenten estas desventajas.

Recientemente Tiselius y Porath (4) describieron dos técnicas la electroforesis y la ultracentrifugación, mediante los cuales se han identificado múltiples fracciones proteicas. Estas técnicas son excelentes como métodos analíticos, pero no se los consideran útiles en los fraccionamientos de mezclas proteicas.

Posteriormente Sober y Gutter (5) describieron la electroforesis de zona que emplea como medio de soporte diferentes tipos de geles de donde las fracciones se separan posteriormente por elución.

También la cromatografía como técnica de separación de sustancias ha entrado en fase de gran desarrollo que ha simplificado los problemas de las separaciones.

Así, los principios seguidos en la cromatografía fueron aplicados a la cromatografía de proteínas basándose en algunas consideraciones por las características estructurales de estas macromoléculas, como son su tamaño molecular, su carácter polivalente y su labilidad.

Siendo de gran peso molecular, las proteínas presentan dificultad en la penetración al interior de los adsorbentes reaccionando solo en la superficie de ellos. Por lo tanto es de importancia manejar soportes con características de adsorción adecuados.

Así mismo, debido a su carácter polivalente, es indispensable buscar condiciones en las que todos los enlaces proteína-adsorbente pueden romperse simultáneamente, en un momento dado. Esto se logra en unos casos bajo condiciones de fuerza iónica definidas por parte del eluyente y por selección de rangos pH reducidos.

La labilidad de las proteínas limitan también las condiciones de trabajo pues son indispensables las temperaturas bajas y conservar el pH dentro de ciertos límites.

Los adsorbentes más utilizados, tomando en cuenta las características antes descritas, son del tipo de los intercambiadores de iones.

Zittle (6) reportó haber obtenido resultados satisfactorios al separar proteínas de bajo peso molecular y de puntos isoelectricos altos empleando una resina carboxílica la

Amberlita IRC-50.

Por su parte Prins y Hursman (7) indican haber separado cuatro tipos de carboxihemoglobina, usando la misma resina.

Así mismo Li y colaboradores (8) utilizaron la Amberlita IRC-50 en el último paso de la purificación de la hormona del crecimiento del hombre y otros animales.

Una resina sulfónica, la Dowex 50 se empleó satisfactoriamente en la separación de quimotripsina del quimotripsinógeno (9). Asimismo Boman (10) aisló con la misma resina fosfataza de un extracto prostático.

Este tipo de adsorbentes, las resinas de intercambio iónico, tiene como principal limitación en su uso el hecho de que forman con gran número de proteínas enlaces irreversibles. Esta situación en ciertos casos se debe a la desnaturalización de la proteína en la superficie de la resina. Boardman (11) establece que la desnaturalización ocurre por un desdoblamiento de la molécula proteica al formarse los enlaces resina-proteína.

En general esta situación es el resultado de la excesiva formación de enlaces proteína-resina, lo que impide una disociación simultánea de dichos enlaces. La disociación sólo se logra bajo condiciones extremas que afectan la configuración original de la molécula protéica. Las uniones formadas presentan un carácter electrostático y también intervienen en ellas fuerzas de Van deer Waals y enlaces de Van deer Waals entre la cadena lateral del aminoácido con zonas lipofílicas de la superficie del adsorbente que abren los enlaces secundarios é internos de dichas moléculas.

Por lo tanto, solamente las proteínas cuyas estructuras secundarias y aún terciarias y cuaternarias sean resistentes pueden ser separadas con este tipo de intercambiadores.

En el caso de proteínas lábiles como son todas las proteínas del plasma no ha sido posible el empleo de estas resinas.

Estas consideraciones llevaron al desarrollo de otro tipo de adsorbentes derivados de la celulosa, cuyo soporte presenta un carácter hidrófilico, eliminando así la posibilidad de interacción de fuerzas secundarias que alteren la configuración de las proteínas.



Sober y Peterson (12) reportaron la preparación y el uso de adsorbentes de intercambio iónico para el fraccionamiento de proteínas. Sus estudios fueron posteriormente apoyados por los reportes de muchos investigadores.

Ellis (13) y colaboradores reportaron la purificación de la hormona del crecimiento por cromatografía con Dietilaminoetil Celulosa.

McCoy y Fahey (14) obtuvieron excelentes resultados en cromatografías de sueros humanos empleando el mismo adsorbente.

Speer (15) en su trabajo de fraccionamiento de proteínas con DEAE Celulosa con suero humano logró el aislamiento de anticuerpos sanguíneos y reportó haber obtenido resultados satisfactorios.

J. F. Sgouris (16) preparó la Inmunoglobina G muy pura utilizando DEAE Celulosa, a partir de plasma humano y suero de M. rhesus.

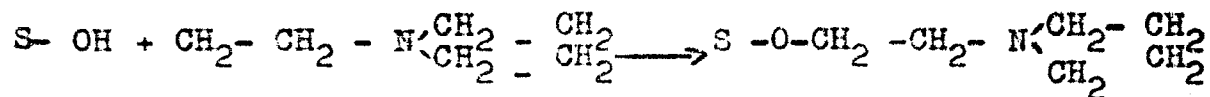
Horbett y Fahey (17) lograron a su vez fraccionar gamma globulina utilizando DEAE Celulosa en columna.

Los adsorbentes descritos por Sober y Peterson son del tipo de intercambiadores de iones que llevan un soporte insoluble y con carácter hidrofílico, la celulosa, a la cual se le introducen grupos iónicos por medio de reacciones de halogenación.

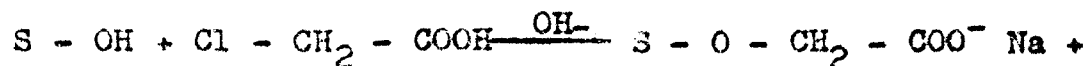
Debido a que la mayor parte de la estructura de la celulosa se conserva en estos adsorbentes de intercambio iónico no se los puede considerar como resinas. (18).

Según el grupo iónico insertado, el adsorbente presenta diferentes características.

La Dietilaminoetil celulosa presente carácter de intercambio aniónico y se obtiene al hacer reaccionar alfa celulosa en medio alcalino con 2 Cloro NN dietilamina.



La carboximetil celulosa es un adsorbente catiónico obtenido por tratamiento de celulosa en medio alcalino con ácido monocloroacético.



Aunque el mecanismo del intercambio iónico no ha sido bien

definido todavía, todas las teorías formuladas (19) hacen notar que el intercambio iónico se lleva a cabo en un sitio activo, que es un grupo iónico capaz de formar un enlace electrostático con un ion de carga opuesta. La facilidad con que este último ion es desplazado depende de la fuerza del enlace formado y varía en la misma forma a la disociación que sucede con los electrolitos. Por lo tanto, las leyes que rigen el intercambio iónico en estos sistemas heterogéneos son análogos a los que rigen a las soluciones de electrolitos.

En el caso de las proteínas la adsorción en la superficie del intercambiador se lleva a cabo mediante la formación de múltiples enlaces entre la proteína y el adsorbente. Por ser ambos polielectrolitos son capaces de interactuar en diferentes puntos. La experiencia nos indica que las proteínas adsorbidas se unen con mayor número de enlaces y con más fuerza que una sustancia con una sola carga bajo las mismas condiciones.

Las proteínas pueden ser eluidas del adsorbente cuando el pH se cambia para así reducir el número de cargas, ya sea en la proteína o en el adsorbente: o si la concentración de sales se aumenta para competir con las cargas existentes. Estos conceptos de enlaces múltiples los señala Stahelin (20), entre

otros investigadores.

Características de este tipo de adsorbentes son:

Presentan grupos iónicos definidos: tienen una capacidad muy alta para la adsorción de proteínas, a pesar de que el contenido de grupos iónicos (ácidos ó básicos) es alrededor de 1 meq/gr. de adsorbente (21): los enlaces etéreos formados por la introducción de los grupos iónicos no resta estabilidad al adsorbente y la característica principal es que no altera las proteínas sensibles durante los procesos de cromatografía.

Sober describe (12) en su artículo, algunas de las celulosas que pueden utilizarse, todas ellas provienen de madera ó algodón. Estas celulosas son de importación y su costo es elevado, por lo que se pensó en utilizar la celulosa del bagazo de caña que compite por su pureza, bajo costo y fácil adquisición en nuestro medio con las celulosas de otro origen.

El el objeto del siguiente trabajo sintetizar a partir de la celulosa de bagazo de caña dos adsorbentes intercambiadores de iones, la carboximetil y la Dietilaminoetil Celulosa

y efectuar posteriormente distintos experimentos para conocer la capacidad y poder de resolución de los adsorbentes preparados.

MATERIAL Y REACTIVOS

A) Material:

- 1.- Molino de martillos
- 2.- Tamizador eléctrico Retac 3 D
- 3.- Espectrofotómetro Beckman DU.
- 4.- Columnas de cromatografía de 90 x 1.7 cm.
- 5.- Colorímetro Leitz modelo LC2
- 6.- Potenciómetro Photovolt modelos 125
- 7.- Aparato para Electroforesis e Inmunolectroforesis  
LKB modelo 3290 B.

B) Reactivos:

- 1.- Celulosa de bagazo de caña, de Cía. Industrial San Cristobal.
- 2.- Clorhidrato de 2 clorotrietilamina, de Eastman Organic Chemicals.
- 3.- Acido monocloroacético de J. T. Baker Chemcal Co.
- 4.- Buffer fosfatos 0.005 M pH 7.0
- 5.- Buffer fosfatos 0.0175 M pH 6.3
- 6.- Buffer fosfatos 0.04 M pH 5.9
- 7.- Buffer fosfatos 0.1 M pH 5.8
- 8.- Buffer fosfatos 0.4 M pH 5.2
- 9.- Buffer fosfatos 0.4 M pH 4.4
- 10.- Buffer fosfatos 0.01 M pH 8.0
- 11.- Buffer fosfatos-cloruro de sodio 0.2 pH 7.6

La preparación de los ocho anteriores soluciones amortiguadoras fueron descritas por E. C. Adams (22.)

12.- Reactivo de Biuret (23)

13.- Ion Agar No. 2, Oxo

14.- Suero Humano Normal

15.- Extracto Placentario

16.- Gamma Globulina, fracción II de Cohn (1,2)

17.- Albumina, fracción V de Cohn (1,2). Ambas fracciones de Cohn se obtuvieron de las etapas VII y V del proceso industrial para gamma globulina y albumina seguidas en el Laboratorio donde se llevó a cabo este trabajo.

18.- Suero de Conejo anti-humano.

## METODOLOGIA

- 1.- La determinación de proteínas totales de los sueros y de sus fracciones se llevó a cabo mediante la reacción de Biuret (23).
- 2.- Las determinaciones cuantitativas de cloruros expresados como cloruro de sodio, se hicieron según la técnica de Schales y Schales. (24)
- 3.- La técnica utilizada para la preparación de las columnas de cromatografía se basa en los métodos que refieren R. J. Speer (15) y Peterson y Sober (12) modificada y adaptada a nuestras necesidades. La técnica es la siguiente:  
El adsorbente seco se pesa, calculando 1g de él por cada 50mg de proteínas por cromatografiar, en caso de emplear dietilaminoetil celulosa y 1g por cada 10 mg de proteínas cuando se utiliza la carboximetil celulosa.

Una vez pesado se suspenden 20 veces su peso de buffer fosfatos 0.005M pH 7.0, en el caso de usar dietilaminoetil o buffer fosfatos-cloruros 0.2M pH 7.6 cuando se emplea carboximetil celulosa y se agita durante 1 hora con agitador eléctrico. Se deja sedimentar durante 1 hora. El sobrenadante se decanta y se añade el mismo volumen de buffer. Este paso se



repite hasta que no se observan variaciones en el pH original de la solución amortiguadora.

Equilibrado el adsorbente se decanta el sobrenadante y se añade más buffer hasta ocupar igual volumen al que ocupa el adsorbente decantado. Se agita la suspensión y con cuidado se añade a la columna de cromatografía, el líquido se deja escurrir por la llave inferior y el adsorbente sedimenta hasta formar una cama, la cual no debe dejarse secar. Esto se evita al añadir más buffer cuando el líquido esté a punto de rebasar la columna formada por el adsorbente. Para poder hacer más compacta la columna se inyecta aire a presión por la llave superior de la columna. La presión máxima aplicada deberá ser de  $0.5 \text{ Kg/cm}^2$ . Una vez lograda la estabilidad de la columna del intercambiador se revisa que no presente fracturas ni desniveles que impidan un buen desplazamiento de las fracciones eluidas. El líquido excedente que se deposita en la parte superior de la columna se deja escurrir hasta un nivel de 1 cm. arriba de la superficie del adsorbente.

Se cierra la llave de paso inferior y se conserva a  $4^{\circ}\text{C}$  antes de emplearse.

4.- La técnica usada en los fraccionamientos por cromatografía está basada en los métodos descritos por Sober, Gutter y Peterson (5), Fahy y Horbett (14) R.J. Speer (15) y E. C. Adams (22). Además se introdujeron modificaciones para ajustarla a nuestras necesidades.

A la muestra por fraccionar se le determinan proteínas por el método de Biuret y cloruros por el método de Schales y Schales (24). De acuerdo con las proteínas existentes se pesa el adsorbente como se expuso anteriormente y si los  $\text{Cl}^-$  son mayores a 0.01 g<sup>3</sup> se dializa (25) la muestra, ya que un contenido mayor de cloruro de sodio altera los resultados del fraccionamiento. La diálisis se hace contra buffer fosfatos 0.005M pH 7.0 durante 24 hs. y a temperaturas no mayores a 4°C. Después el suero dializado se centrifuga.

Una vez calculadas las proteínas, los cloruros convenientes y preparada la columna se procede a efectuar el fraccionamiento.

La muestra se deja escurrir lentamente por las paredes de la columna evitando que la capa superior del adsorbente sufra deformaciones. Una vez añadida la muestra se abre la llave inferior de paso y se deja adsorber.

Cuando ha sido adsorbido el suero se cierra la llave y se procede a eluir la muestra con cantidades conocidas de los buffers adecuados.

Se recogen fracciones de un volumen conocido, y la velocidad de elución se mantiene constante. Generalmente es necesario aplicar presión ( no mayor de  $0.1 \text{ Kg/cm}^2$ . ) Las fracciones recogidas se leen en un espectrofotómetro Beckman DU a  $280 \text{ m}\mu$  (5,14,15). Los resultados se grafican en papel milimétrico colocando en el eje de las ordenadas la absorbancia a  $280 \text{ m}\mu$  y en el eje de las abcisas el número de fracciones eluidas.

Terminada la cromatografía el adsorbente se puede volver a regenerar (18,21) por la siguiente técnica:

Se suspende el adsorbente en 1 litro de solución salina al 1.5g% y se agita durante 1 hora. Se filtra la suspensión empleando un embudo buchner y se hacen dos lavados sucesivos con 250 ml de solución de NaOH al 5%. Los lavados se repiten posteriormente de dos porciones de 250 ml cada uno de HCl al 5%. Se hace un segundo lavado con solución al 5% de NaOH, en 2 porciones de 250 ml cada una.

Por último se lava el sólido con agua destilada hasta eliminar la alcalinidad. El sólido se seca y tamiza por el tamiz correspondiente.

5.- La técnica de elución utilizada para la cromatografía de las fracciones séricas es la descrita por E. C. Adams (22). Es un sistema de elución por pasos en donde gradualmente se incrementa la fuerza iónica y se disminuye el pH.

En el caso de la separación y purificación de gamma globulina del extracto placentario se eligieron los buffers más adecuados citados por los reportes de Sober (5,21).

6.- La técnica de electroforesis en papel empleada durante la experimentación es la citada por Ivor Smith (26).

7.- Las inmunolectroforesis se llevaron a cabo por el método de Pierre Grabar (29).

PARTE EXPERIMENTAL

- I.- Molido de la Celulosa de Bagazo de Caña
- II.- Síntesis de los adsorbentes dietilaminoetil celulosa y carboximetil celulosa.
- III.- Fraccionamientos y purificaciones de plasmas y de sus fracciones utilizando los adsorbentes sintetizados.

I.- Molido de la Celulosa de Bagazo de Caña

La celulosa de bagazo de caña, que comercialmente se maneja prensada en paquetes de peso variable se despedazó con ayuda de tijeras de tamaño adecuado. Cuando el tamaño de los trozos llegó a unos 2-3 cm se puso a secar al horno a una temperatura no mayor de 60°C, ya que de otra manera la celulosa toma un color amarillento.

Ya seco se molió en un molino de martillos. El polvo obtenido más o menos fino se lavó primero con solución de HCl IN a razón de 1 litro por cada 100 gs del polvo, se hicieron luego repetidos lavados con agua hasta neutralizar. Posteriormente se hizo un lavado más con solución IN de NaOH ( 1 litro por cada 100 gs) haciendo luego lavados con agua hasta neutralidad. Todos los lavados se hicieron en un embudo buchner de

tamaño adecuado y aplicando vacío, Los lavados tuvieron por objeto eliminar impurezas de la celulosa.

Con objeto de facilitar el secado se procedió a secarla en el mismo buchner añadiendo porciones de 100 ml de alcohol.

Una vez seca se molió nuevamente en el molino de martillos. El polvo se tamizó en un tamizador eléctrico haciéndole pasar primero por malla del número 100 y luego por malla del número 200. La celulosa ya tamizada se guardó en frascos secos.

## II. -Síntesis de los adsorbentes Dietilaminoetil celulosa y carboximetil celulosa.

Inicialmente se preparó un lote con 100 gs de celulosa para cada uno de los adsorbentes como lo indica la técnica descrita por Sober y Peterson (12).

Después se sintetizaron una serie de lotes de ambos adsorbentes modificando las condiciones dadas por la técnica original, buscando las condiciones de reacción más útiles para la síntesis de los adsorbentes antes mencionados.

Las síntesis efectuadas fueron:

A) Síntesis de la Dietilaminoetil Celulosa

A 100 gramos de celulosa tamizada por malla del número 200 se le agregó lentamente y con agitación 300 ml de NaOH al 20%.

La mezcla se dejó reposar una hora, al cabo de la cual se añadió una solución, que contenía 30 gs de clorhidrato de 2 clorotrietilamina en 100 ml de agua destilada. La adición se hizo en forma lenta y con agitación.

La mezcla homogénea se calentó una hora a baño maría a 80°C la pasta obtenida se dejó enfriar en baño de hielo durante una hora.

En seguida se agregaron 500 ml de solución 2 M de cloruro de sodio y la suspensión obtenida se filtró a través de un embudo buchner, con aplicación de vacío.

Eliminando el líquido se lavó el sólido en el mismo embudo con tres porciones cada una de un litro de solución al 5% de NaOH. El líquido colorido filtrado se desechó.

En el último lavado, el líquido filtrado debe ser incoloro.

Las condiciones de alcalinidad dadas por la sosa se elimi-

naron con lavados sucesivos con agua destilada y probando con papel indicador.

A continuación se hicieron tres lavados sucesivos con porciones de 500 ml de ácido clorhídrico al 5%. La acidez producida se eliminó a su vez con porciones de agua destilada y probando con papel indicador.

El sólido se pasó a un recipiente de vidrio de donde se suspendió en tres litros de NaOH al 1%. Se dejó sedimentar tres horas. El líquido sobrenadante se eliminó por decantación y se añadió a la pasta agua hasta completar tres litros. Se dejó reposar dos horas, el líquido sobrenadante se eliminó y se completó a tres litros con agua destilada. Esta operación se repitió hasta eliminar la alcalinidad.

La suspensión ya neutralizada se filtró nuevamente con un embudo y con la aplicación de vacío. Eliminada el agua se añadieron tres porciones de 200 ml de etanol y se aplicó vacío durante tres horas. Una vez seca se volvió a tamizar por malla del número 200 y se guardó en frascos secos.



B) Modificaciones en la Síntesis de Dietilaminoetil Celulosa

1.) Se preparó un lote No. 2 de DEAE Celulosa a partir de 100 gs. de celulosa tamizada por malla del número 200, pero con el empleo de 40 gs de 2 clorotrietilamina.

Los pasos dados en la primera preparación de este lote fueron señalados en la técnica antes descrita, solamente que la cantidad del reactivo de la amina fué la mitad que en el caso anterior.

2.) Se sintetizó un lote No. 3 usando 100 gs de celulosa tamizada por malla 200 y 160 gs de 2 clorotrietilamina.

El método seguido en la síntesis es similar al original, solo que se utilizó debe cantidad del reactivo de amina.

3.) Se sintetizó un lote No. 4 en donde se siguió paso a paso el método original, solo que se partió de 100 gs de celulosa tamizada por malla No. 100.

A la dietilaminoetil Celulosa obtenida de cada uno de los cuatro lotes se le hicieron las siguientes pruebas que sirvieron como base de comparación con los resultados obtenidos

por otros autores (12).

a) Determinación de grupos ionizables.

Para ello se hizo una determinación de Nitrógeno total por el método de Kjeldahl. Con los resultados obtenidos se calcularon despues los miliequivalentes de nitrógeno por gramo de adsorbente.

b) Capacidad de adsorción de Proteínas.

100 miligramos del adsorbente previamente equilibrados con buffer 0.005 M pH 7.0.

Con intervalos de 15 minutos se añadieron de 0.2 ml en 0.2 ml de solución al 25% de albumina hasta completar 1 ml ( o sea 250 mg totales de albumina.)

La concentración final de albumina fué de 2 mg por mililitro Se agitó durante dos horas y al sobrenadante se le determinaron proteínas residuales empleando el método de Biuret (22).

c) Preparación de Carboximetil Celulosa

A 100 gs de celulosa tamizada por malla número 200 se le añadieron, lentamente y con agitación 400 ml de solución al 40% de NaOH. La agitación se prolongó hasta formar una masa homogénea.

La masa se enfrió en baño de hielo durante una hora y se agregaron 100 ml de una solución que contenía 50g de ácido monocloroacético. La adición se hizo poco a poco y con agitación.

La pasta formada se calentó durante 30 minutos a 70°C a Baño María.

El producto obtenido, de color amarillo, se enfrió en baño de hielo durante una hora. Se añadieron posteriormente porciones de ácido acético al 10% hasta completar 800 ml del ácido.

A la suspensión, todavía alcalina, se le agregaron tres litros de agua, se dejó sedimentar tres horas y se volvió a decantar.

Esta operación se repitió hasta eliminar todo color en el sobrenadante.

Al sólido obtenido se le añadió nuevamente ácido acético al 10% hasta obtener ligera acidez. Se agregaron dos litros más de agua y se comprobó con papel indicador la acidez, cuyo pH fué de 2.6.

La suspensión se filtró por filtro buchner con ayuda de vacío. Se hicieron a continuación lavados al material con agua destilada hasta eliminar la acidez. Comprobada la neutralidad del sólido se le añadieron tres porciones de 200 ml de etanol y la succión se prolongó por tres horas. El material seco se volvió a tamizar por malla del número 200, guardándose el polvo obtenido en frascos secos.

d) Modificaciones en la Síntesis de Carboximetil Celulosa

1.-) El empleo de 25 g. de ácido monocloroacético en la síntesis de 1 lote No. 2 de CM Celulosa a partir de 100 g de celulosa tamizada por malla número 200.

2.-) Se preparó el lote No. 3 en el que se usó 100g de ácido monocloroacético y 100 g de celulosa tamizada por malla número 200.

Excluyendo estas 2 modificaciones el método de preparación de ambos lotes fué semejante al descrito anteriormente.

A los tres lotes de carboximetil celulosa obtenidos se les hicieron diferentes pruebas, para comparar nuestros resultados con los datos reportados por otros autores (12).

a) Determinación de Grupos Ácidos.

Un gramo del adsorbente se suspendió en 10 ml de agua destilada y se le agregaron con pipeta 10 ml de solución 1 Normal de NaOH.

Se tituló el exceso de sosa con solución 1 normal de ácido clorhídrico usando S.R.I. de rojo de fenol como indicador.

Los resultados se expresaron en gramos por ciento de grupos ácidos o bien en miliequivalentes de grupos ácidos por gramo del adsorbente.

b) Capacidad de Adsorción

100 mg del adsorbente que previamente se equilibraron con buffer fosfatos 0.0175 M pH 6.3 se suspendieron en un vaso de precipitados con buffer fosfatos 0.0175M pH 6.3.

Luego se añadieron a intervalos de 15 minutos de 0.2 ml en 0.2ml de solución de albumina al 25%, hasta completar 1 ml .

En la mezcla se obtuvo una concentración final de albumina de 2 mg por mililitro. Se agitó la suspensión durante dos horas y del sobrenadante se determinaron las proteínas residuales no adsorbidas por la carboximetil celulosa.

### III.- Fraccionamientos de plasma y purificaciones de fracciones del plasma.

Los fraccionamientos se llevaron a cabo con el empleo de los adsorbentes sintetizados. Los resultados obtenidos en los diferentes experimentos se graficaron para después hacer un análisis comparativo con los resultados reportados por otros autores.

#### EXPERIMENTO I.)

Fraccionamiento de Suero Humano Normal con DEAE Celulosa tamizada por malla del número 200.

A 20 ml de suero de un individuo normal se le determinaron cloruros como cloruro de sodio por el método de Schales y Schales (24) y proteínas totales por el método de Biuret. (22)

Como se requiere una concentración inicial baja de cloruros en el suero para llevar a cabo un buen fraccionamiento se procedió a dializar la muestra contra dos litros de buffer pH 7.0 0.005M durante 24 horas a 4°C. el suero dializado se centrifugó para eliminar un ligero precipitado formado.

Del suero con 1.50g de proteínas totales se tomó el volumen correspondiente a 1.0 gramo de proteína y se llevó a 20 ml con

con buffer fosfatos 0.005M pH 7.0.

Por otra parte se pesaron 20g de Dietilaminoetil Celulosa tamizada por malla del número 200 y se suspendieron en buffer pH 7.0 0.005M. Equilibrado el adsorbente se montó la columna, y se agregó con cuidado la muestra. Se dejó adsorber la muestra en la trama del intercambiador y de inmediato se añadieron 72 ml del buffer eluyente 0.005M pH 7.0. Se dejó eluir este primer buffer recogiendo fracciones de 12 ml cada una. Posteriormente se agregaron 60 ml de buffer fosfatos 0.0175M pH 6.3 y se recogieron también fracciones de 12 ml cada una. La elución se llevó a cabo a una velocidad constante de 1 ml por minuto. Para mantener el goteo a esta velocidad se aplicó 0.1 Kg/cm<sup>2</sup> de presión.

Bajo el mismo sistema de elución se hicieron pasar por la columna 60 ml de cada uno de los siguientes buffers: buffer fosfatos 0.04M pH 5.9; buffer fosfatos 0.1M pH 5.8 buffer fosfatos 0.4M pH 5.2 y buffer fosfatos 0.4M pH 4.4 recogiendo 12 ml en cada fracción.

Con objeto de impedir la desnaturalización de las proteínas el fraccionamiento se llevó a cabo a 4°C.

Se recogieron en total 31 fracciones de 12 ml que se con-

servaron a 4°C. Cada una de las fracciones se leyó en el espectrofotómetro a 280 mμ; la lectura se hizo a una dilución 1:2 con solución salina. El blanco empleado fué también de solución salina.

Con las lecturas obtenidas se elaboró la gráfica No. 1 y a las fracciones con mayor concentración de proteínas se les hizo inmunoelectroforesis para su identificación.

#### EXPERIMENTO II

Fraccionamiento de Suero Humano Normal con DEAE Celulosa tamizada por malla del número 200.

A 20 ml de suero humano se le determinaron cloruros y proteínas por los métodos ya conocidos.

El suero se dializó durante 24 horas a 4°C contra 2 litros de buffer pH 7.0 0.005M y después de la diálisis se centrifugó el ligero precipitado, formado durante la diálisis. De la muestra centrifugada se tomó el volumen correspondiente a 1.0g de muestra y se llevó a 20 ml con buffer fosfatos pH 7.0 0.005M.

El fraccionamiento se llevó a cabo con el empleo de 20g de



diecilaminoetil celulosa tamizada por malla 200 y previamente equilibrada con el buffer antes citado. Montada la columna del adsorbente se agregó con cuidado la muestra y se dejó adsorber. Una vez hecho esto se eluyó con las siguientes soluciones amortiguadoras:

72 ml de Buffer Fosfatos	pH 7.0	0.005M
60 ml de " " "	6.3	0.0175M
60 " " "	5.9	0.04M
60 " " "	5.8	0.1M
60 " " "	5.2	0.4M
60 " " "	4.4	0.4M

Se recogieron 31 fracciones de 12 ml; la velocidad de elución, a diferencia del experimento anterior fué de 2 ml por minuto y para ello se aplicó aire a una presión máxima de 0.3 kg/cm<sup>2</sup>.

El fraccionamiento se llevó a cabo a temperatura de 4°C. Las fracciones recogidas se leyeron en el espectrofotómetro a 280 mu a una dilución de 1:2 y se elaboró la curva correspondiente (gráfica 2). A las fracciones con mayor concentración de proteínas se les hizo inmunolectroforesis para su identificación.

#### EXPERIMENTO III.

Fraccionamiento de suero humano normal con DEAE Celulosa tamizada por malla número 200.

A 20 ml de suero humano se le determinaron proteínas (22) y cloruros (24). La muestra se dializó durante 24 horas y a 4°C con 2 litros de buffer fosfatos pH 7.0 0.005M. Eliminando el precipitado que apareció después de la diálisis se tomó el volumen equivalente a 1.0g de proteínas totales y se completó a 20 ml con el mismo buffer.

Por otro lado se pesaron 10g del adsorbente y se equilibraron con buffer fosfatos 0.005M pH 7.0.

En este experimento la relación adsorbente-proteínas fué de 10 gramos del adsorbente por gramo de proteínas por fraccionar.

Montada la columna con el adsorbente se procedió el fraccionamiento a 4°C, empleando las mismas soluciones amortiguadoras eluyentes y en la misma cantidad.

Se recogieron en total 31 fracciones; la velocidad de elución fué de 1 ml por minuto. Cada una de las fracciones se leyó en el espectrofotómetro a 280 m $\mu$  y con los datos obtenidos se elaboró la gráfica No. 3. Las lecturas fueron hechas con solución salina a una dilución de 1:2. A las fracciones con mayor concentración en proteínas se les hizo una inmunoelectroforesis, para identificar el tipo de fracción sérica aislada.

#### EXPERIMENTO IV.

Fraccionamiento de suero humano normal con DEAE Celulosa tamizada por malla no. 200.

El volumen correspondiente a 0.5g de proteínas totales de un suero humano normal, previamente dializado y centrifugado se completó a 20 ml con buffer 0.005M pH 7.0.

La muestra se fraccionó en una columna con 20g de Dietilaminoetil celulosa equilibrada con el mismo buffer. En este caso la relación adsorbente-proteínas fué de 40g de DEAE Celulosa por gramo de proteínas.

El fraccionamiento se llevó a cabo empleando las mismas soluciones eluyentes y el mismo volumen de ellas. Se recogieron en total 31 fracciones de 12 ml cada una que se leyeron en el espectrofotómetro a 280 m $\mu$  empleando una dilución 1:1. Se graficó con los resultados obtenidos la curva correspondiente (gráfica 4) y a las fracciones con mayor cantidad de proteínas se les hizo inmunoelectroforesis para su identificación.

#### EXPERIMENTO V.

Fraccionamiento de suero humano normal con DEAE Celulosa tamizada por malla número 100.

A 20ml de suero humano normal, previamente controlados, se

dializó con el mismo buffer pH 7.0

0.005M.

Por otro lado se pesaron y equilibraron con buffer fosfatos 0.005M pH 7.0 20g de dietilaminoetil Celulosa tamizada por malla 100. Este adsorbente, a diferencia de los experimentos anteriores se preparó a partir de celulosa tamizada por malla 100. Se montó la columna y se procedió al fraccionamiento en la misma forma. Se obtuvieron en total 31 fracciones y la velocidad de elución fué de 1 ml/min.

Cada fracción se leyó a 280 m $\mu$  en el espectrofotómetro, en dilución 1:2 y se graficó la curva correspondiente (gráfica 5). Las fracciones con mayor cantidad de proteínas se sometieron a inmunoelectroforesis para su identificación.

#### EXPERIMENTO VI.

Purificación de la fracción II de Cohn con DEAE Celulosa tamizada por malla número 200.

A 20g de precipitado de la fracción II de Cohn (1,2) en su mayor parte gamma globulina y previa electroforesis (26) se disolvieron en 50 ml de buffer 0.005M pH 7.0. A la solución se le determinó proteínas por el método de Biuret y cloruros por la técnica de Schales y Schales.

Como los cloruros quedaron dentro de los límites para llevar a cabo el fraccionamiento no fué necesario efectuar una diálisis.

De la solución se tomaron 14 ml (1.0g de proteínas) y se llevaron a 20 ml con buffer 0.005M pH 7.0.

Por otra parte se pesaron 20g de DEAE Celulosa, tamizada por malla número 200, se equilibraron con buffer fosfatos pH 7.0 0.005M y se montó la columna siguiendo la técnica descrita con anterioridad. Se añadió a la columna los 20 ml de la solución por purificar y se dejó adsorber.

El sistema de eluyentes empleado fué el propuesto por E.C. Adams (22) utilizando 50 ml de cada una de las soluciones amortiguadoras. Estas soluciones son las mismas que se emplearon en los experimentos anteriores. La elución se llevó a cabo recogiendo fracciones de 10 ml de eluido a una velocidad de 1 ml por minuto.

Las fracciones recogidas, en total 30, se leyeron a 280 m $\mu$  en el espectrofotómetro, elaborando con los resultados obtenidos en la gráfica No. 6. A todas las fracciones se les hizo inmunoelectroforesis, separando todas aquellas que presen-

taron gamma globulina pura. Estas fracciones se reunieron se liofilizaron (28) y se les determinó proteínas totales por el método de Biuret. Después se calculó el rendimiento obtenido en el fraccionamiento.

Esta experiencia se repitió en dos ocasiones más siguiendo el mismo procedimiento con el objeto de tener un rendimiento promedio de las purificaciones.

#### EXPERIMENTO VII

Purificación con DEAE Celulosa tamizada por malla 200 de la fracción V de Cohn.

A una muestra de precipitado de la fracción V de Cohn (1,2) se le hizo electroforesis (26), 25 g de ese precipitado, albúmina en su mayor parte, se disolvieron en 50 ml de buffer fosfatos 0.005M pH 7.0. A la solución se le determinaron proteínas por el método de Biuret y cloruros por el método de Schales y Schales. Como no fue necesario efectuar diálisis se tomaron de la solución 11.5 ml (1g de proteínas) y se llevó a 20 ml con buffer fosfatos pH 7.0 0.005M.

Por otro lado se pesaron 20g de DEAE Celulosa y se suspendieron en buffer fosfatos pH 7.0 0.005M. Equilibrado el ad-

adsorbente se montó la columna, se añadió la solución y se procedió luego a su elución.

La elución se llevó a cabo empleando 50 ml de cada una de las soluciones amortiguadores, citadas por Adams (22). Se recogieron en total 30 fracciones de 10 ml cada una a una velocidad de 1 ml/min.

Se leyeron en el espectrofotómetro a 280 m $\mu$ , elaborando con los datos obtenidos una curva, (grafica 6) . A todas las fracciones se les hizo inmunolectroforesis y las que presentaron albumina pura se reunieron, se liofilizaron (28) y se les hizo una determinación total de proteínas. Con estos datos se calculó el rendimiento en el fraccionamiento.

El experimento se repitió en dos ocasiones más para luego sacar un rendimiento total en tres distintas purificaciones.

#### EXPERIMENTO VIII

Separación de Gamma Globulina de un extracto Placentario empleando Dietilaminoetil Celulosa y purificación de la misma utilizando Carboximetil Celulosa.

20 ml de extracto placentario se dializaron durante 24 hrs.

contra buffer 0.005M pH 7.0 fosfatos. Cuando los cloruros bajaron a un nivel adecuado (0.01g%) se sacó de diálisis y se hizo determinación de proteínas, por el método de Biuret.

Así mismo, se preparó una columna de DEAE Celulosa tamizada por malla número 200, en la que se pesaron 34.2 del adsorbente y se equilibraron con buffer fosfatos pH 7.0 0.005M. En este caso la relación adsorbente-proteínas fue de 100g del adsorbente por gramo de proteínas.

La elución se hizo empleando buffer fosfatos pH 7.0 0.005M. Se recogieron en total 10 fracciones de 20 ml cada una, que se leyeron en el espectrofotómetro a 280 m $\mu$ . Con los datos de las lecturas se elaboró la gráfica 7.

A las fracciones además se les hizo inmunolectroforesis, y aquellas en las que apareció gamma globulina se reunieron y se liofilizaron (28). El residuo obtenido se recuperó agregando 15 ml de buffer 0.2M fosfatos-cloruros pH 7.6 y se le hizo una determinación total de proteínas con objeto de preparar la columna de Carboximetil Celulosa. La relación proteína-adsorbente fué de 10 mg de proteínas por gramo del adsorbente.

El adsorbente se equilibró previamente con buffer fosfatos



cloruros con buffer pH 7.6 0.2M y una vez montada la columna se hizo la elución recogiendo fracciones de 10 ml.

Cada una de las fracciones en total 10, se leyó en el espectrofotómetro a 280 mμ y se elaboró la curva correspondiente (gráfica 7.)

A todas las fracciones se les hizo inmunolectroforesis y las que presentaron gamma globulina pura se reunieron, se liofilizaron (28) y se les determinaron proteínas totales.

De esta manera, al relacionar el peso inicial de extracto placentario con la cantidad total de gamma globulina pura se calculó el rendimiento en la purificación.

## R E S U L T A D O S

### I.- Molido de la Celulosa de Bagazo de Caña.

El proceso de molido de la celulosa de bagazo de caña previamente secada dió resultados satisfactorios. Se obtuvo un polvo que fué fácilmente tamizable.

Se hicieron otros intentos de molido empleando un molino de bolas, el molido se hizo en seco y en forma húmeda. Se obtuvieron residuos muy gruesos que presentaron dificultades al tamizarse.

La pureza de la celulosa obtenida fué satisfactoria, además los lavados con ácido y alcalí tuvieron por objeto eliminar cualquier impureza.

El color que presentó la celulosa de caña fué de un blanco comparable a la celulosa de algodón y más blanco que el que presenta la celulosa de madera.

Se prepararon 2 lotes de celulosa. El lote 1 de 200g tamizada por malla del número 100 y el lote 2 de 600 g tamizado por malla del número 200.

## II.- Síntesis de Dietilaminoetil Celulosa

Se prepararon 4 lotes de Dietilaminoetil Celulosa. Los resultados se expresan en el Cuadro I.

C U A D R O 1

Lote	1	2	3	4
g <sub>s</sub> Celulosa	100	100	100	100
Tamiz malla no.	200	200	200	200
gramos de 2 Clorotri <sub>e</sub> tilamina	80	40	160	80
Grupos Ionizables	0.76	0.49	0.79	0.67
Capacidad adsorción mg. prot/g Ad.	33	26	38	29
Rendimiento gramos	60	65	58	65

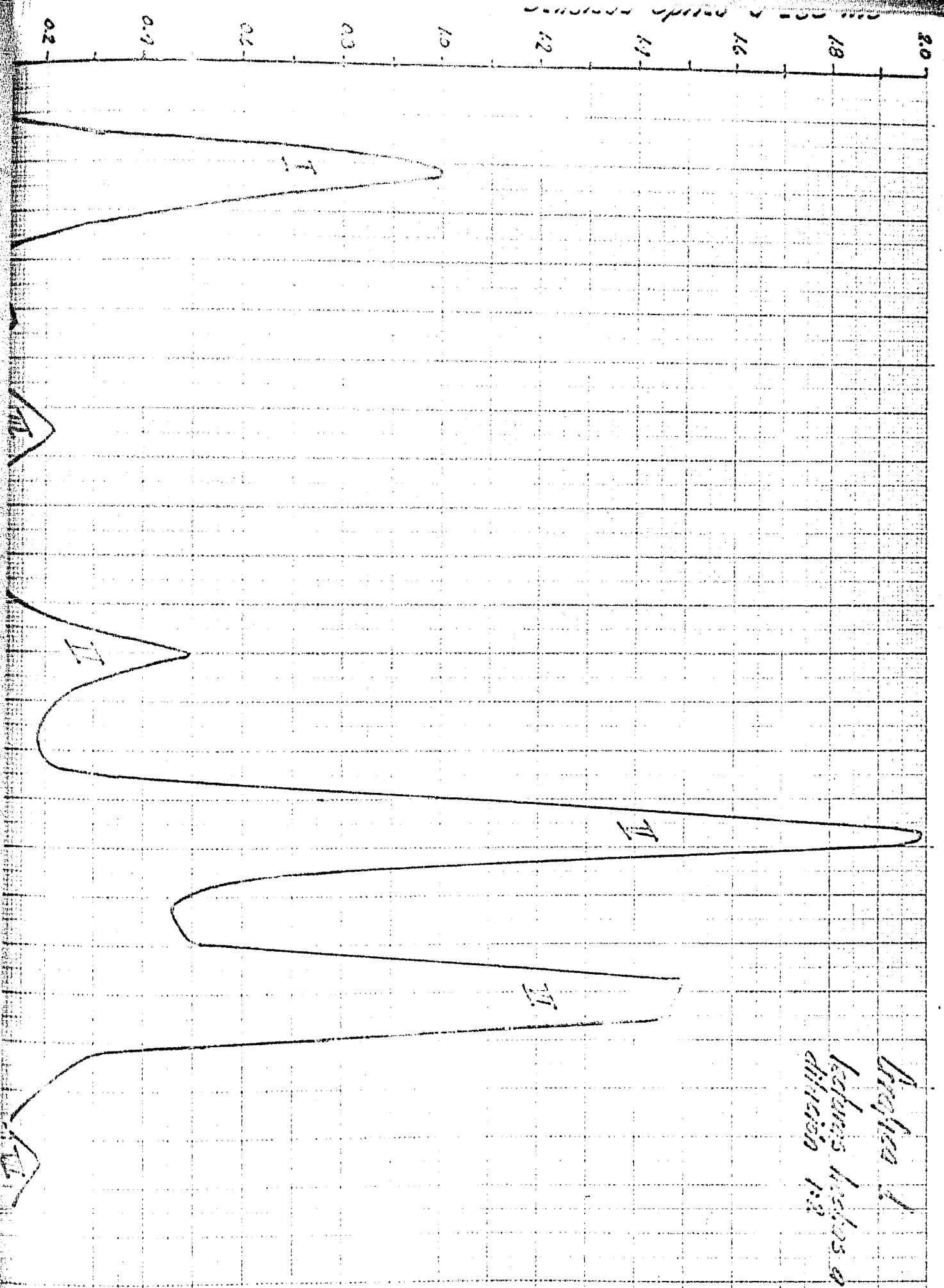
### III.- Preparación de Carboximetil Celulosa

Se sintetizaron 3 lotes de Carboximetil Celulosa. Los resultados obtenidos se anotaron en el Cuadro 2.

CUADRO 2.

Lote	1	2	3
gms Celulosa	100	100	100
gms. Nalla No.	200	200	200
gramos de Ácido mono-cloroacético	50	25	100
Grupos Ionizables mg/g	0.64	0.39	0.58
Capacidad de Adsorción mg prot/g ad.	49	22	54
Rendimiento Gramos	59	52	68

Graph 1  
Leaves of *Leaves of*  
diffusion rate



#### IV.- Fraccionamiento de Plasmas y purificaciones de fracciones del plasma.

##### EXPERIMENTO I.

Fraccionamiento de Suero Humano Normal con DEAE Celulosa tamizada por malla número 100.

El precipitado que se formó durante la diálisis del suero se centrifugó. Se identificó por inmunoelectroforesis, como una mezcla de alfa, beta y gamma globulinas (5).

En la gráfica i se muestra el fraccionamiento durante la cromatografía y se marcan con números los picos que aparecieron y que corresponden a diferentes fracciones proteicas.

Con el buffer fosfatos 0.005M y pH 7.0 se recogieron 6 fracciones. En la gráfica se muestra el pico 1 que por inmunoelectroforesis se identificó como una fracción correspondiente a gamma globulina.

Del buffer fosfatos 0.0125M y pH 6.3 se obtuvieron 5 fracciones en donde aparecieron dos pequeños picos II y III. Estas fracciones resultaron ser también gamma globulina; la identificación se hizo mediante inmunoelectroforesis. Esta fracción se asemeja a la fracción reportada por Humphrey y Porter como reaginus (29).

Cinco fracciones más se recogieron con el buffer fosfatos 0.04M y pH 5.9. En la gráfica se obtuvo un pico IV y corresponde a la fracción de las beta globulinas.

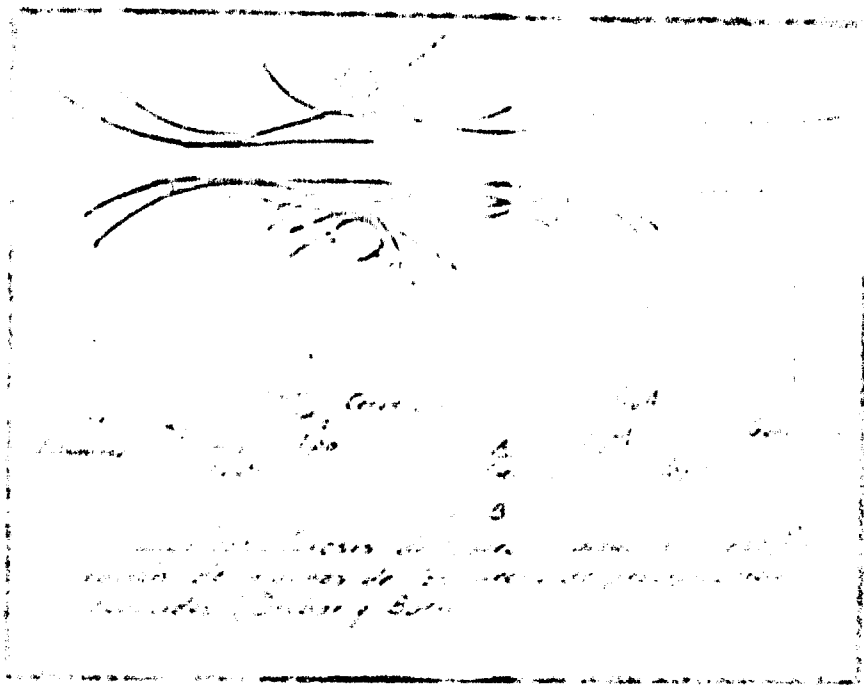
Con el buffer 0.01M pH 5.8 se recogieron 5 fracciones y con la gráfica apareció un pico V identificado por inmunoelectroforesis como albumina con huellas de beta y alfa globulina.

Del buffer fosfatos 0.04M pH 5.2 emergieron 5 fracciones; se obtuvo un pico VI que fué identificado como albumina mezclada con alfa globulina.

Con el buffer fosfatos 0.04M pH 4.4 se obtuvieron 5 fracciones y dieron un pico VII identificado como alfa globulina.

La superficie de los picos graficados no es representativo de la cantidad de proteínas existentes, ya que las lecturas hechas a 280 mu. absorben más el triptofano y la tirosina (22), que son aminoácidos más abundantes en las gammas globulinas que en albuminas.

Es de interés hacer notar que desde el comienzo del fraccionamiento aparecieron a lo largo de la columna bandas coloridas que emergieron a distinta velocidad y cuya identidad fué ya re-



	A. ...	B. ...
	C. ...	D. ...
	E. ...	F. ...
	G. ...	H. ...
	I. ...	J. ...
<p>... ..</p> <p>... ..</p>		



portada por distintos autores.

Inicialmente, al eluir con buffer fosfatos 0.005M pH 7.0 aparecieron en la parte superior de la columna diferentes bandas, una superior de color azul, luego una banda amarilla, seguida por una banda café y por último una banda roja.

La primera banda en emerger fué la banda roja, eluida por el buffer fosfatos 0.04M pH 5.9. Los componentes que se obtuvieron al emerger esta banda corresponde a una beta globulina descrita por Schade y Caroline (30) y que se le dió el nombre de siderofilina o transferina.

Al eluirse con el buffer fosfatos 0.1M pH 5.8 emergió primero una pequeña banda café cuyos componentes fueron identificados por Rosenfeld y Surgenor (31) como metalbumina, compuesto subnormal que aparece por hemólisis excesiva.

Inmediatamente después emergió con el mismo buffer y con el buffer fosfatos 0.4M pH 5.2 una banda amarilla muy extensa que ocupó más de la mitad de la columna del adsorbente y que correspondió a albuminas.

La última banda en emerger fué una banda azulosa; por inmunoelectroforesis corresponden a Alfa Globulina, reportadas por

por C. G. Holmberg como un componente con propiedades semejantes a las atribuidas a la ceruloplasmina.

#### EXPERIMENTO II.

Fraccionamiento de Suero Humano Normal con DEAE Celulosa tamizada por malla del número 200.

En la gráfica número 2 se muestra el fraccionamiento del suero. Las condiciones llevadas durante esta cromatografía no cambiaron con respecto al experimento anterior, solo que la velocidad de elución fué de 2 ml por minuto.

Con el buffer pH 7.0 0.005M se eluyeron las primeras 6 fracciones. En la gráfica se obtuvo un pico I que corresponde a gamma globulina.

Con el buffer pH. 6.3 0.0175M se recogieron 5 fracciones y apareció un solo pico II identificado por inmunolectroforesis como gamma globulina (29).

Con el buffer 0.04M pH 5.9 se recogieron tambien 5 fracciones y se graficaron 2 picos III y IV que por inmunolectroforesis resultaron ser beta globulinas.

La elución con buffer 0.1M pH 5.8 manifestó 2 picos V y VI y ambos correspondieron a una mezcla de albumina con beta globulinas.

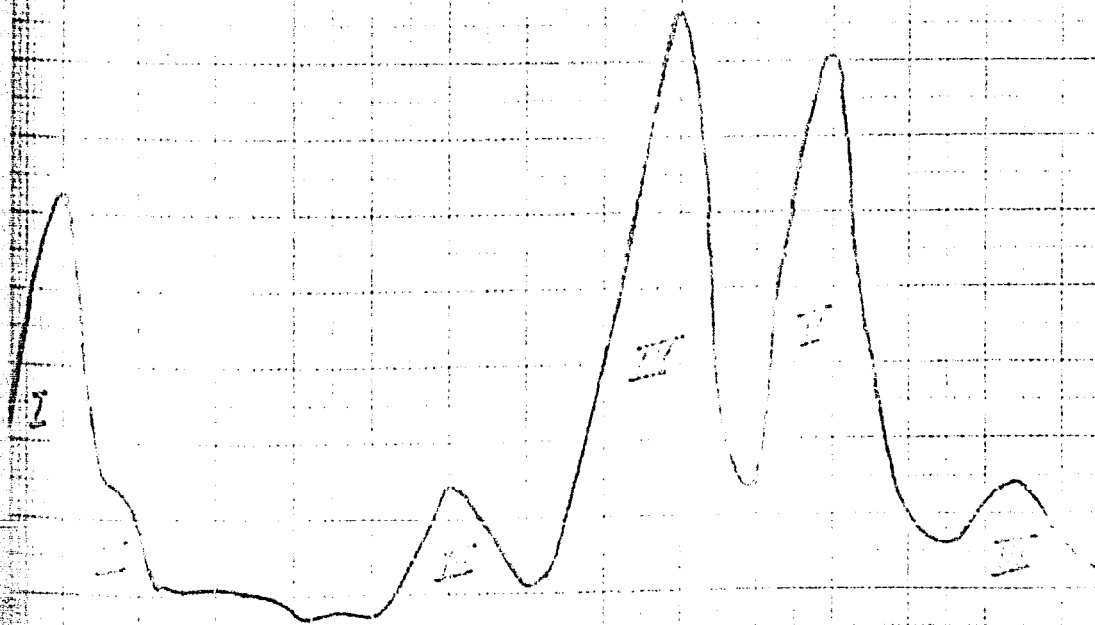
*Gráfico 2*

*lecturas hechas a dist.  
con 1:2*



*Gráfico 3*

*lecturas hechas a dist. con 1:2*



Con el buffer 0.4M 5.2 se obtuvo otro pico VII que fué identificado por inmunoelectroforesis como mezcla de albumina y alfa globulinas.

La elución con el buffer 0.4M pH 4.4 dió dió en la gráfica un pico VIII muy ligero que resultó ser alfa globulinas.

Las bandas coloridas emergieron en el mismo orden que en el experimento anterior solo que la banda café que corresponde a metalbumina no pudo detectarse.

### EXPERIMENTO III.

Fraccionamiento de Suero Humano Normal con DEAE Celulosa tamizada por malla número 200.

En la gráfica 3 se señala el fraccionamiento del suero.

Con el buffer fosfatos 0.005M pH 7.0 se recogieron 6 fracciones, en la gráfica apareció el pico I que corresponde a ser gamma globulina.

Con el buffer fosfatos pH 6.3 0.0175M se recogieron 5 fracciones en donde apareció un pico II que también fué identificado por inmunoelectroforesis como gamma globulina.

Un pico III apareció al eluir con el buffer fosfatos pH 5.9 0.04M; las proteínas existentes fueron identificadas como beta globulinas.

Otras cinco fracciones se recolectaron al eluir con buffer fosfatos 0.1M pH 5.8. En la gráfica se señala un pico IV cuyas proteínas resultaron ser una mezcla de albuminas con beta y alfa globulina.

Con el buffer fosfatos 0.4M pH 5.2 se recogieron 5 fracciones en donde apareció un pico V que fué identificado por inmunoelectroforesis como mezcla de albumina y alfa globulinas.

Con el ultimo buffer se recogieron otras 5 fracciones y apareció un ligero pico con huellas de alfa globulinas.

Las bandas coloridas tambien aparecieron durante la elución solo que la banda café no pudo ser detectada.

#### EXPERIMENTO IV

Fraccionamiento de Suero Humano Normal con DEAE Celulosa tamizada por malla número 200.

En la gráfica 4 aparece la separación del suero llevada a cabo empleando el adsorbente a razón de 40 veces su peso por gramo de proteína.

De la elución con el primer buffer se recolectaron 6 fracciones y en la gráfica se obtuvo un pico I que se identificó como gamma globulina.

Con el buffer pH 6.3 0.0175M se recogieron 5 fracciones y en la gráfica aparecieron los picos I I y III; ambos identificados como gamma globulina (29).

En la elución con el buffer fosfatos pH 5.9 0.04M se encontró un pico IV cuyas proteínas resultaron ser, por inmunoelectroforesis, del tipo de las beta globulinas.

Con el siguiente buffer eluyente se recogieron 5 fracciones y apareció en la gráfica un pico V y cuyas proteínas resultaron ser solamente albumina.

Con el buffer fosfatos 0.4M pH 5.2 se obtuvo un pico VI y fué identificado por inmunoelectroforesis como alfa globulinas con huellas de albumina.

Con el último buffer eluyente se obtuvo un ligero pico que por inmunoelectroforesis no pudo ser identificado. Las proteínas eluidas en estas 5 últimas fracciones parecen ser proteínas desnaturalizadas (22).

Gráfico 4  
lecturas hechas a dil 1:1

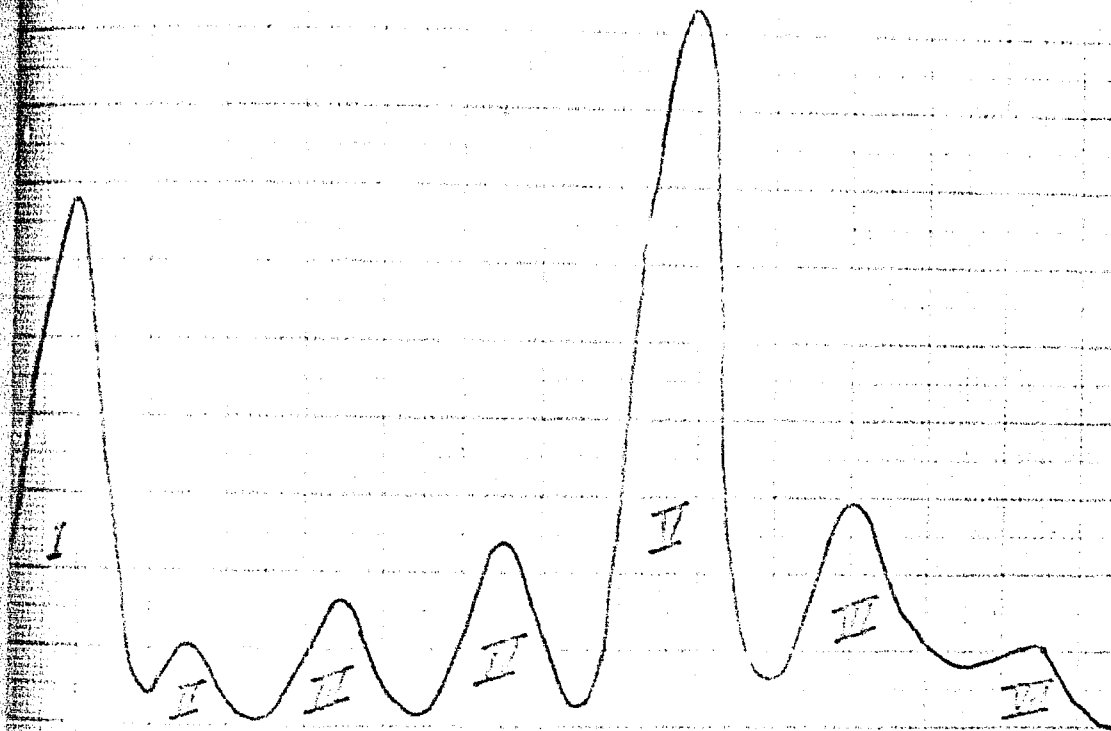
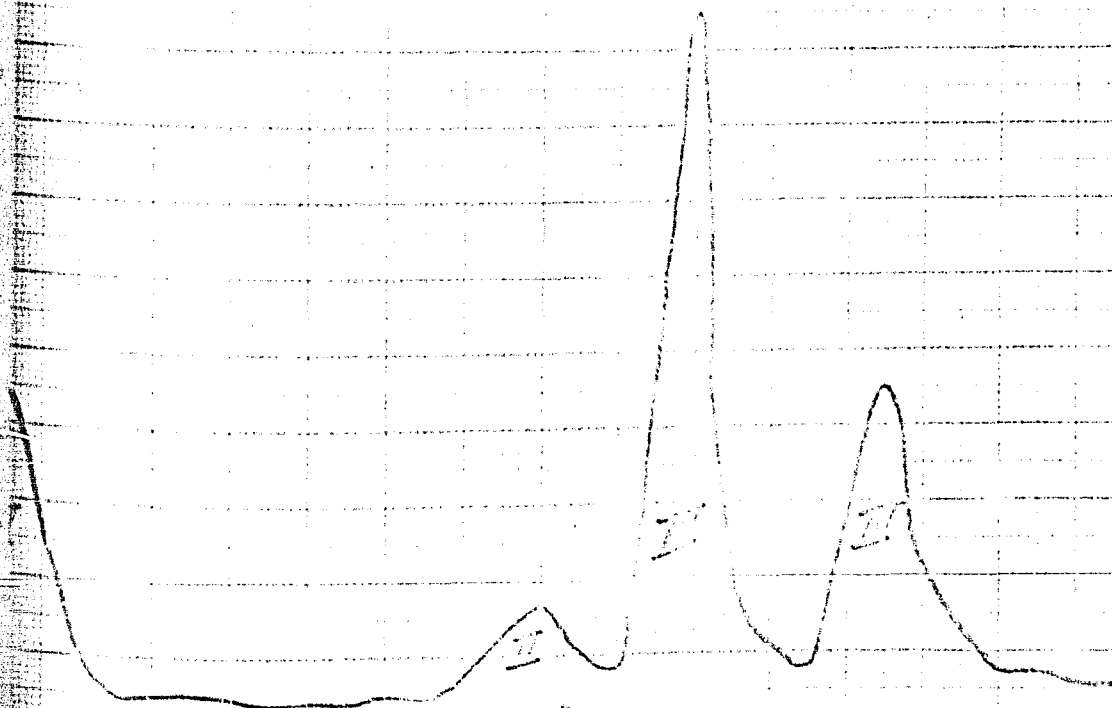


Gráfico 5  
lecturas hechas a dil 1:2



Durante el fraccionamiento se fueron eluyendo las distintas bandas coloridas. La primera banda en emerger fué la roja cuyos componentes fueron identificados como siderofilina (30). Emergió luego una banda café correspondiente a metaalbumina (31).

Posteriormente emergió una banda amarilla que ocupó la totalidad de la columna. Las proteínas fueron identificadas como albuminas. Por último emergió una banda azulosa con proteínas del tipo de la ceruloplasmina.

#### EXPERIMENTO V.

Fraccionamiento de Suero Humano Normal con DEAE Celulosa tamizada por malla número 100.

En la gráfica 5 representa el fraccionamiento llevado a cabo con el suero.

Las condiciones llevadas durante el fraccionamiento fueron similares a las del experimento I. Solo se modificó el tipo de adsorbente, ya que se utilizó DEAE Celulosa tamizada por malla número 100.

Con el primer buffer se recogieron 6 fracciones y se obtuvo un solo pico I identificado por inmunoelectroforesis como gamma globulina.



Con el buffer fosfatos 0.0175M pH 6.3 se recogieron 5 fracciones y no apareció en la gráfica ningún pico.

Con la elución hecha con el buffer pH 5.9 0.4M se recolectaron 5 fracciones y en la gráfica apareció un solo pico II identificado por inmunolectroforesis como beta globulina.

Con el buffer 0.1M pH 5.8 apareció en la gráfica un pico III identificado por inmunolectroforesis como albumina con huellas de beta globulinas.

Con el siguiente buffer eluyente se recogieron 5 fracciones que resultaron ser una mezcla de albumina y alfa globulinas.

Con el buffer pH 4.4 0.4M se recogieron 5 fracciones y no se graficó ningún pico característico.

Las bandas coloridas emergieron en el mismo orden que en los experimentos anteriores, solamente que no se pudo apreciar ni la banda café ni la banda azul, con proteínas del tipo de la ceruloplasmina.

#### EXPERIMENTO VI.

Purificación de la Fracción II de Cohn con DEAE Celulosa tamizada por malla número 200.

La electroforesis previa efectuada a esta fracción dió los siguientes resultados:

1.- Gamma Globulina	92.2%
2.- Alfa Globulina	huellas
3.- Beta Globulina	7.8%
4.- Albumina	huellas

En la gráfica 6 se muestra la curva de la cromatografía de esta fracción de Cohn. Las fracciones recogidas fueron de 10 ml y la velocidad de elución fué de 1 ml/min.

Con el buffer pH 7.0 0.005M se recogieron 5 fracciones que por inmunolectroforesis se identificaron como gamma globulina.

Con el buffer pH 6.3 0.0175M se obtuvieron 2 picos II y III que fueron identificados por inmunolectroforesis como gamma globulina.

Con el buffer pH 5.9 0.04M se graficó un pequeño pico IV, cuyas proteínas fueron identificadas como beta globulinas.

Con el buffer pH 5.8 0.1M se graficó un pequeño pico V, mezcla de beta y alfa globulina.

En la elución hecha con los dos buffers siguientes no se obtuvo ningún pico característico.

Las fracciones con gamma globulina pura, que fueron las primeras diez se reunieron y se liofilizaron. La electroforesis efectuada dió un 100% de pureza de gamma globulina: la inmunolectroforesis da también gamma globulina pura.

A la porción liofilizada se le determinaron proteínas encontrándose un total de 0.52g : el rendimiento del fraccionamiento con respecto a gamma globulina fué del 34.8%.

El experimento se repitió en dos ocasiones más, encontrándose los siguientes rendimientos:

$$R_2 = 29.3\%$$

$$R_3 = 32.9\%$$

#### EXPERIMENTO VII.

Purificación de la fracción V de Cohn con DEAE Celulosa malla número 200.

La electroforesis hecha a esta fracción dió los siguientes resultados:

- |                    |       |
|--------------------|-------|
| 1.- Albúmina       | 91.8% |
| 2.- Beta Globulina | 2.9%  |
| 3.- Alfa Globulina | 5.3%  |

En la gráfica 6 se muestra la curva de la separación de la

fracción V de Cohn.

El fraccionamiento se llevó a cabo recogiendo 5 fracciones de cada solución eluyente a una velocidad de elución de 1 ml/min.

Cada fracción recogida fué de 1 ml.

Con los buffers pH 7.0 0.005M y pH 6.3 0.0175M no apareció ninguna fracción proteica. Con el buffer pH 5.9 0.04M emergió un pico I que fué identificado por inmunolectroforesis como beta globulina.

Con el buffer siguiente emergió un pico II con albumina pura y con el buffer pH 5.2 0.4M emergió otro pico III con albumina en su mayor parte y con restos de la alfa globulina.

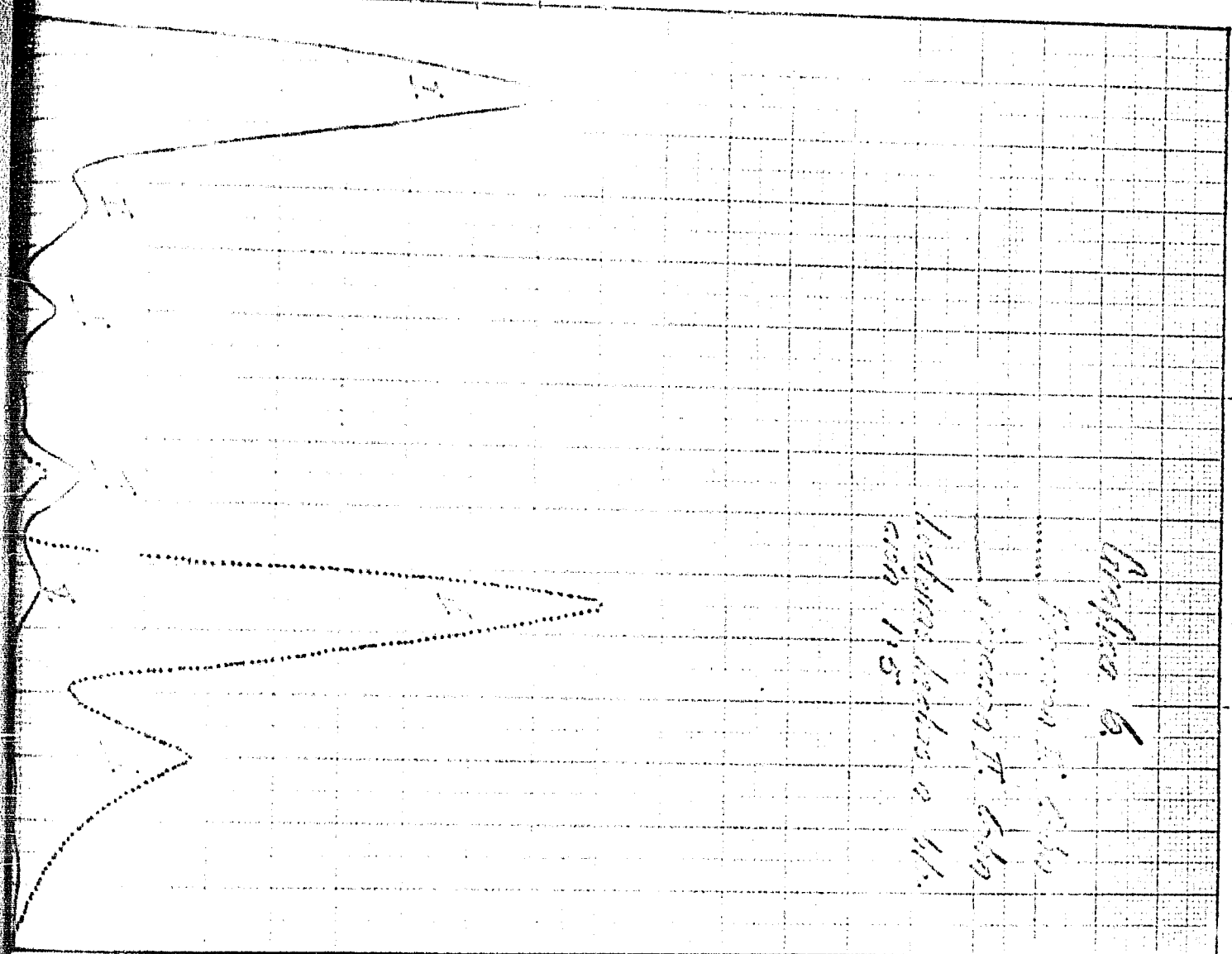
Las fracciones con albumina pura, de la 17 a la 22 se reunieron y se liofilizaron. Se encontraron proteínas totales 0.26g.; la electroforesis mostró albumina en un 100% y la inmunolectroforesis reflejó albumina pura.

El rendimiento de este fraccionamiento fué del 28.3% con respecto a albumina. El experimento se repitió en dos ocasiones más, encontrándose los siguientes rendimientos:

$R_2 = 21.3\%$

$R_3 = 27.4\%$

0.2  
0.3  
0.4  
0.5  
0.6  
0.7  
0.8



Gráfica 6.

.....  
-----  
Gráfica 6  
Lecturas hechas a 11.  
000 115

Gráfica 7.

.....  
-----  
Gráfica 7  
Lecturas hechas a  
11.000 115

## EXPERIMENTO VIII

Separación de Gamma Globulina de un extracto placentario empleando DEAE Celulosa y purificación de la misma utilizando CM Celulosa.

Las proteínas totales de los 20 ml de extracto placentario fueron de 1.83g y los cloruros cuanteados fueron de 0.6g%. Después de llevarse a cabo la diálisis las proteínas totales fueron 1.71g y los cloruros quedaron en 0.018g%.

La elución se llevó a cabo empleando 200 ml de buffer fosfatos pH 7.0 0.005M y se recogieron diez fracciones de 20 ml cada una. La gráfica 7 nos señala la curva en este primer fraccionamiento.

A cada una de las fracciones recogidas se le hizo inmuno-electroforesis y todas ellas correspondieron a gamma globulina. Las primeras tres fracciones se mostraron huellas de ninguna otra fracción. Desde la fracción 4 a la fracción 10 aparecen restos de beta globulinas, y dichas fracciones mostraron un color rojizo.

Las fracciones 1-3 (A) y 4-10 (B) se liofilizaron por separado y se les determinó proteínas totales. Las proteínas totales de la fracción A fueron de 0.27g y las de la fracción B de 0.150g.

La fracción B se disolvió en 10 ml de buffer 0.2M y pH 7.6 y se fraccionó utilizando 15 g de carboximetil celulosa. Se eluyó con 100 ml de buffer fosfatos cloruro de sodio 0.2M y pH 7.6 y se recogieron fracciones de 10 ml cada una.

En la misma gráfica se muestra la curva obtenida. Por inmunolectroforesis se identificaron todas las fracciones como gamma globulina pura. Las proteínas totales cuanteadas en este segundo fraccionamiento fueron de 0.042 mg. El total de gamma globulina pura obtenido fué de 0.069 g y el rendimiento calculado para el fraccionamiento fué del 4.03%.

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

El creciente interés en el campo de la bioquímica por el desarrollo de nuevos métodos para la separación de proteínas permitieron el desarrollo y aplicación de los adsorbentes intercambiadores de iones.

Estos adsorbentes, descritos y preparados originalmente por Sober y Peterson (12) utilizan como soporte, la celulosa a la cual, por halogenación se le introducen radicales iónicos capaces de formar enlaces con los grupos iónicos de las proteínas.

La celulosa de donde partieron los autores (12) proviene de madera o de algodón. El producto final obtenido es costoso y no se consigue fácilmente. Nosotros, deseando fabricar en México estos productos para la purificación y separación de distintas fracciones del plasma, iniciamos la búsqueda de las materias primas para la fabricación de dos adsorbentes intercambiadores de iones, la dietilaminoetil celulosa y la carboximetil celulosa.

Se encontró que la celulosa del bagazo de caña, como materia prima es sumamente barata, que su pureza es alta y que el costo del producto terminado es mucho muy inferior a la de los adsorbentes de importación. Además, en esta forma, se le da al bagazo de caña una nueva aplicación.



Una vez preparados varios lotes de adsorbentes se llevó a cabo un análisis comparativo con aquellos adsorbentes sintetizados por Sober y Peterson. Se tomó como base el número de grupos ionizables y insertados al soporte y a la capacidad de adsorción de los productos preparados. En estos adsorbentes se requiere una capacidad de adsorción alta que va en relación al número de grupos ionizables capaces de formar enlaces iónicos con las sustancias por separar.

En el cuadro 1 del capítulo anterior se pueden apreciar en forma gráfica los resultados obtenidos en las distintas preparaciones de dietilaminoetil celulosa.

Los grupos ionizables de los lotes sintetizados varían de 0.49 a 0.79 meq g ( promedio 0.67 meq g) y su capacidad de adsorción oscila entre 26 y 38 ( promedio 32 ).

Los autores reportan haber sintetizado lotes de DEAE Celulosa cuyos grupos ionizables varían de 0.10 a 1.34 meq g ( promedio 0.90 meq g ), y sus capacidades de adsorción van de 5 a 122 ( promedio 50 ). Como se puede apreciar los lotes del DEAE Celulosa sintetizados por nosotros presentan características satisfactorias. Tomando en cuenta nuestras limitaciones de equipo,

Aunque en promedio la reactividad de los adsorbentes preparados a partir de celulosa de madera es mayor a la reactividad de los adsorbentes preparados a partir de celulosa de caña los resultados obtenidos son buenos tomando en cuenta que tienen una mayor reactividad a la de adsorbentes preparados con celulosa de algodón (12) cuya capacidad de adsorción es muy baja.

En el cuadro 2 aparecen los resultados obtenidos en la preparación de tres distintos lotes de carboximetil celulosa.

Los grupos ionizables de la CM Celulosa varían entre 0.39 y 0.64 meq g (promedio 0.57 meq g ) presentaron una capacidad de adsorción entre 22 y 94. Comparando los resultados obtenidos con los reportados por Sober Peterson (12) en donde emplearon tanta celulosa de madera como de algodón, se deduce que la reactividad de nuestro adsorbente es inferior a lo esperado. Los autores reportaron una capacidad de adsorción promedio de 98 para los lotes preparados con celulosa de algodón y 99 para los lotes preparados a partir de celulosa de madera.

Los grupos ionizables presentaron un promedio de 0.94 meq g. Por lo tanto, el lote 3 preparado por nosotros fué el único con reactividad satisfactoria.

Los fraccionamientos realizados en este trabajo nos proporcionaron datos que van de acuerdo con los reportes de los distintos autores ( 9,15,17,21).

Sober, en los distintos fraccionamientos lleva dos a cabo logró la separación de las proteínas del plasma (21).

Nosotros separamos fracciones puras de gamma globulina y beta globulinas; las albuminas separadas contuvieron huellas de alfa y beta globulinas en casi todos los fraccionamientos.

En el experimento IV se logró separar en forma pura la albúmina, ya que en este experimento la cantidad de adsorbente empleado fué mayor que en los demás experimentos.

En los distintos experimentos efectuados se cambiaron en una forma u otra algunos factores del método original para establecer su importancia. Así podemos asentar que la relación adsorbente-proteínas tiene importancia, ya que entre mayor sea esta relación se obtiene un mejor fraccionamiento.

La velocidad de elución también es factor importante, ya que a mayor flujo de elución la separación de las fracciones es menos específica. Así lo demuestra la comparación realizada en

los experimentos I y II de este trabajo.

El tamaño de las partículas de la celulosa produce adsor\_ bentes con distintas características. En el cuadro I del ca\_ pítulo anterior se aprecia que el lote 4 tiene menor reactivi\_ dad que el lote I, ambos preparados en las mismas condiciones, pero con celulosas con distinto tamaño de partículas. Experi\_ mentalmente se comprobó que con la celulosa del lote 4 no se logró una separación adecuada, como la lograda en el experimen\_ to I.

Como los resultados obtenidos por nosotros muestran datos muy satisfactorios en las purificaciones de las fracciones de Cohn, II y V surge la posibilidad de emplear la dietilaminoe\_ til celulosa en escala industrial para purificar tanto la gamma globulina como la albumina producida en el laboratorio donde se realizó la tesis, con posibilidad de separar posteriormen\_ te otras fracciones.

El empleo de la CM Celulosa no presentó interés para nuestro trabajo. Con este adsorbente se logró separar gamma globulina pura, pero mostró ventajas sobre la Dama Celulosa. Sober en sus reportes lo utilizó para subfraccionamiento, entre otras

Sober en sus reportes lo utilizó entre otras cosas para sub\_ fraccionamiento de gamma globulina y concluye satisfactorios resultados (21).

Un dato interesante fué el hecho de que todas las fracciones del plasma recogidas se eluyeron con soluciones amortiguadoras cuyos pH se acercan a los puntos isoelectricos de las proteínas separadas. La gamma globulina g2 cuyo p.i. es de 7.3 (32) se eluyó a un pH de 7.0. Las proteínas consideradas como reagentes y asociados a gamma globulinas g1, (18,)(29) cuyo p.i. es de 5.8 (32) se eluyeron aún a pH 6.3.

Las fracciones de Beta globulinas se eluyeron a pH 5.9 y a su p.i. es de 5.8. (32) . A este mismo pH se eluyó también un compuesto colorido, lasiderofilina o transferina, también con\_ siderada beta globulina. Las alfas globulinas emergieron a pH 5.2 y a su p.i. es de 5.4 (32). con el buffer pH 5.2 y con el bu\_ ffer pH 4.4 se eluyeron las albuminas cuyo p.i. promedio es de 4.7 (32). La ceruloplasmina, componete colorido asociado a A2 globulinas (5) se eluyó a pH 4.4 y su p.i. es de 4.4 (32).

Este fenómeno es el resultado de una neutralización de las cargas de las proteínas; éstas sin cargas con las cuales forman

por otros iones y arrastradas por el eluyente.

En resumen, la síntesis de la DEAE Celulosa con bagazo de caña fué satisfactoria. Este adsorbente presenta grandes perspectivas tanto en el terreno industrial como en el campo de la investigación. Por elección de los sistemas eluyentes adecuados se puede separar casi cualquier fracción proteica que se desee (5,21).

En la actualidad la DEAE Celulosa cuenta con numerosas aplicaciones prácticas en la purificación de fracciones proteicas.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.) E. J. Cohn F.R.S., Gurd, D.H. Surgenor  
J. Am. Chem. Soc. 72: 465-474 (1950)
- 2.) E. J. Cohn W. Hughes, L. E. Strong  
J. Am. Chem. Soc. 68: 459-475 (1946)
- 3.) Y. Derrien  
Biochim. Biophys. Acta 8: 631 (1952)
- 4.) Tiselius, Porath y Albertsson  
Science 141: 13-20 (1963)
- 5.) Sober, Gutter, Wyckoff y Peterson  
J. Am. Chem. Soc. 78: 756-763 (1956)
- 6.) C. A. Zittle  
Advances in Enzymology 14: 349 (1953)
- 7.) Prins H.K. y Hulsmann T.H.J.  
Nature 175: 903 (1955)
- 8.) Li, C. H.  
Fed. Proc. 16: 775 (1954)
- 9.) Sakota, S. J.  
Biochem. J. 42: 649 (1955)
- 10.) Roman H. C.  
Nature 173: 447 (1954)
- 11.) Boardman y Portridge  
Biochem. J. 59: 543 (1955)
- 12.) E. A. Peterson y H. A. Sober  
J. Am. Chem. Soc. 78: 751-756 (1956)
- 13.) S. Ellis y H. S. Simpson  
J. Biol. Chem. 220: 939 (1956)
- 14.) Fahey J. L. McCoy P.E. y Goulian M.  
J. Clin. Invest. 37: 272 (1958)

- 15.) R. J. Speer, Norton, Prager, Kelley by Hill  
J. Lab. and Clin. Med. 693:693 (1959)
- 16.) J. T. Scouris, R. W. Storey, R.W. Wolfe y G.R. Andersen  
Transfusion 6: 144-149 (1966)
- 17.) John L. Fahoy y A. P. Horberr  
J. of Biol. Chem. 234: 2645-2651 (1959)
- 18.) The Plasma Proteins  
F. W. Putman- editor  
Voll,  
Academic Press, 1960
- 19.) Ion Exchange Resins  
R. Kunin y R. J. Myers  
John Wiley & Sons - editores  
3 ed. (1952)
- 20.) Stachelin, Peterson and Sober  
Arch. Biochem Biophys 85: 289 (1959)
- 21.) H. A. Sober y E. A. Peterson  
Fed. Proc. 17: 1116-1126 (1958)
- 22.) Serum Proteins and the Dysproteinemias  
F. W. Sunderman - editor  
Cap. 17  
L. B. Lippincott Co, (1964)
- 23.) Serum Proteins and the Dyproteinemias  
F. W. Sunderman- editor  
Cap. 8  
L. B. Lippincott Co. (1964)
- 24.) Métodos de Laboratorio  
J. A. Kolmer, E. Spaulding y H. W. Robinson  
Editorial Interamericana (1955)



- 14.) Chromatographic and Electrophoretic Techniques  
Ivor Smith - editor  
Vol. I  
2a. edición (1960)
- 15.) Chromatographic and Electrophoretic Techniques  
Ivor Smith - editor  
Vol. II  
2a. edición (1960)
- 16.) Graber, P. and Williams, C. A.  
Biochim. and Biophys. Acta 10:193 (1953)
- 17.) Louis Rey  
Traité de Lyophilisation  
German editor  
Paris, (1960)
- 18.) Humphrey J. H. y Porter H. H.  
Lancet 1: 196-197 (1957)
- 19.) A. L. Schade y L. Carolina  
Science 104: 340 (1946)
- 20.) H. Rosenfeld y D. M. Sargenor  
J. Biol. Chem. 183: 663 (1950)
- 21.) The Proteins  
H. Neurath - editor  
Vol. III,  
N. Y. (1965)