

Els pròtids del xerigot estudiats per electroforesi

pels Professors A. ORIOL i J. PINOL

ESTUDIANT el complex proteic de la sang, sota el punt de vista físico-químic, hem trobat un seguit de dades que assajarem d'ordenar per tal de poder explicar la dinàmica d'aquests elements.

Es curiós notar que gairebé tots els autors que s'entretenen a estudiar el complex proteic de la sang o del xerigot ho fan sota el punt de vista químic. En aquest sentit hom fa mesures quantitatives de globulines, d'albúmines, de mixoglobulines, etc. Altres autors cerquen de treure suc de coeficients més o menys complicats, com per exemple —per citar el més corrent—la relació de globulines a albúmines segons l'equació ben coneguda $\frac{\text{glob.}}{\text{album.}} = i$. Més enllà d'aquestes recerques, només hi ha la significació que cada autor els atribueix, de vegades sota el punt de vista diagnòstic i d'altres sota el punt de vista pronòstic.

Seguint un ordre purament històric, trobem a mitjans del segle passat els treballs de Panum (1), el qual per mitjà d'insolubilitzacions fraccionades arriba a precisar els dos grans grups dels pròtids del xerigot que han d'esdevenir clàssics durant molts d'anys. Albúmines i globulines. Aquelles restaven en solució, aquestes precipitaven del medi acidificat, i per això foren anomenades serocaseines.

Onze anys més tard Alex. Schmidt (2) bateja el grup de Panum amb els noms esmerçats encara avui, troba nous matisos de la seva precipitabilitat, però continua aferrat als mateixos procediments físics.

Als quinze anys cabals, Hoppe-Seyler Th. Weyl (3) afermen les conclusions anteriors de Panum i la teoria queda en peu.

A les acaballes del segle passat es recalca una vegada més aquest punt de vista de classificació degut a què Hofmeister (4) per una banda i Halliburton (5) per altra precisen mètodes de fraccionament que amb lleugeres diferències de forma mantenen doctrinalment intacte el concepte de Panum.

A començaments d'aquest segle, Hammarsten (6) pensa fer una crítica severa dels treballs de fraccionament portats a cap amb els pròtids del xerigot, però, després de depurar rigorosament l'abast que pot tenir una senzilla solubilitat per a classificar aquests pròtids, preconitza un procediment de precipitació segons concentracions salines diferents $[\text{SO}_4 (\text{N H}_4)_2]$ que al capdavall condueix a la mateixa conclusió. Els pròtids del xerigot poden resumir-se en dos grups: globulines i albúmines.

S'afina encara més el treball de solubilitats i de precipitacions fraccionades en funció de concentracions salines diverses i en mans de M. Emil (7), Fuld-Spiro (8) i W. Seng (9) s'arriba a precisar dues globulines també diferents per recursos de precipitabilitat salina, la pseudoglobulina i l'euglobulina.

Fem notar que Halliburton ja havia precisat tres fraccions proteiques fent coagulacions fraccionades en funció de la temperatura, i que més endavant Maximowites (10) retroba aquestes fraccions utilitzant com a estri de treball els esdeveniments ocorreguts durant el curs de la cristallització. Oppenheimer (11) segueix aquests estudis que han de portar Roberston (12) a la conclusió que hi ha també dues albúmines, una cristallitzable i una altra amorfa. I en arribar ací tenim ja dues fraccions principals, Globulines i Albúmines, subdividides cada una d'elles en altres dues fraccions. Les globulines en pseudoglobulines i euglobulines. Les albúmines en cristallines i amorfes.

A partir d'aquest moment s'inicia una dura crítica que comença amb l'anàlisi química centesimal d'aquestes fraccions i acaba per concloure en boca de Goldschmidt i Kahn (13) per una banda i Groh i Faltin (14) per una altra que les tals fraccions són totalment arbitràries, car reuneixen complexos de composició química ben diferent, segons les concentracions dels elements precipitants.

El mateix Söerensen (15) que havia reexit en l'obtenció de l'albúmina de l'ou en forma cristallina, admet l'existència, en el xerigot, d'euglobulines i pseudoglobulines que no arriba a obtenir de forma cristallina. Troba la influència que té per a aquestes fraccions la concentració total de pròtid tal com ja havien dit Hardy (16) i Chick (17) i finalment indica la possibilitat que una fracció insoluble doni lloc a una altra que sigui soluble tal com anys enrera havia previst Melanby (18).

Els estudis de The Svedberg (19) sobre ultracentrifugació i pes molecular, compliquen la simplicitat d'aquelles quatre fraccions proteiques i hom arriba a concloure que es tracta de sistemes complexos

que mostrarien propietats de grup, més bé per la seva condició col·loïdal que per tractar-se d'una entitat química. Es així com Ostwald (20) interpreta els resultats de solubilitat obtinguts semblantment amb altres col·loïdes no proteics segons llur intensitat d'agregació.

Nosaltres hem volgut conèixer la dinàmica d'aquests pròtids de la sang, i amb aquesta finalitat hem portat a cap les següents experiències.

Seguint de molt a prop la tècnica de Vlès, hem extret de l'animal 10 c. c. de sang i l'hem deixat aplevar per tal d'eliminar els pròtids generadors de la fibrina. Després de molts assaigs hem arribat a estandaritzar la proporció de 4 c. c. de xerigot diluïts en aigua fisiològica fins a obtenir 120 c. c. de solució.

Hem repartit aquests 120 c. c. en 6 parts iguals i els hem portat potenciomètricament a pH distints, variant gradualment de 4 fins a 10.

Així mateix hem fet amb l'aigua fisiològica que hem tingut cura de portar-la successivament als mateixos pH.

Hem muntat els tubs de cataforesi segons model de Vlès (31), hem deixat que al seu través (una sèrie de 6 tubs) hi passés durant 4 hores un corrent continu, de 150 volts de f. e. m. i d'una intensitat a l'entorn de 2 miliampers.

Així hem cercat la polarització de les micelles col·loïdals dels pròtids del xerigot, d'acord amb la seva carga elèctrica manifestada enfront de cada pH.

Els resultats d'aquestes experiències seran publicats íntegrament per un de nosaltres (21) en reunir aquest problema amb el de la significació que pot tenir el pH i com a terreny «físico-químic» de l'organisme viu, i com a exponent diagnòstic i terapèutic d'algunes malalties.

Aquí ens interessa anotar tres fets que ens semblen d'importància per ajudar a escatir la dinàmica dels pròtids del xerigot i la seva significació biològica.

- 1.^a Inversió de signe de la càrrega micellar proteica.
- 2.^a Dissociació elèctrica dels pròtids del xerigot.
- 3.^a Formació de complexos físico-químics amb els pròtids dissociats.

1.^a *Inversió de signe de la càrrega micellar proteica*

Si ens atenim a les nocions clàssiques que prevalen sobre la físico-química dels pròtids, és evident que aquests per la seva condició d'ésser amfolits poden comportar-se igualment com a col·loïdes positius que com a col·loïdes negatius. Però, ben entès que aquesta càrrega elèctrica estarà sempre en funció de la concentració de H^+ ions del

medi. Les primeres observacions d'Hardy (22) fetes en aquest sentit i portades a cap amb ovoalbúmina ja deien ben clar que si en el curs de l'electroforesi posàvem les partícules de l'albúmina desnaturalitzada dintre d'una solució neutra les micelles no anaven ni cap a l'ànode ni cap al càtode; dintre d'una solució àcida anaven cap al càtode i en solució alcalina es dirigien cap a l'ànode.

Experiències posteriors de Kopackzewski (23), Höber (24), Pauli (25), Loeb (26) i Bechold (27) deixen tan ben precís el concepte, que no hi cap el més lleuger dubte. Tothom admet el fet experimental i la seva llegenda doctrinal, que parla de la situació química especial dels pròtids, ens diu que són amfoters per la seva constitució, que podem representar així:



La presència simultània de H i de OH els permet actuar com a anions o com a cations, segons que el medi sigui ric en substàncies alcalines o àcides respectivament.

Degut al seu amfolitisme hom diu que davant d'un àcid el pròtid es comporta com un àlcali i davant d'un àlcali representa el paper d'un àcid. En l'escala dels pH hi haurà un moment que no es comportarà ni com a àcid ni àlcali. Heus ací el seu punt isoelèctric (pHi).

Aquestes nocions clàssiques ens diuen per tant que:

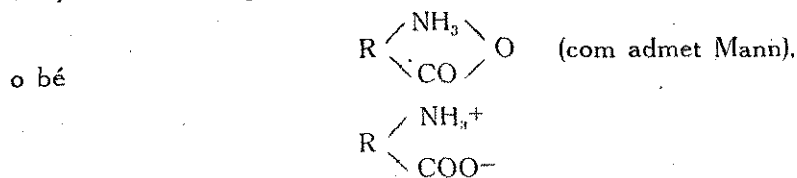
A grans concentracions d'hidrogenions, el pròtid situat en el tub cataforètic es desplaçarà cap al pol negatiu car es comporta com un cation (R H^+).

Per contra, davant de grans concentracions d'hidroxilions el desplaçament es verificarà cap al pol positiu, car la seva disposició és com la d'un anion (ROH^-) puix que es desplaça cap a l'ànode.

Aquesta teoria s'ajusta estrictament als resultats pràctics obtinguts. Nosaltres mateixos en tenim bonics exemplars.

La teoria clàssica encara va més enllà.

Hom parla d'un punt isoelèctric dels pròtids que coincidiria amb el moment en què aquests no han d'actuar ni com a àcids ni com a àlcalis. En aquest moment tenim el ion hermafrodita (*) que tindria una d'aquestes dues disposicions:



(*) «Zwitterion» del alemany.

I a tal punt l'experimentació ha estat generosa en resultats que s'ha pogut calcular teòricament el punt isoelèctric d'un pròtid i veure com aquest coincidia amb les experiències realitzades al Laboratori.

Càlcul del punt isoelèctric.—D'acord amb les constants de dissociació K dels cossos elèctrics tindrem per a cada pròtid dues constants. Una per la valència àcida que serà :

$$K_a = \frac{(\text{ROH})^- (\text{H}^+)}{(\text{HROH})} \quad (\text{I})$$

i una altra per la bàsica que serà igualment :

$$K_b = \frac{(\text{HR})^+ (\text{OH})^-}{(\text{HROH})} \quad (\text{II})$$

Si d'aquestes fórmules en treiem l'expressió logarítmica tindrem respectivament :

$$\log. (\text{ROH})^- + \log. (\text{H})^+ - \log. (\text{HROH}) = \log. K_a \quad (\text{III})$$

de la primera, i

$$\log. [\text{RH}]^+ + \log. [\text{OH}]^- - \log. [\text{H}-\text{R}-\text{OH}] = \log. K_b \quad (\text{IV})$$

de la segona i per una senzilla transposició tindrem :

$$\log. [\text{ROH}]^- - \log. [\text{HROH}] = -\log. [\text{H}]^+ + \log. K_a \quad (\text{III}')$$

i expressat en valor pH, segons definició d'aquest exponent :

$$\log. [\text{ROH}]^- - \log. [\text{HROH}] = \text{pH} - \text{p} K_a \quad (\text{III}'')$$

i pel que ateny a la fórmula IV tindrem extractament :

$$\log. [\text{RH}]^+ - \log. [\text{H}-\text{R}-\text{OH}] = \text{pOH} - \text{p} K_b \quad (\text{IV}')$$

i restant ordenadament les fórmules III'' i IV' tindrem :

$$\log. \frac{[\text{ROH}]^-}{[\text{RH}]^+} = \text{pH} - \text{pOH} - \text{p} K_a + \text{p} K_b$$

Ara cal que tinguem en compte que tot això esdevé en medi aquós i que per tal l'aigua té una relació de H ions a HO ions expressada per

$$K_{\text{H}_2\text{O}} = \frac{(\text{H}^+) \cdot (\text{OH}^-)}{(\text{H}_2\text{O})} = \frac{(0.0000001) \cdot (0.0000001)}{0.9999999}$$

i admetent que la valor del denominador és pràcticament igual a la unitat, tindrem :

$$K_{\text{H}_2\text{O}} = (\text{H}^+) \cdot (\text{OH}^-) \quad (\text{V})$$

i de les dades experimentals ben conegudes se sap que la valor d'aquesta K_{H_2O} a 18° és igual a $0'000000000000014$ i per tal l'expressió cologarítmica de l'equació V serà :

$$pH + pOH = 14'14$$

Ara bé, en aquest medi aquós hi trobem també aquell element proteic electrolític ; per tant, en el que ateny a l'aigua el pH serà

$$pH = 14.14 - pOH$$

i fent l'addició d'ambdós components tindrem :

$$2 \text{ pH} = pK_a - pK_b + 14.14 - \log. \left(\frac{RH^+}{ROH^-} \right) \quad (VI)$$

i en arribar al punt isoelèctric és evident que per definició $RH^+ = ROH^-$ i per conseqüència

$$pHi = 7.07 - \frac{1}{2} (pK_b - pK_a) \quad (VII)$$

i si passem aquesta expressió cologarítmica a una logarítmica ordinària tindrem :

$$pHi = -\frac{1}{2} \log. (K_a - K_b) = \frac{1}{2} (pK_a + pK_b)$$

Davant de qualsevol exemple pràctic les valors numèriques de K_a i de K_b les trobem directament en les taules de constants.

Si seguim de més a prop Vles (28) i repetim l'exemple pràctic de la glucocola trobarem que per aital substància les taules ens donen una valor de $K_a = 1.8 \cdot 10^{-10}$

$$K_b = 2.8 \cdot 10^{-12}$$

$$pK_a = 9.75$$

$$pK_b = 11.55$$

i substituint valors de les equacions VII i VIII tindrem respectivament :

$$pHi = 7.07 - \frac{1}{2} (11.55 - 9.75) = 7.07 - 0.90 = 6.17$$

per substituir valors en la fórmula VIII cal que traduïm pK_b en pH , car les taules ens donen la valor en pOH , per tant caldrà simplement desplaçar en aquest sentit

$$p'K_b = 14.14 - pK_b = 14.14 - 11.55 = 2.59$$

per tant

$$pHi = \frac{9.75 + 2.59}{2} = 6.17$$

La pràctica corrobora, en efecte, que el punt isoelèctric de la glicocola es troba a 6.17

En el mateix sentit, però, amb força més complicació, Vles (29) arriba a calcular teòricament el punt isoelèctric d'un amfolit polivalent i encara hem de reconèixer que hi ha una forta convergència entre els seus càlculs matemàtics i els resultats experimentals. La fórmula general d'aplicació és

$$\text{pHi} = \frac{1}{2} (\sum t_m \text{pHi} - \sum m' \text{pkm})$$

on s equival al nombre total de valències lliures (no enganxades al complex) e)

t el nombre de molècules que entren al complex,

m el nombre de valències total (àcides i alcalines),

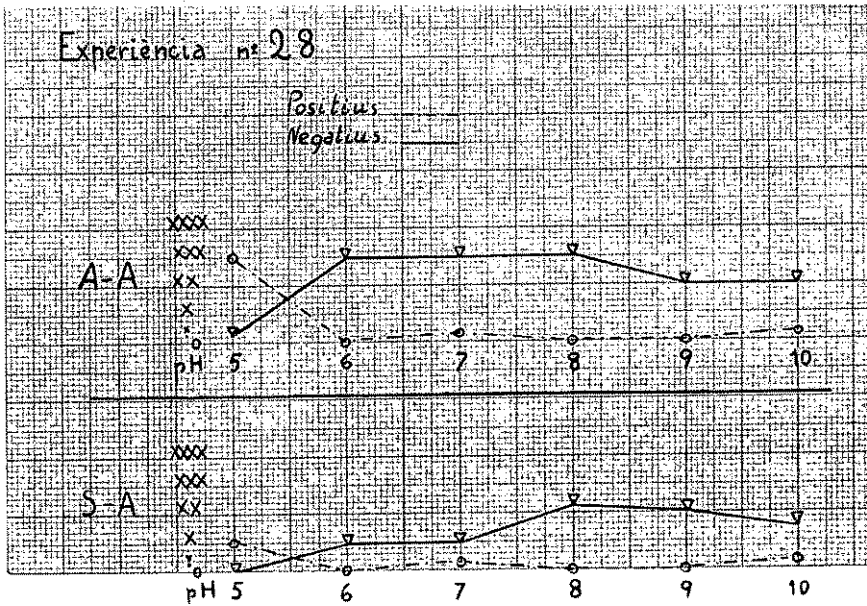
m' el nombre de valències d'un sol constituent.

Després d'una tan afinada complexitat, cal que afegim el nostre primer fet d'ordre experimental.

Els pròtids de la sang sovint ens han manifestat una ostensible contradicció d'aquests fets, en el sentit d'haver-se invertit la seva càrrega micellar.

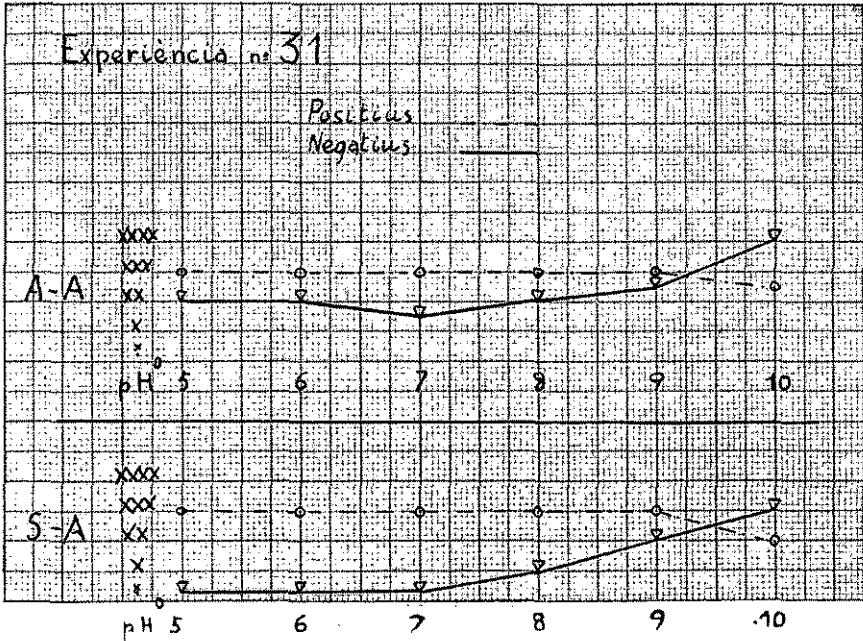
De tot el que acabem de dir se'n pot desprendre: primer, que els pròtids es comporten com a col·loides negatius a pH alts i com a col·loides amb càrrega micellar positiva a pH baixos. Després de les dades matemàtiques que acabem de mostrar, constatades sempre pels resultats experimentals, no es pot dubtar de la seva autenticitat. S'arriba—hem vist—àdhuc a precisar numèricament el pHi. Doncs, si nosaltres trobem una i deu vegades una inversió total de la càrrega micellar proteica en el xerigot, hem d'admetre honestament que aquests pròtids no es troben pas senzillament disposats a manera de complexos d'amino-àcids que responen com si fossin amfolits polivalents. La micella col·loidal del xerigot ha d'ésser més complexa. Els fenòmens d'absorció hi han de jugar un fort paper. Qui sap si en la mateixa estructura hi hem d'endevinar una comparsa lipídica que donava lloc a l'estructura micellar lipoproteica que admet Sandor (30) amb arguments experimentals que no són desaprofitables.

Vegem algun exemple de les nostres experiències:



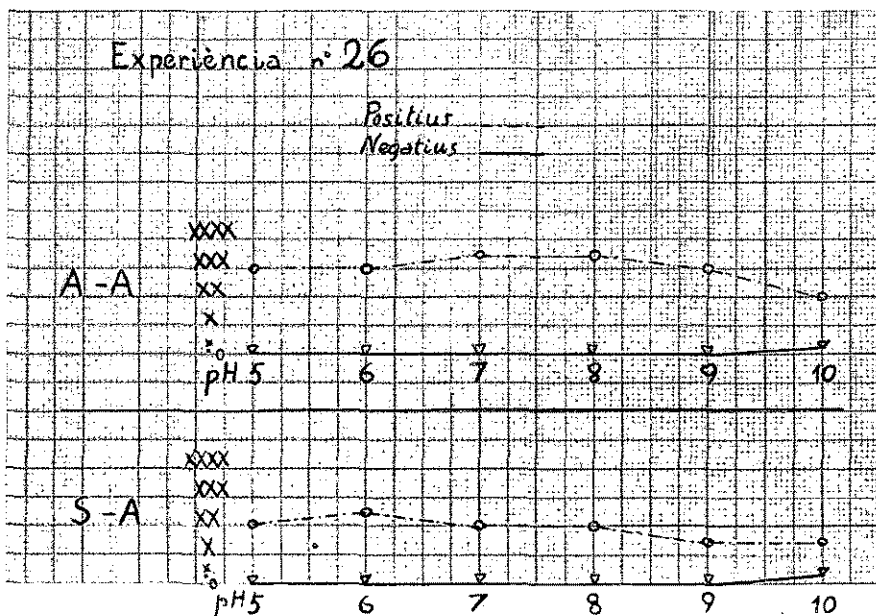
Experiència n.º 28

Solucions pH	5 ∧ + -	6 ∧ + -	7 ∧ + -	8 ∧ + -	9 ∧ + -	10 ∧ + -
Potencial, en Volts						
Alcohol-Acetona	x . x x	o x x x	. x x x	o x x x	o x x	. x x
Sulfat Amònic	x o x	o x x	. x x	o x x .	o x x	. x x



Experiència n.º 31

Solucions pH	5	6	7	8	9	10
	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -
Potencial, en Volts						
Alcohol-Acetona	x x x x x	x x x x x	x x x x x	x x x x x	x x x x x x	x x x x x x x
Sulfat Amònic	x . x x	x . x x	x . x x	x x x x	x x x x x	x x x x x x x



Experiència n.º 26

Solucions pH	5 + -	6 + -	7 + -	8 + -	9 + -	10 + -
Potencial, en Volts						
Alcohol-Acetona	× 0 × ×	× 0 × ×	× 0 × × x	× 0 × × x	× 0 × ×	× 0 ×
Sulfat Amònic	× 0 ×	× 0 × x	× 0 ×	× 0 ×	× 0 x	× 0 x



Aquesta darrera no sols es manifesta negativa a pH baixos, ans encara sorprèn el fet que no s'hi trobi cap punt isoelèctric en tot l'espai que va de pH 4 fins a pH 10.

Volguérem repetir l'experiència per tal de portar el xerigot a pH més desplaçats i no ens fou possible perquè el malalt havia mort en vint-i-quatre hores en quadre d'hiperglucèmia manifesta.

Cal remarcar encara, que «in vitro» hem lograt aquesta inversió operant amb pols d'albumina d'ou redissolta i afegint-hi una quantitat de colloide d'or protegit.

L'experiència és aquesta :

D'aquí se'n podria deduir en primera aproximació que els pròtids de la sang són agregats de colloidess proteics i no proteics que seria massa senzill d'identificar-los amb grups definits com són les albúmines i les globulines.

2.^a Dissociació elèctrica del pròtids del xerigot.

Hem trobat un segon ordre de fets que ens interessa de remarcar. Sovint esdevé que els pròtids del sèrum de la sang no es polaritzen tots ells en un mateix sentit. Ençà i enllà del punt isoelèctric, trobem les dues branques del tub de cataforesi amb Tyndall positiu.

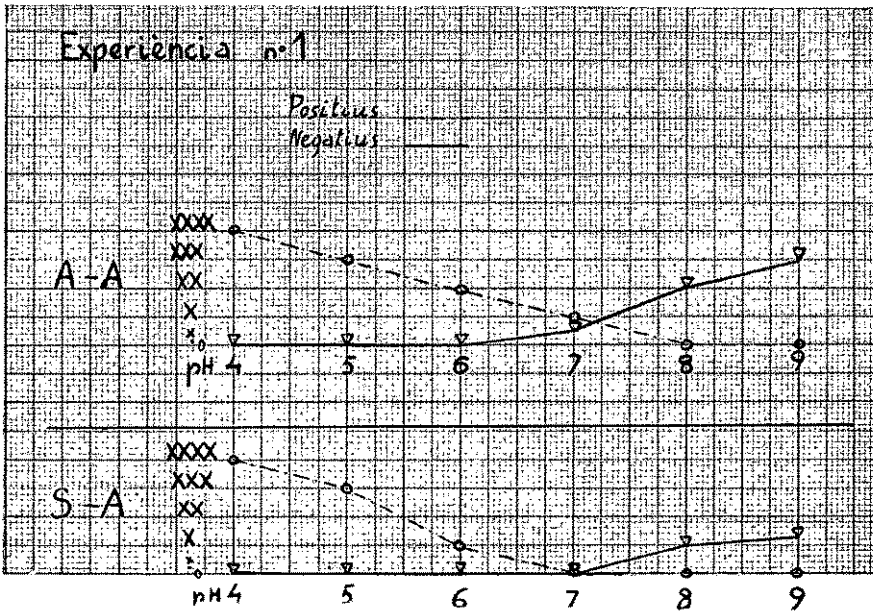
Les reaccions de precipitació fraccionada ens manifesten que a l'una banda hi ha floculats manifestos, en tant que a l'altra no passa d'un enterboliment de la solució. Amb les sals corresponents hom endevina que les albúmines han corregut cap a una banda, en tant que les globulines marxaven en sentit contrari.

Naturalment que ens referim al que normalment s'anomena albúmines i globulines, sense prejutjar que cada una d'aquestes micelles pot ésser un agregat de pròtids i d'altres substàncies, com hem vist en l'apartat anterior.

Aquesta dissociació de la càrrega micellar observada en els pròtids d'una mateixa sang, només es fa notar d'una manera ostensible en una determinada regió del pH.

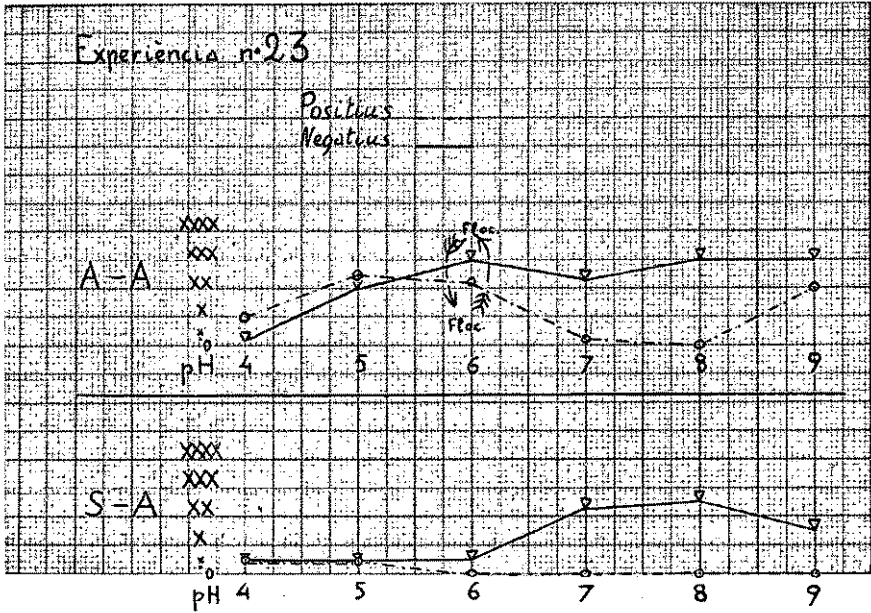
Així, per exemple, en l'experiència número 23 hom pot veure com s'esdevé la inversió manifesta a pH 6. De totes maneres, s'ha de remarcar que en els casos en què això es presenta en tots els tubs de la sèrie hom pot notar una inversió més o menys manifesta.

Tal vegada aquest fet recolza la complicació micellar que hem apuntat en l'apartat número 1, però, almenys, permet preveure manifestament que els pròtids del xerigot són capaços de reunir-se en com-



Experiència n.º 1

Solucions pH	4 + -	5 + -	6 + -	7 + -	8 + -	9 + -
Potencial, en Volts						
Alcohol-Acetona	× 0 × × ×	× 0 × ×	× 0 ×	× x	0 × ×	0 × × ×
Sulfat Amònic	× 0 × × ×	× 0 × ×	× 0	0 0	0 ×	0 × x



Experiència n.º 23

Solucions pH	4	5	6	7	8	9
	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -
Potencial, en Volts						
Alcohol-Acetona	x .	x x x x x	x x x x x x Floc.	. x x	o x x x	x x x x x
Sulfat Amònic	x x	x x	o x	o x x .	o x x x	o x x

binacions físico-químiques, fent complexos d'una major o menor estabilitat.

3.^a *Formació de «complexos» físico-químics amb els pròtids dissociats.*

El professor Vles, de la Universitat d'Estrasbourg, estudia curiosament la barreja de diversos amfolits i n'obté la formació de complexos proteics. Aquests complexos no tindrien més nexa que els lligams físico-químics.

L'exemple més senzill i entenedor el faríem amb dos amfolits monovalents.

Cada un d'ells té un pHi que podem calcular segons les normes donades en el primer apartat. Siguin, per exemple, $pHi=5$ i $pHi=7$, respectivament. En aquesta barreja és molt fàcil d'endevinar que a pH 6, l'un es manifestarà com a anion, en tant que l'altre ho farà com a cation. La seva reunió es fa imminent i per tant el complex resultant serà un agregat de naturalesa físico-química.

Una explicació com aquesta de la complicació proteica és ben elegant. I encara respon als resultats experimentals de l'autor, el qual treballa amb amfolits de fórmula definida.

A nosaltres se'ns feia difícil d'admetre la possibilitat de formació d'aquests complexos en el si de la sang després de les experiències referides en el primer apartat. En efecte, els amfolits no obraven tan netament en alguns casos i això ens feia preveure que la micella del xerigot és d'una complicació que no permet d'ajustar-hi els càlculs matemàtics de l'autor.

Tot amb tot, és evident que la segona conclusió aportada de les nostres experiències ens permet presumir la possibilitat—gairebé la seguretat—de la forma de complexos en el mateix sèrum de la sang.

Es curiós constatar com la pretesa generalització de Vles per a la formació de complexos proteics, es va estenent àdhuc en aquells casos en què el raonament de l'autor no té aplicació per tractar-se d'agregats que escapen de les fórmules matemàtiques per ell calculades.

CONCLUSIONS

1.^a La càrrega micellar proteica invertida ens obliga a admetre que els pròtids de la sang no són simples globulines i albúmines, ans encara complexos de pròtids i altres substàncies de naturalesa química

mal definida i enganxades per forces físico-químiques d'una certa labilitat.

2.^a Això fa preveure la impossibilitat d'aplicació dels càlculs de Vles en formació de complexos proteico-amfolítics, d'acord amb les seves propietats físico-químiques.

3.^a La dissociació electrolítica dels pròtids del xerigot en determinades regions del pH ens demostra la importància que pot tenir en el nostre organisme no sols una desviació quantitativa de les valors proteiques de la sang, ans encara una desviació qualitativa que afecti la dinàmica micellar o polaritat elèctrica.

4.^a La dualitat de les càrregues micellars amb inversió manifesta de la seva polaritat, ens explica la possible formació de complexos físico-químics, per bé que sense acatar la previsió matemàtica de Vles.

RESUMEN

En este trabajo, los Doctores Oriol y Piñol-Nolla han hecho un estudio del suero de la sangre por electroforesis. De los resultados obtenidos deducen que los coloides de la sangre no son pròtidos sencillos como se viene suponiendo con la denominación de «albúminas y globulinas», sino que se trataría de verdaderos compuestos constituidos a base de complejos físico-químicos.

SUMMARY

In this treatise, Doctors Oriol and Piñol Nolla, have made a study of the blood, through the means of electroforesi. It is deduced, from the results obtained, that the coloides of the blood are not of protides only—as has been thought—but true compounds that can form amongst themselves physical-chemical compounds.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Panum, «Virchow. Archiv.», vol. III, 1, pàgina 251 (1851).
- (2) A. Schmidt, «Reichters, und Du Bois-Reymonds Archiv.», 1862.
- (3) Hoppe Seyler i Th. Weyl, «Zeitschrif. fur. physiol. Chemie», vol. I, pàgina 72 (1877).
- (4) Hofmeister, «Archiv. fur. experim. Pathol. und Pharmac.», vol. XXIV a XXVIII (1888 a 1890) i «Zeitschr. fur. physiol. Chemie», vol. XIV, pàgina 165 (1889) i XVI, pàgina 187 (1891).
- (5) Halliburton, «Journal of Physiology», vol. VII, pàgina 319 (1886).
- (6) Hammarsten, «Ergebuisse der Physiologie», vol. I, pàgina 330 (1902).
- (7) M. Emil, «Zeitschrif. fu. physiol. Chemie», vol. XXVIII, pàgina 559 (1899).
- (8) Fuld-Spiro, «Zeitschrif. fur. physiol. Chemie», vol. XXXI, pàgina 132 (1900).
- (9) W. Seng, «Zeitschrif. fur. Hyg. und Infekt», vol. XXXI, pàgina 513 (1899).
- (10) Maximowits, «Journ. der Russ. Physik-Chem. Ges.», vol. VI, pàg. 460 (1901).

- (11) Oppenheimer, «Verh. der. Berl. physiol. Ges.», vol. VII, pàgina 350 (1902).
- (12) Robertson, «Journal of Biologic. Chemistry», vol. XIII, pàgina 325 (1913).
- (13) Goldschmit i Kahn, «Zeitschrif. fur. physiol. Chemie», vol. CLXXXIII, pàgina 19 (1929).
- (14) Groh i Faltin, «Zeitschrif. fur. physiol. Chemie», vol. CXC, pàg. 13 (1931).
- (15) Söerenen, «Compt. Rend. du laboratoire de Carlsberg», vol. XII (1917); «Journ. Amer. Chem. Soc.», vol. XLVII, pàg. 457 (1925).
- (16) Hardy, «Journ. of Physiol.», vol. XXXIII, pàgina 251 (1905).
- (17) Chick, «The Biochem. Journ.», vol. VIII, pàgines 261 i 404 (1914).
- (18) Mellanby, «Journ. of Physiol.», vol. XXXIII, pàgina 338 (1905).
- (19) Svedberg, «Journ. Amer. Chem. Soc.», vol. XLVIII a LII, pàgina 2.855 (1926 a 1930).
- (20) Ostwald, «Kolloidzeitschrif.», vol. XLI, pàg. 163 (1927).
- (21) Piñol-Nolla, «Memòria inèdita en preparació per optar al grau de Doctor».
- (22) Hardy, «Journ. of Physiol.», vol. XXXIII, pàg. 251 (1905); «Proc. Roy. Soc.», vol. LXVI, pàg. 110 (1900); «Journ. of Physiol.», vol. XXIX, 1903.
- (23) Kopackzewsky, «Traite de Biocolloidologie», Gauthier Villars, París. Vol. V.
- (24) Höber, «Physikalische chemie der zelle und der Gewebe», 6.^a edició. Leipzig. Engelman editor.
- (25) Pauli, «The colloid Chemistry of Protein», traducció anglesa de Thormes, pàgina 140, Churchill, Londres (1923).
- (26) Loeb, «Proteines and the theory of colloidal Behaviour», pàg. 292. M. Graw Hill Book Co Londres, 1922.
- (27) Bechold, «Die Kolloide in Biologie und Medizin», 4.^a edició, Dresden i Leipzig (Steinkopff, editor).
- (28) Vles, «Archiv. Phis. i Biol.», 1.^a p. vol. IV, pàg. 43 (1924); vol. V, pàg. 125 (1926); «Strasbourg Medical», 1927, vol. I.
- (29) Vles, «Considerations theoriques sur le pHi des ampholites», Archiv. Phys. Biol., vol. IV, pàg. 228.
- (30) Sandor i Machebeuf, «Bull. Soc. Chim. Biol.», vol. XIII, pàg. 736 (1931) i These doctorat es Sciences, París, 1928.