

Tesis de Posgrado

Dosaje y variedades de Hemoglobinas y sus derivados

Sanguinetti, Alfredo

1910

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

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

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

Cita tipo APA:

Sanguinetti, Alfredo. (1910). Dosaje y variedades de Hemoglobinas y sus derivados. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0066_Sanguinetti.pdf

Cita tipo Chicago:

Sanguinetti, Alfredo. "Dosaje y variedades de Hemoglobinas y sus derivados". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1910.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0066_Sanguinetti.pdf

UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES

DOSAJE Y VARIEDADES

DE

HEMOGLOBINAS Y SUS DERIVADOS

TESIS

Presentada á la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales
para optar al grado de Doctor en Química

POR EL EX-ALUMNO

ALFREDO SANGUINETI

Químico de la Oficina Química Municipal



BUENOS AIRES

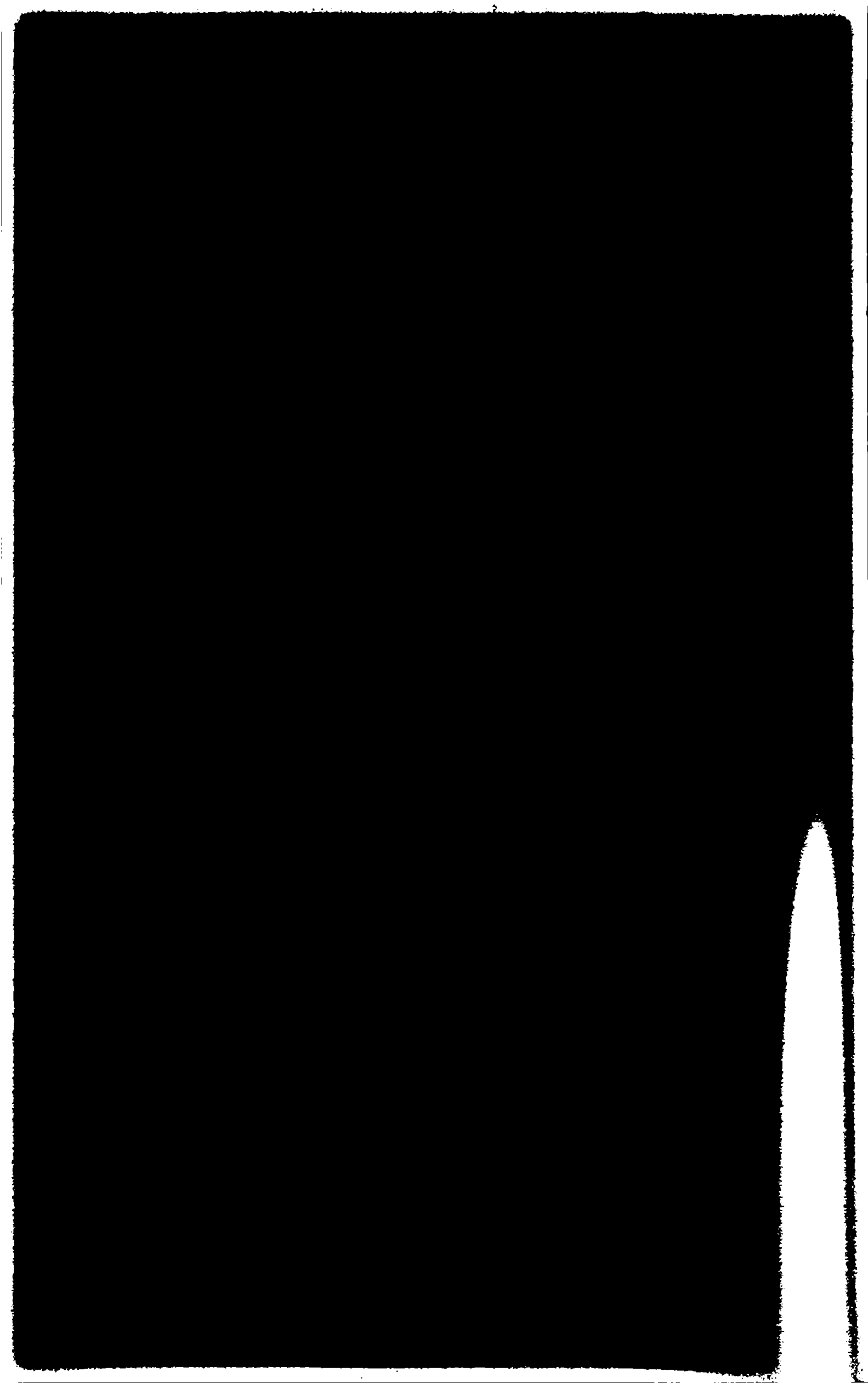
IMPRESA Y CASA EDITORA «JUAN A. ALSINA»

259 — CALLE ALBERTI — 259

1910

La Facultad no se hace solidaria
de las opiniones manifestadas en
las tesis.

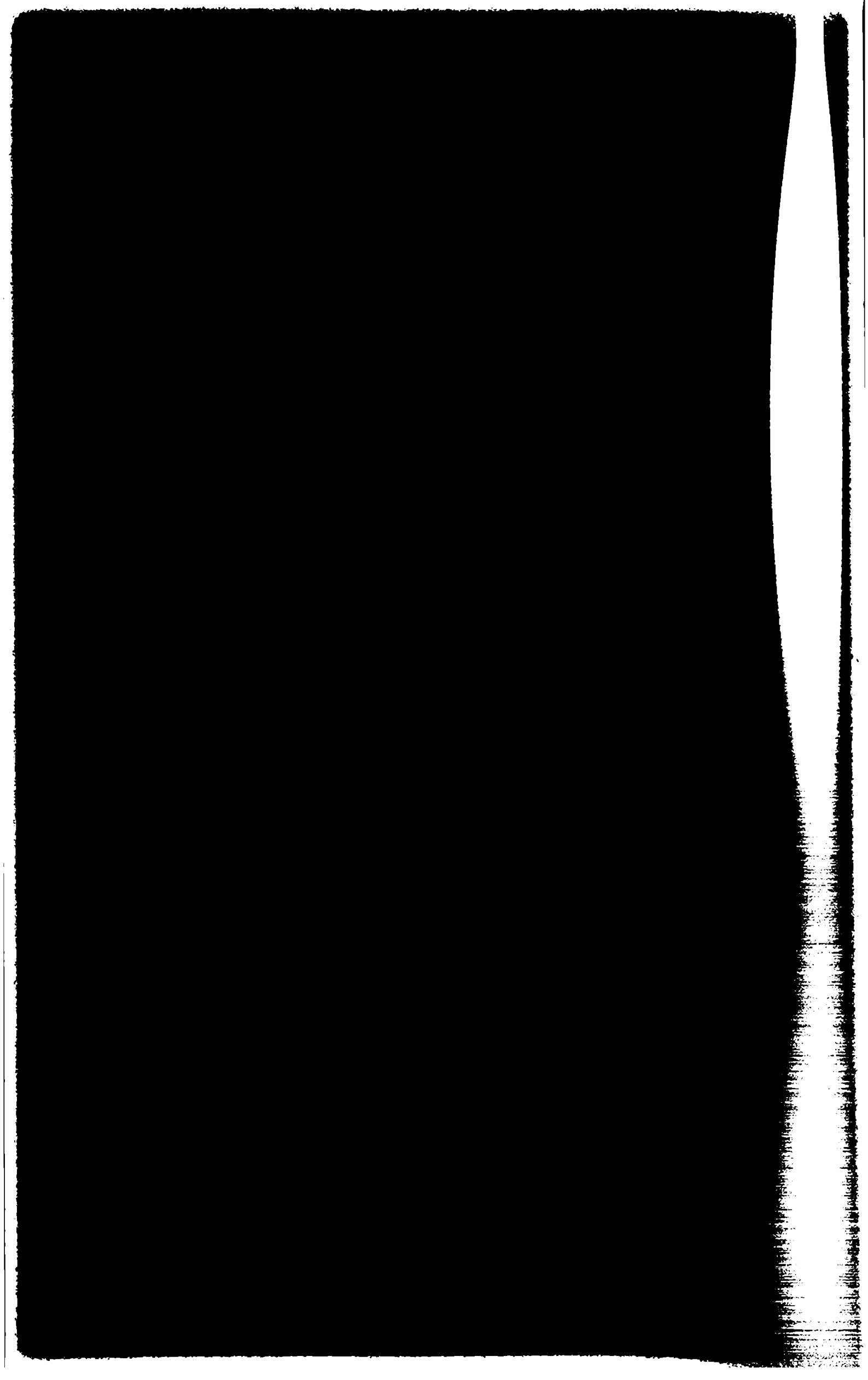
Profesora D. Pedraza rat



À la veneranda memoria de mi Àbuela.

À mis Padres.

À mis Hermanos.



SEÑORES CONSEJEROS:

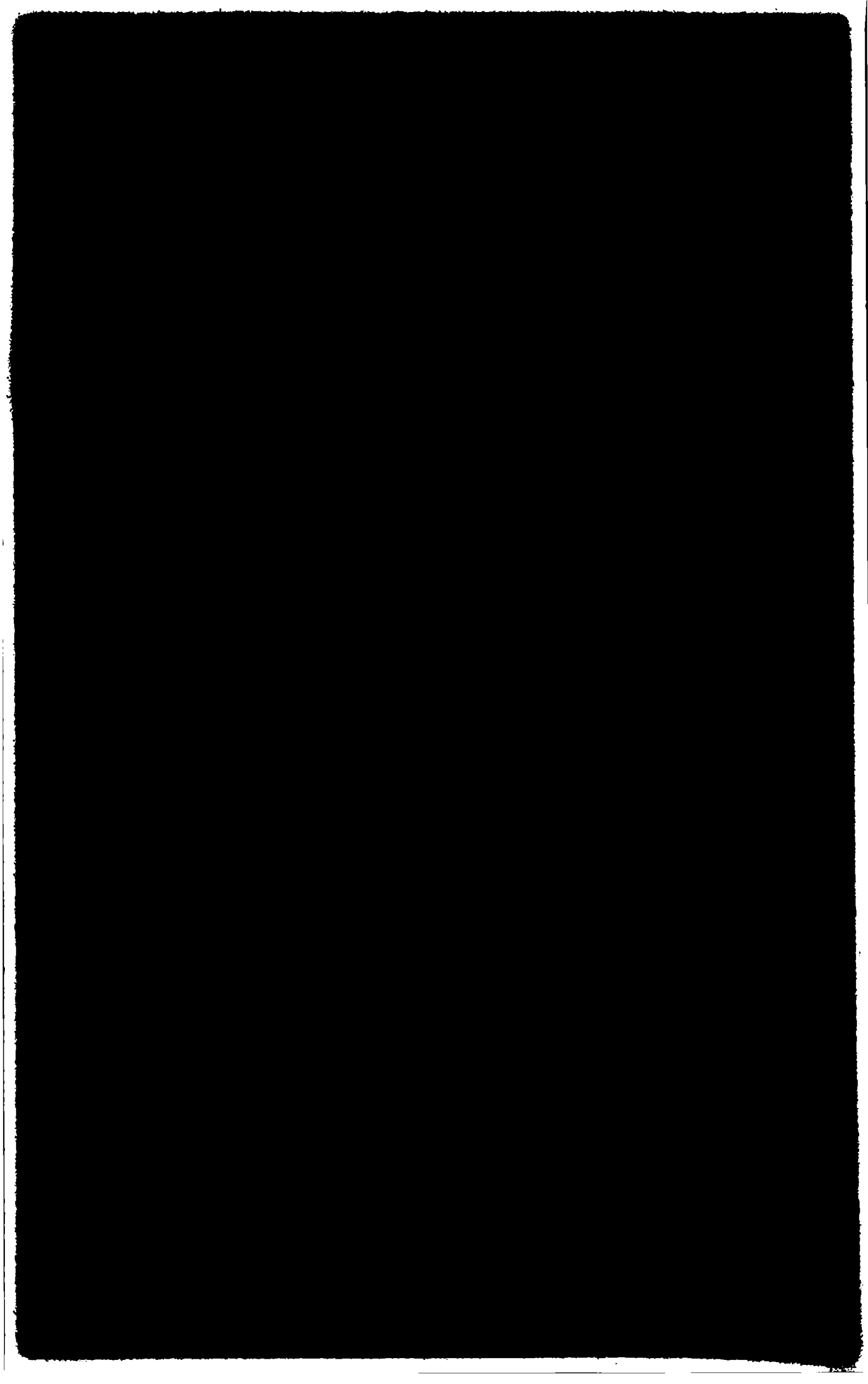
SEÑORES PROFESORES:

Al presentar este pequeño y modesto trabajo como última prueba exigida por el Reglamento Universitario, espero lo juzgareis con suma benevolencia; no hay originalidad alguna, solo la aplicación de un nuevo criterio al tentar la resolución del problema planteado hace ya muchos años por Bohr.

Las conclusiones en pro de una teoría que se discute aún vivamente, han sido formuladas después de un detenido estudio de innumerables hipótesis explicativas y hechos de experiencias, pruebas y objeciones traídas por un gran número de experimentadores.

Cábeme el honor de ser acompañado en este acto por el Profesor Doctor P. N. Arata, á quien agradezco profundamente.

Un deber ineludible de gratitud me obliga á manifestar también intenso y sincero agradecimiento á los que fueron mis maestros, y especialmente al Doctor Horacio Damianovich, quien espontáneamente me ha suministrado utilísimo material informativo, facilitándome libros y revistas.



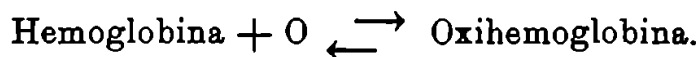
Introducción

Así como no hay nada que divida tanto á los hombres como la creencia de que poseen respectivamente la verdad, así nada los aproxima tanto como la noble tarea de buscarla en común.

GASTÓN PARIS.

« El rol de la hemoglobina del glóbulo sanguíneo desde el doble punto de vista de la respiración de los elementos anatómicos y de su excitación vital, es de suma importancia » (1).

La hemoglobina es la substancia intermediaria entre el oxígeno del aire y las células de los tejidos: su combinación con este gas, presenta la propiedad físico-química característica, afinidad energética é inestabilidad relativa; es un fenómeno reversible y continuo, que cae dentro del dominio de la dinámica de las transformaciones y sus leyes:



En los diversos métodos que se han propuesto, más ó menos exactos y sensibles, para su dosaje, se indica casi siem-

(1) E. LAMBLING.—Dosage de L'Hemoglobine (1882).

pre un factor constante, que nos da, por una simple multiplicación, la concentración de aquella.

Este factor constante, nos hace admitir implícitamente, que la sangre no contiene sino una sola materia colorante, esto es, una sola hemoglobina.

Existe en realidad una sola?

Es diferente en cada especie animal?

Difiere en los individuos de cada especie?

La sangre de un solo individuo posee varias?

Los trabajos de Otto, Vierordht, Hufner, Lambling, Saint-Martin, etc., parecían probar la identidad de la hemoglobina en casi todos los animales superiores.

El 9 de Mayo 1890, Christian Bohr (1) presentó á la Academia Real Danesa de Ciencias una memoria tratando de demostrar que las hemoglobinas estudiadas no eran sino una mezcla de hemoglobinas.

Hufner (2), el más ardiente partidario de la teoría unitaria, refutó á Bohr, argumentándole la falta de pureza en los cristales de oxihemoglobina preparados.

Pero en el Congreso Internacional de Fisiología de Cambridge (1898), Saint-Martin, antiguo partidario de la teoría de Otto-Hufner, hizo notar las divergencias obtenidas en ciertas constantes físicas de las diversas hemoglobinas, poniendo en duda la teoría unitaria.

Gallerani, aprovechando los últimos perfeccionamientos del espectroscopio de Hufner, encaró de lleno la cuestión, y después de pacíficos estudios, llegó á la convicción de la realidad de la teoría de Bohr.

(1) CHR. BOHR.—Sur les combinaisons de l'hémoglo. avec l'osigène.

(2) G. HUFNER.—Arch. für anat. et physiol.

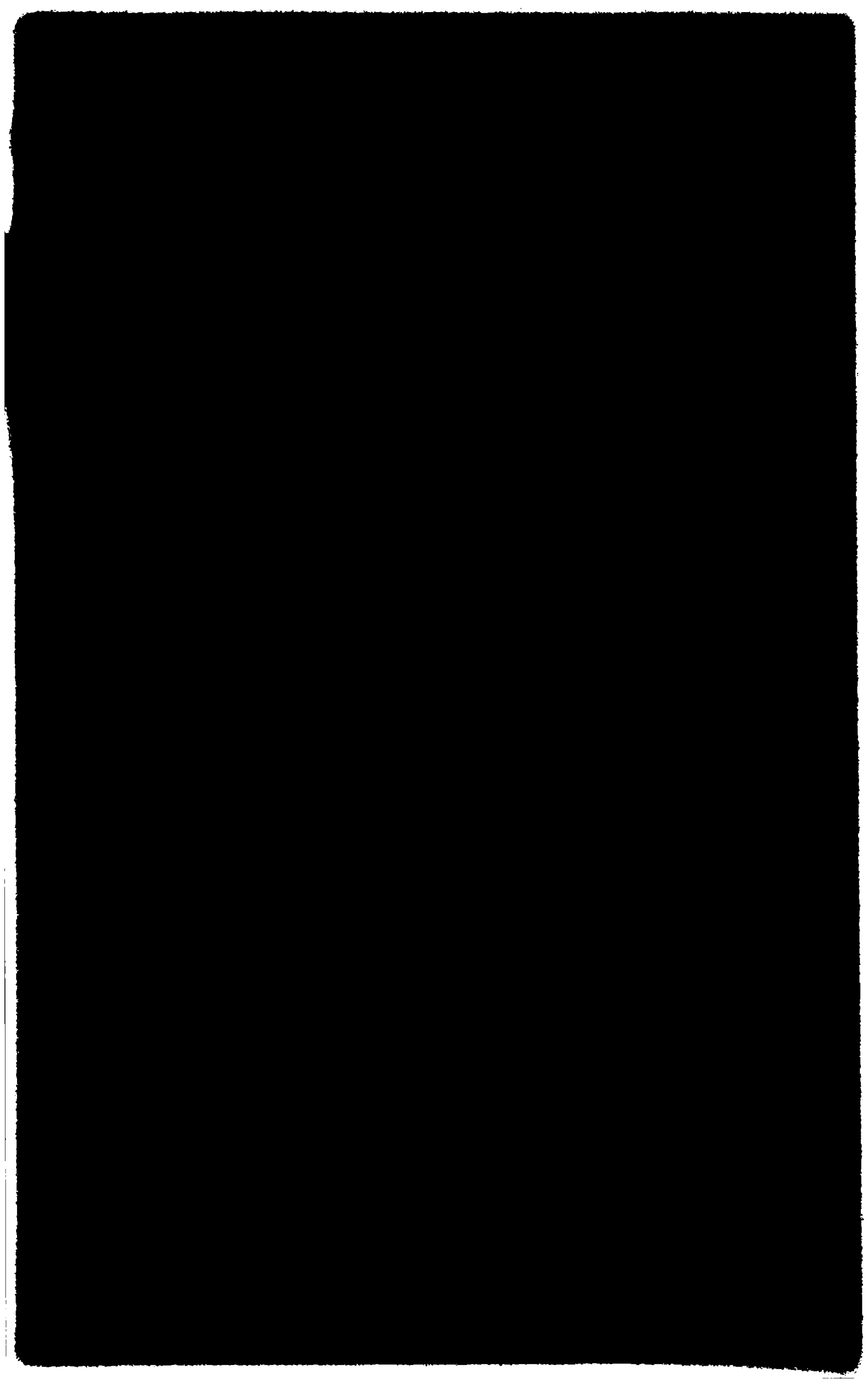
El profesor Lambling, en su artículo Hemoglobina (suplemento número 2 de la Enciclopedia de Wurtz), da como no resuelto el problema planteado por primera vez por Bohr.

Con ánimo, pues, de llegar á una conclusión sobre este debatido problema, hemos tratado de elegir el camino más directo y más exacto; y después de sucesivas eliminaciones, el que solo queda incólume ante todas las objeciones, es el método espectrofotométrico.

Hemos elegido el espectrofotómetro de Hufner, que está basado en la teoría de la absorción de determinadas radiaciones luminosas y en la de Fresnel, Young y Malus, de la polarización de la luz por refracción y que, por su fácil manejo, sensibilidad y exactitud, es superior al de Trannin, según opiniones autorizadas como las de Lambling, Saint - Martin y Gallerani.

Hemos seguido el método de éste último para encarar y resolver el problema y no el de Bohr por razones que daremos en su lugar correspondiente.

Además se ha aplicado, á los resultados directos obtenidos, el método de los mínimos cuadrados para determinar su valor medio, y rechazar aquellos que no merecieran igual confianza.



La Sangre

Según la bella y feliz definición de Claudio Bernard, la sangre es el medio en donde viven los elementos anatómicos; expresión fiel de su función fisiológica.

Anatómicamente es un líquido albuminoso y salino, conteniendo en suspensión elementos figurados; fisiológicamente es el medio gracias al cual el mundo externo efectúa sus cambios con el individuo histológico: es decir, la célula.

En los vertebrados, es un líquido rojo que circula en un sistema de vasos cerrados; rojo oscuro, un poco dicroico, en capas delgadas, rojo por reflexión y verde rojizo por transparencia (sangre venosa), ó rojo vermellón (sangre arterial).

La coloración depende de la cantidad de oxígeno combinado débilmente, y del espesor. No es transparente; translúcido solamente bajo débiles espesores. Ambas, coloración y opacidad, son debidas á los elementos figurados que contienen una materia colorante: la hemoglobina.

El olor recuerda en general el del sudor del animal y se debe á la presencia de ácidos grasos volátiles. Sabor salino debido á las sales que contiene en disolución.

Densidad: en el hombre varía entre 1.055 y 1.060.

Reacción: Alcalina aparentemente, contiene elementos salinos ácidos.

Temperatura: en el hombre oscila entre 36° 5 y 37° 8.

ELEMENTOS HISTOLÓGICOS

En histología se considera la sangre como un tejido: el plasma representa la sustancia fundamental, los elementos anatómicos son los glóbulos.

Los glóbulos rojos ó hematías, llamados así por el color que dan á la sangre, son redondos en los mamíferos (exceptuándose algunos solamente), y constituyen una masa protoplásmica, desprovista de núcleo y de membrana envolvente; en los otros vertebrados son ovoides y con núcleo.

Son muy elásticos y flexibles: de aquí las diversas formas que afectan. Se reúnen, asemejándose á pilas de monedas.

Pequeños cuerpos amarillentos, discoides ó elípticos; se alteran fácilmente por el calor, agua, reactivos, etc. Bajo la acción de un gran número de agentes, la masa globular se separa de la materia colorante, conservándose intacto el estroma; otros destruyen completamente á éste.

Las dimensiones varían bastante: en el hombre alcanza 7,5 μ , término medio. En un milímetro cúbico se encuentra 5.500.000 glóbulos.

Los leucocitos ó glóbulos blancos son células, con protoplasma, desnudos, refringentes y provistos de un núcleo esférico ó multilobado. Su proporción es inferior á las hematías, 1 por 500. Más grande que éstos en los animales de sangre caliente; lo contrario ocurre en los de sangre fría.

El protoplasma es contráctil: cambian continuamente de forma: movimientos ameboidales. Emiten prolongaciones (pseudopodios) y los retraen; se adhieren á las paredes de los vasos y la atraviesan (diapedesis); como productos de segregación, pueden citarse las citinas ó alexinas, anticuerpos,

que desempeñan un rol tan importante en el mecanismo de la inmunidad.

La sangre contiene en suspensión otros corpúsculos: placas sanguíneas y granulaciones diversas; hematoblastos de Hayem, placas de Bizzozero, etc.

Composición química de los glóbulos rojos en el hombre (Schmidt, Hoppe-Seyler y Judell).

Agua.....	688
Residuo fijo orgánico.	303,88
Mineral	8,12

Plasma: es la parte líquida de la sangre tal cual se encuentra en los vasos del sistema circulatorio.

Fuera de los vasos, no permanece líquida; se coagula espontáneamente: se observa la separación de una parte sólida (fibrina) de una líquida (suero).

Impiden la coagulación soluciones de azúcar, sulfatos de sodio y magnesio, oxalatos alcalinos, etc.; igualmente inyecciones de peptonas, intravenosas.

Es un líquido amarillo ámbar, algo viscoso, insípido, de reacción alcalina, de densidad 1,027. Su composición es análoga, pero no idéntica á la del suero, se diferencia en la falta de fibrinógeno en este último. La fibrina que aparece en la sangre coagulada, deriva del fibrinógeno ó metaglobulina del plasma.

Composición del plasma según Schmidt y Lehmann:

Agua	902,90
Residuo fijo.	97,10
Albúminas: fibrinógeno.	4,05
Seroglobulina	32,00
Seroalbumina	46,84
Grasa y materias extractivas.	5,66
Sales minerales.	8,55

Según Hammarsten la composición del suero humano, es:

Agua.	907,9
Resíduo fijo.	92,1
Seroglobulina	31,0
Seroalbumina y otras alb.... .	45,2
Materias extractivas.....	7,1
Sales minerales.....	8,8

El fibrinógeno es una substancia albuminóidea, blanca, amorfa, soluble en soluciones débiles de sales alcalinas, insoluble en agua. Pertenece al grupo de las globulinas (substancias protéicas simples); precipita por adición de una solución saturada de sulfato de magnesia. El calor (56°) soluciones saturadas de sales alcalinas, etcétera, y un fermento diastásico que segregan los leucocitos, lo coagula: se obtiene la fibrina.

La sero ó paraglobulina es una albúmina blanca, amorfa, insoluble en el agua. Pertenece también por sus caracteres al grupo de las substancias protéicas simples, precipitables por sulfato de magnesio (globulinas). Precipita bajo la acción de los ácidos, soluciones saturadas de cloruro de sodio, etc., Se coagula á 75°.

La seroalbumina ó serina existe en la sangre y pasa al suero sin modificación; del grupo de las substancias protéicas simples, subgrupo de las albúminas. Es incolora, amorfa, soluble en el agua; coagula á 84°.

La sangre contiene siempre azúcar, de la cual una parte está preformada. A menudo se encuentra disuelta en el plasma, rara vez en los corpúsculos.

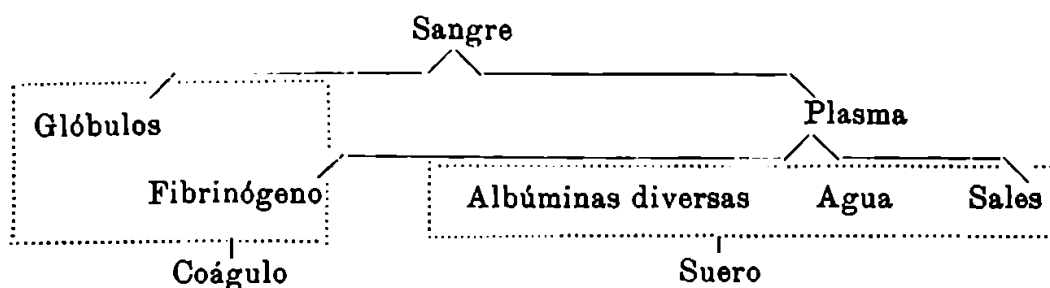
La sangre contiene además, sustancias grasas, lecitina, eolesterina, ácido láctico, glicógeno, úrea, ácido úrico, peptonas en pequeña cantidad, un fermento cuya función es la de destruir la glucosa y una diastasa, el fribina-fermento, que coagula el fribinógeno.

El plasma contiene como elementos dominantes, el sodio y el cloro; mientras los glóbulos, potasa y ácido fosfórico.

Gases.—Su proporción referida á 100 cm³ de sangre, es la siguiente:

	Sangre arterial.	Sangre venosa.
Oxígeno.....	19 á 25 cm ³	4 á 10 cm ³
Anhidrido carbónico.....	32 á 40 »	20 á 46 »
Nitrógeno.....	1 á 3,5	1 á 3,5
Argón.....	0,041	—
Oxido de carbono.....	0,14	—

Coagulación de la sangre.—El esquema siguiente tomada de Hugounenq, da una idea clara del fenómeno.



Todo aquello que tiende á conservar los leucocitos, retarda la coagulación; lo que provoca su alteración, la acelera. Los glóbulos blancos tienen un rol capital y activo en la coagulación: su presencia es necesaria, pero no suficiente.

Las sales de calcio son factores muy importantes en este fenómeno, pero no son indispensables.

Los leucocitos intervienen segregando un fermento soluble plasmosa y fibrina - fermento.

Obran como anticoagulantes, in-vitro, las sales alcalinas y alcalinas terrosas, oxalatos, fluoruros, citrato de potasio, etc; in-vivo, las peptonas comerciales (que obran en el sentido indicado gracias á las albumosas que contienen), extractos de músculos de cangrejo, de cabeza de sanguijuela, suero de anguila, diastasas, etc. Todas estas últimas sustancias provocan una hipo-leucocitosis general.

Como sustancias coagulantes se pueden citar: la gelatina, cloruro de calcio, coloides, etc.

Materias colorantes de la sangre

HEMOGLOBINA Y SUS DERIVADOS

Se ha comprobado que en la sangre y en los músculos, existen pigmentos proteicos, que provienen de la unión de una histona (1), con un pigmento ferruginoso.

Como pigmentos proteicos de la sangre se citan la hemoglobina y sus derivados.

OXIHEMOGLOBINA

Desempeña, con la hemoglobina, un papel de capital importancia en la respiración; derivan la una de la otra y pueden coexistir.

Los cristales de oxihemoglobina, desprovistos de su agua madre de cristalización por medio de la trompa, son grandes, rojos rubí, de un brillo magnífico, pudiéndose aislar perfectamente los unos de los otros. Son cristales blandos, cuya dirección de extinción se encuentra según la mayor longitud. Examinándolos en luz convergente, las ramas de hipérbolas no se aperciben sino difícilmente: pero los ejes ópticos están

(1) Substancias proteicas, vecinas de las proteínas, difiriendo solamente por su carácter básico, debido á su proporción elevada en ácidos diamidados.

bastante alejados. Parecen ser cristales ortorómbicos; es curioso hacer observar que bajo la más ligera presión, se vuelven isótropos: desaparece la dirección de extinción.

Se conservan algún tiempo á baja temperatura, presentan un pequeño pero neto dicroísmo: rojo escarlata ó amarillo claro, según la posición de los nicoles.

La oxihemoglobina humana es un polvo rojo ladrillo, cristalino. Todas las estudiadas hasta el presente son solubles en el agua, dando una solución roja intensa, pero su solubilidad varía muchísimo de una especie á otra; insolubles en alcohol y éter.

Propiedades químicas.— La composición centesimal de las oxihemoglobinas de los diversos mamíferos domésticos es la siguiente:

	Caballo	Perro	Cobayo	Ardilla
C.	54,81	54,57	54,12	54,89
H.	7,01	7,22	7,36	7,39
N.	17,06	16,38	16,78	16,00
S.	0,6	0,568	0,58	0,59
Fe.	0,468	0,336	0,48	0,4
O.	19,86	20,43	20,68	21,44
	Nencki	Jaquet	Hoppe-Seyler	

Se desconoce su fórmula química.

Es muy alterable: seca, puede calentarse á 100° sin alteración; pero basta pequeñas cantidades de agua para que la destrucción se opere rápidamente á 80°.

Es ligeramente ácida, soluble en las bases débiles. El subacetato de plomo, las sales de plata y de mercurio la precipitan.

Cede su oxígeno transformándose en hemoglobina en presencia de gases inertes (N, CO², H₂) ó de algunos reductores (sulfuro de amonio, sales ferrosas, etc.). Igual transformación se observa durante la putrefacción.

En el vacío, á 40°, abandona su oxígeno y se reduce; una molécula al disociarse pierde una de oxígeno.

Característica de esta disociación son: 1.º su reversibilidad; 2.º, ser función de dos variables muy importantes: temperatura y tensión del elemento gaseoso.

A 37°, en una atmósfera limitada, en vaso cerrado, la oxihemoglobina se disocia en hemoglobina y en oxígeno hasta que la tensión de éste alcance un cierto valor constante y dependiente de la temperatura.

Si se eleva ésta, una nueva cantidad de oxígeno se separa hasta que la tensión del gas haya adquirido un valor constante y característico de esta nueva temperatura. Si desciende, se observa el fenómeno inverso; fijación de oxígeno.

Existe, pues, aquí un fenómeno reversible y continuo que cae dentro de las teorías fisico-químicas, que estudian la dinámica de las transformaciones, y que está expresado y definido por una ecuación llamada ecuación de equilibrio.

Existe un equilibrio para cada temperatura; está definido por la tensión de disociación:

$$D = f (t)$$

Numerosos experimentadores han tratado de determinar la cantidad de oxígeno que desprende un gramo de oxihemoglobina, para transformarse en hemoglobina ó inversamente.

Para estas determinaciones agitaban soluciones tituladas de hemoglobina, con un gran exceso de oxígeno ó de aire y medían la cantidad de oxígeno desaparecido (absorciometría) ó bien descomponían la oxihemoglobina, y medían el volumen desprendido de oxígeno por la acción del vacío.

Teniendo en cuenta la cantidad de oxígeno disuelto físicamente en el líquido, han encontrado:

Oxihem de:	Vol. de O fij. por 100 grs. mat. colorante	
Perro	168 cm ³	Hoppe-Seyler
»	155 »	Dybhowski
»	162 »	Preyer
»	163 »	Worm-Müller
»	158 »	Hüfner
Caballo	172 »	»

Admitiendo que un átomo de hierro en la hemoglobina corresponda á un átomo de oxígeno, el peso p de éste, fijado por 100 gramos de aquella, la cual contiene n por 100 de hierro, será

$$p = n \times \frac{16}{56} = n \times 0,2857$$

y adoptando para la hemoglobina de perro, la cifra de 0,43 por 100 de fierro encontrado por Hoppe-Seyler, se tendrá

$$p = 0,12285 \text{ gramos}$$

ó sca

85,9 cm³ 40° y á 760 mm. (1).

Esta cifra es muy inferior á las obtenidas con métodos más precisos, que fueron empleados por Hüfner. Si se admite que á un átomo de hierro corresponde dos de oxígeno, hallaríamos 171,8 cm³ de éste para 100 grs. de hemoglobina.

Algunas cifras del cuadro anterior, y las obtenidas por Hüfner, concuerdan bastante con el resultado anterior.

Nuevas determinaciones gasométricas de Hüfner han dado resultados muy satisfactorios. Ha medido la cantidad de óxido de carbono fijado por un gramo de oxihemoglobina, sea sobre sangre de buey diluída, en la cual dosaba la materia colorante, con el espectrofotómetro, sea sobre soluciones tituladas de oxihemoglobina cristalizada. Efectuaba el dosaje, haciendo obrar el óxido de carbono sobre la solución, ó desplazando éste por el bióxido de azoe. Halló de esta manera, que la cantidad de gas fijado por un gramo de materia colorante, es término medio 1.338 cm³ (máximo 1.358; mínimo 1,297). Para 0,336 % de fierro, se obtiene 1,34 cm³.

Como la hemoglobina de sangre de perro, gallina, caballo contiene la misma proporción de fierro, que la sangre de buey, se puede concluir que esas homoglobinas, y sin duda también las de los otros animales superiores, fijan idéntica cantidad de óxido de carbono.

Y como según la ley de Claudio Bernard, el poder absorbente de la sangre es igual para el oxígeno y el óxido de carbono, la cantidad de aquel gas fijado, será 1,336 cm³. Cherbu-

(1) LAMBLING.—Sang et Respiration, pág. 38. Enc. Fremy.

liez (tesis 1890) rechazó la anterior ley fisiológica; pero las experiencias de Saint-Martin han demostrado su exactitud. La misma cantidad de oxígeno fijarán, con muchísima probabilidad la sangre de perro; caballo, etc.

Hemoglobina y productos de transformación

Los cristales de hemoglobina pertenecen á diferentes sistemas, según su origen. Abandonados al aire, absorben agua y se transforman parcialmente en oxihemoglobina.

Existe en la sangre venosa; se obtiene por la acción de agentes reductores sobre la oxihemoglobina.

Cristales dicroicos: rojos-violetas por transparencia, verdes por reflexión. Absorbe enérgicamente el oxígeno; 1 gramo de hemoglobina absorbe 1,35 cm³ de oxígeno ó de óxido de carbono. Esta es su reacción más importante; sus soluciones muy diluídas constituyen un reactivo de extraordinaria sensibilidad del oxígeno.

Son mucho más solubles las hemoglobinas que las correspondientes oxihemoglobinas.

Ambas pertenecen á la categoría de las sustancias proteicas complejas clasificadas por Hoppe-Seyler; es decir, que dan por desdoblamiento un albuminoide (globulina) y otra substancia, pigmento, que contiene fierro. La hematina, pigmento ferruginoso proveniente de la oxihemoglobina, se conoce desde los importantes trabajos de Tiedemann, Gmelin y Lacanun (1838). El pigmento proveniente de la hemoglobina, hemocromógeno, se conoce solamente desde 1864 (Stoke). Esta substancia se transforma rápidamente al contacto del aire en hematina. Aquella es, pues, á ésta lo que la hemoglobina es á la oxihemoglobina.

El desdoblamiento se puede representar por el siguiente esquema:

Oxihemoglobina se descom-
pone en presencia de los
ácidos en: { Mat. Albuminóidea (globulina)
Hematina

Hemoglobina se descompo-
ne al abrigo del aire, en
presencia de los álcalis { Mat. Albuminóidea (globulina)
Hemocromógeno

Esta última en presencia de un ácido, abandona su fierro al estado de sal ferrosa, transformándose en hematorfirina. Esto demuestra que el núcleo coloreado, el hemocromógeno, es el que fija el oxígeno debilmente combinado, y es probable, añade Lambling, que este núcleo sea el mismo en todas las hemoglobinas.

METAHEMOGLOBINA

Es un producto de transformación de la oxihemoglobina. Puede esta transformarse espontánea y parcialmente en aquélla. Es una albúmina ferruginosa, cuya composición es igual á la de la oxihemoglobina, de la cual difiere por la mayor energía con que está fijado el oxígeno.

Cristales parduzcos, finas agujas prismáticas; á veces se observan hexágonos regulares pudiendo alcanzar medio centímetro de diámetro. Muy poco solubles en agua, insolubles en alcohol y éter, poseen reacción ácida.

La transformación es total bajo la influencia de ciertos reactivos, llamados *metamoglobisantes*: calor, radiaciones (radiaciones del radio, etc.), oxidantes (permanganato de potasio, clorato de potasio, etc.), reductores, ácidos (ósrico,

pícrico, etc.), bases (ferrocianuros, nitritos, etc.), sustancias neutras (alcohol, éter, etc), toxinas, microbios.

El poder de estos agentes aumenta con la temperatura y con la disminución de la presión.

Existen agentes anti-metamoglobisantes: carbonato de sodio, bicarbonatos, acetato de soda, actuando en el organismo como fuera de él. In-vivo se produce á consecuencia de envenenamiento por el clorato de potasa y otros agentes.

Bajo la influencia de los ácidos y álcalis, se desdobla en globina y hematina. Los reductores la transforman en hemoglobina.

La oxihemoglobina, transformándose en metamoglobina, desprende un centímetro cúbico más ó menos de oxígeno por gramo de pigmento; aquella, pues, pasa al estado de hemoglobina antes de transformarse en metamoglobina.

Von Zeynek considera esta transformación como producto de una migración molecular.



Fija el bióxido de ázoe, el anhídrido carbónico, el óxido de carbono, el ácido sulfhídrico, etc., dando la metamoglobina correspondiente. Con el ácido cianhídrico da la ciano-metamoglobina.

1) Productos no proteicos, ferruginosos:

Hematina.—Pigmento no proteico que se puede encontrar en la sangre proveniente del organismo, derivado de la hemoglobina conteniendo fierro en su molécula.

La oxi, la hemo y la metamoglobina se desdoblan bajo la

acción de los ácidos y bases diluïdos, sales ácidas ó alcalinas en una histona (llamada globina) y un pigmento ferruginoso, la hematina. Esta es un polvo negro, insoluble en casi todos los disolventes; soluble en alcohol acidulado y en los álcalis; se reprecipita bajo la forma coloidal acidulando la solución alcalina.

Se funde sin descomposición á 200 grados. Contiene una elevada proporción de hierro 9 %. Es alterada por el agua caliente.

Una propiedad característica es la formación de cristales de hematina. Se une á los ácidos y forma un derivado clorhídrico cristalizado, pardo (cristales de Teichmann). Es una substancia estable, muy resistente á la acción de los fermentos. Se combina con N_2O_2 , HNC, etc.

Hemocromógeno.—Pigmento ferruginoso, no protéico, derivado de la hemoglobina. Se ha obtenido en cristales; sus soluciones son de un color rojo púrpura. Bajo la influencia del oxígeno se transforma en oxihematina; y de los reductores, en un pigmento cuya constitución es muy análoga á la de la urobilina. Se combina con N_2O_2 y CO.

2) Pigmentos no ferruginosos:

La hemoglobina, en su ciclo, á través del organismo termina por desdoblarse; la hematina pierde el fierro que contiene en su molécula dando pigmentos que derivan los unos de los otros, hematoporfirina, pigmentos biliares, urobilina, los cuales se encuentran en los líquidos de excreción, etc.

Hematoporfirina.—Producto natural de transformación de la hemoglobina.

Calentando la hematina con ácido sulfúrico se obtiene aquélla. Polvo parduzco, dando soluciones pardas rojizas. Soluble en los álcalis, ácidos y alcohol; poco soluble en a gua

Se han obtenido cristalizadas las sales correspondientes al clorhidrato ó derivado sódico. Bajo la influencia de agentes oxidantes se transforma en ácido hemático. Da la reacción de Gmelin.

PRODUCTOS DE COMBINACIÓN

La hemoglobina fija diversos gases, CO, N₂O₂, HCN y CO₂, dando combinaciones cristalinas.

Carboxihemoglobina: combinación de la hemoglobina con el CO. Los cristales son isomorfos con los de la oxihemoglobina pero de un color rojo violáceo intenso, menos soluble en agua y alcohol que éste.

Es mucho más estable que la oxihemoglobina, lo cual permite comprender el mecanismo de la intoxicación por el CO. Este desplaza el oxígeno volumen á volumen; agitando sangre con aquel gas, se obtiene un desplazamiento total del oxígeno. La cantidad fijada por gramo de pigmento varía entre límites bastante extensos.

Es muy resistente; pero al cabo de algunos años se observa una notable disociación. El oxígeno á su vez desplaza el óxido de carbono. El N₂O₂ desplaza con suma facilidad el CO: la hemoglobina bioxi-nitrogenada es mucho más estable.

Sain-Martin ha probado que la disociación de la carboxihemoglobina no lacada (1), es muy débil en el vacío á 40° y que puede despreciarse si la operación no se ha prolongado más de 15 minutos. La disociación en el vacío de su solución acuosa es más considerable, pero sin alcanzar proporciones

(1) *Sangre lacada* (Sangre laqué). Estado de la sangre cuya hemoglobina ha abandonado los glóbulos rojos y se ha disuelto en el suero: es transparente como jarabe y color de laca.—Dic. Térm. técnicos.

suficientes para extraer de la sangre oxicarbonica todo su CO. La sangre oxicarbonica, adicionada de una solucion de acido tártrico (50 %) y calentado á 40° deja desprender, cuando se le somete á la acción del vacío todo su CO.

Hüfner ha agitado soluciones acuosas de hemoglobina oxicarbonica (11 %) con nitrógeno á la temperatura de 32°, y determinando cada vez la cantidad de CO, abandonado por aquélla. Construye de esta manera la curva de disociación.

He aquí los resultados obtenidos:

p_{CO}	x	$100-x$
1 mm	6,9	93,1
5	1,4	98,6
10	0,7	99,3
20	0,4	99,6
50	0,15	99,85
100	0,07	99,93

p_{CO} es la presión parcial de CO; x la cantidad de hemoglobina formada por disociación, en centésimos de la cantidad total de pigmento; $100-x$ la cantidad de carboxihemoglobina no disociada. De esto resulta, que la disociación de esta es menos fácil que la de la oxihemoglobina.

Así para una presión de 50 mm. de CO, la cantidad de aquélla disociada no es sino 0,15 %, de la cantidad total, mientras que en las mismas condiciones es para ésta de 4,6 %, esto es, 31 veces mayor.

Los últimos trabajos debidos á Saint-Martin dan resultados que difieren bastante de los anteriores. La causa de esta discordancia estriba seguramente en las diferentes condiciones en que han operado ambos.

Las demás combinaciones tienen poca importancia. La hemoglobina oxinitrogenada da cristales isomorfos con los de la oxi y carboxihemoglobina. No se ha comprobado todavía la existencia de la hemoglobina acetilénica.

Espectrofotometría

Interponiendo un cuerpo transparente entre un observador y una fuente de luz blanca, aparece incolora cuando deja pasar igualmente la totalidad de las radiaciones incidentes. Si se deja pasar, al contrario, ciertas radiaciones preferentemente á otras, aparece dotado de un color especial, que depende de la naturaleza de las radiaciones transmitidas.

Interponiendo este medio coloreado en el trayecto de un rayo de luz blanca que penetra en el colimador de un espectroscopio, se verá un espectro en donde faltarán ciertos colores (radiaciones que han sido absorbidas), es decir, atravesado por bandas oscuras. El número y lugar de estas zonas oscuras, es característico de cada substancia: es el fundamento del análisis espectrocópico cualitativo.

Pero se comprende también que el haz luminoso incidente al atravesar un medio coloreado (una solución de una substancia colorante, por ejemplo) disminuye de intensidad. Y puesto que existe una relación determinada entre la extinción de luz así producida y la cantidad de moléculas absorbentes (concentración de la materia colorante disuelta), es evidente que se podrá deducir la cantidad de ésta según el grado de extinción.

Si se hace variar el espesor ó la concentración de la solución coloreada, se observará:

- 1) Una modificación de las bandas, y

2) Un cambio en las intensidades de las mismas.

Observando siempre bajo el mismo espesor, se podría deducir la concentración de la solución, por el ancho de la banda. Este método es muy poco exacto.

Determinando por el contrario, la intensidad de la zona, se obtiene un método muy sensible y exactísimo de dosaje. Y es precisamente este método el que usa la espectrofotometría.

Las leyes que determinan la absorción de la luz por un medio coloreado han sido descubiertas por Bunsen y Roscoe (1) (1857). Pero su comprobación experimental se verificó en 1873 por Vierordt.

La ley que expresa las variaciones de las intensidades es la siguiente:

La intensidad de la luz transmitida decrece en progresión geométrica, cuando los espesores atravesados crecen en progresión aritmética; ó en términos generales: la intensidad de la luz transmitida es una función logarítmica del espesor.

Sea I la intensidad de la luz incidente; supongamos que después de haber atravesado una solución coloreada cuyo espesor sea igual á la unidad, la intensidad residual ó emergente sea

$$I_r = \frac{I}{n}$$

(1) BUNSEN y ROSCOE. *Photochemische Untersuchungen*. Pogg. Ann. Vol. C, CI, CVIII, CXVIII.

VIERORDT.—*Die Anwendung des Spectralapparates zur Messung*, etc. Tübingen 1871, etc., etc.

Atravesando nuevamente la unidad de espesor, se tendrá

$$\begin{aligned} I'_r &= \frac{I_r}{n} \\ &= \frac{1}{n} \times \frac{I}{n} \\ &= \frac{I}{n^2} \end{aligned}$$

Y si atraviesa e soluciones idénticas de espesor igual á la unidad se tendrá:

$$I_r = \frac{I}{n^e}$$

ó bien

$$\frac{I}{I_r} = n^e. \quad (1)$$

La hipótesis de Bunsen y Roscoe establece como verdadera la constancia de la relación $\frac{I}{n}$ la cual ha sido verificada por la experimentación.

De la ecuación (1) se deduce que la relación entre las intensidades incidentes y residuales es función simple del espesor, única variable del segundo término.

$$I_r = f(e).$$

Si convencionalmente se adopta un valor fijo para la relación $\frac{I}{I_r}$, la variable e indicará el poder absorbente de las diversas substancias.

Si, considerando espesores diversos de una serie de soluciones representados por los valores

$$e = 1, 1/2, 1/3, \dots \dots \frac{1}{\varepsilon}$$

la relación $\frac{I}{I_r}$ tiene siempre el mismo valor, es evidente que las recíprocas aritméticas de los espesores,

$$1, 2, 3, 4, \dots \dots \dots \varepsilon$$

representan los poderes absorbentes.

Bunsen llamó ε , *coeficiente de extinción* en general. Este es, pues, la relación que existe entre la unidad y el espesor.

ε varía, por consiguiente en razón inversa del espesor, tratándose de la misma substancia.

Para dar á ε un valor absoluto, Bunsen y Roscoe adoptaron un valor tal que bajo un espesor igual á $e = \frac{1}{\varepsilon}$ la intensidad luminosa residual fuera igual á $\frac{1}{10}$ de la incidente.

Y si hacemos $I = 1$, el coeficiente de extinción será la recíproca de la cantidad que representa el espesor bajo el cual la intensidad luminosa residual es igual á $\frac{1}{10}$ de la incidente.

Cálculo de ε .—Tomando logaritmos, tendremos de (1)

$$e \lg n = \lg \frac{I}{I_r} \tag{2}$$

ó bien
$$\lg n = \frac{1}{e} \lg \frac{I}{I_r} \tag{3}$$

Por definición

$$I_r = \frac{1}{10} \quad \dot{y} \quad e = \frac{1}{\varepsilon}$$

Luego:

$$n^\varepsilon = n \frac{1}{\varepsilon} \quad \acute{o} \quad \frac{I}{I_r} = 10$$

$$\frac{1}{\varepsilon} \lg n = \lg 10$$

y como

$$\lg 10 = 1.$$

$$\lg n = \varepsilon.$$

Substituyendo este valor de $\lg n$ en (3) se tiene:

$$\varepsilon = \frac{1}{e} \lg \frac{I}{I_r} \quad (4)$$

Haciendo

$$e = 1 \quad \acute{o} \quad I = 1$$

resulta:

$$\varepsilon = \lg \frac{I}{I_r}$$

ó finalmente

$$\varepsilon = - \lg I_r. \quad (5)$$

El coeficiente de extinción es igual al valor negativo del logaritmo de la cantidad que expresa la intensidad luminosa residual'.

La determinación de ε es pues, un problema de fotometría.

Ley de proporcionalidad entre los coeficientes.—Sea dos soluciones de una misma substancia colorante cuyas concen-

traciones diferentes estén en relación $\frac{c_1}{c_2} = p$. La relación p de los pesos de substancia colorante por unidad de volumen es también la del número de las moléculas activas que encuentra el rayo luminoso bajo un mismo espesor de la solución.

Si $\frac{I}{V}$ es la relación de disminución de la intensidad por molécula, y a es el número de moléculas en la primera solución, se tendrá:

$$a \lg V = \lg \frac{I}{I_r} = \varepsilon_1$$

Para la segunda solución, el espesor activo es $p a$ moléculas luego:

$$pa \lg V = \lg \frac{I'}{I'_r} = \varepsilon_2.$$

Dividiendo miembro á miembro:

$$\frac{\varepsilon_1}{\varepsilon_2} = \frac{1}{p} = \frac{C_1}{C_2}$$

ó bien

$$\frac{C_1}{\varepsilon_1} = \frac{C_2}{\varepsilon_2}$$

En general

$$\frac{C_1}{\varepsilon_1} = \frac{C_2}{\varepsilon_2} = \frac{C_3}{\varepsilon_3} = \dots = K.$$

Luego: *los coeficientes de extinción de diversas soluciones de una misma substancia son directamente proporcionales á las concentraciones.*

La constante K , característica de cada substancia, ha sido designada por Vierhor dt con el nombre de: *relación de absorción*; más propiamente podría llamársele: *módulo de absorción*.

Las relaciones anteriores pueden escribirse bajo la forma:

$$C = K \varepsilon.$$

siendo K una constante.

ε depende de c luego el valor c fija un valor á ε .

Unidades adoptadas.—Como unidad de espesor el centímetro.

Por concentración C se entiende el *peso en gramos de materia colorante contenida en un centímetro cúbico de solución*; convención aceptada hoy universalmente, y que fué enunciada por primera vez por Vierhor dt.

Hufner, refería el valor C á la cantidad de materia colorante contenida en 100 cm³ de solución; pero la abandonó luego adoptando la anterior.

Límites de la ley de absorción.—La ley de absorción enunciada es verdadera solamente para luz homogénea, es decir, monocromática.

En efecto: puesto que las materias colorantes absorben en proporciones diferentes las diversas radiaciones del espectro visible, y suponiendo un haz de luz blanca (cuyos colores simples tengan igual intensidad) atravesando una solución es evidente que si I es la intensidad, las reducciones de esta intensidad para los diversos colores podrán escribirse bajo la forma.

$$\frac{I}{n}, \frac{I}{n'}, \frac{I}{n''}, \text{ etc.}$$

La intensidad total emergente será:

$$I_1 = \frac{I}{n} + \frac{I}{n'} + \frac{I}{n''} + \dots\dots\dots$$

que se puede escribir

$$I_1 = \frac{I}{N}$$

Para un espesor doble del anterior las reducciones serán:

$$I_2 = \frac{I}{n_2} + \frac{I}{n'^2} + \frac{I}{n''^2} + \frac{I}{n'''^2} + \dots\dots\dots$$

valor que es diferente evidentemente de $\frac{I}{N_2}$

Es indispensable pues: *emplear luz monocromática.*

Se comprende que en la práctica no es posible emplear luz realmente monocromática; pero se busca de acercarse lo más posible, empleando una zona convenientemente elegida y estrecha del espectro.

Constancia del módulo de absorción.— En el anterior raciocinio hemos sentado como base, que n tiene un valor especial y fijo para cada radiación; luego ε tendrá también un valor especial; y como la concentración C queda constante, á cada radiación corresponderá un valor especial y constante de K . La constante K varía, pues, *con la materia colorante empleada y con la región espectral examinada.*

Relación entre los coeficientes de extinción.— Para una misma solución, se tendrá en dos regiones diferentes del espectro:

$$C = K, \varepsilon_1 = K_2 \varepsilon_2$$

de donde

$$\frac{\varepsilon_1}{\varepsilon_2} = \frac{K_2}{K_1}$$

Para otra solución de concentración C ,

$$C_1 = K_1 \varepsilon_1' = K_2 \varepsilon_2'$$

de donde

$$\frac{\varepsilon_1'}{\varepsilon_2'} = \frac{\varepsilon_1}{\varepsilon_2} = \frac{\varepsilon_n}{\varepsilon_n + 1} = \frac{K_2}{K_1} = \text{Const.}$$

Luego: *la relación entre los coeficientes de extinción correspondientes á dos regiones del espectro para soluciones de la misma substancia es constante; igual á la recíproca de la relación entre los módulos de absorción é independiente de la concentración: es pues característica para cada substancia colorante.*

Análisis cuantitativo.

I). Soluciones que contienen una sola materia colorante.

Determinación del coeficiente de extinción: se reduce esencialmente á una investigación fotométrica.

Consiste en comparar las intensidades luminosas de 2 haces iguales primitivamente, el primero directamente, esto es, sin modificación alguna, y el segundo después de haber atravesado la substancia colorante y deducir la disminución de intensidad sufrida de la relación obtenida empleando siempre luz monocromática.

El aparato usado con tal objeto ha sido designado bajo el nombre de *espectrofotómetro*.

Pero para la medida del coeficiente ϵ han sido empleados varios procedimientos que caracterizan precisamente los diversos modelos de aquellos instrumentos. Describiremos solamente el procedimiento *por polarización por refracción* que es el usado por Hufner en el espectroscopio que lleva su nombre. La polarización de la luz es un excelente método, un exacto principio fotométrico para la determinación de ϵ .

Un sistema compuesto de un nicol, fijo (polarizador) sirviendo de objetivo, y otro móvil al rededor de un eje paralelo al eje óptico del anteojo (analizador), sirviendo de ocular, constituye un aparato fotométrico.

La extinción de la luz que atraviesa el sistema es proporcional al ángulo que forman entre sí los planos de polariza-

ción de los dos prismas entre las dos posiciones extremas (ley de Malus).

Para el ángulo $\alpha = 0^\circ$, la disminución es nula.

Para el ángulo $\alpha = 90^\circ$, la extinción es total.

Por consiguiente, se puede determinar por comparación, la disminución de la luz (que ha atravesado una substancia colorante) disminuyendo la intensidad de la luz primitiva, valiéndose del aparato descrito anteriormente, hasta igualar la de aquella. Del ángulo de rotación del analizador, se deduce, como probaremos en seguida, el coeficiente de extinción, usando la fórmula

$$\varepsilon = - \lg \cos^2 \alpha.$$

En efecto: los nicoles gozan de la propiedad de polarizar la luz por doble refracción, pero dejando pasar solamente el rayo extraordinario, el cual está polarizado en un plano perpendicular al plano de la sección principal; es decir, que las vibraciones OV se hacen en el plano de la sección principal del polarizador.

El ángulo α está formado por OS , que representa la sección principal del analizador, y OV que representa la dirección é intensidad de las vibraciones de la luz.

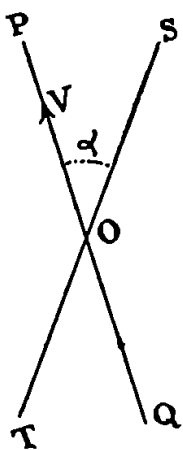


Fig. 1.

Según la ley de Malus, se tendrá para el rayo emergente

$$I_r = I \cos^2 \alpha. \quad (7)$$

Hemos hallado (5).

$$\varepsilon = - \lg I_r.$$

$$I = 1$$

De (7) haciendo

$$I_r = \cos^2 \alpha.$$

De donde

$$\varepsilon = - \lg \cos^2 \alpha$$

$$\varepsilon = - 2 \lg \cos \alpha.$$

Luego: *el coeficiente de extinción de una solución de materia colorante, examinada bajo el espesor igual á la unidad, es igual al doble del logaritmo del coseno del ángulo de rotación del analizador, correspondiente á la igualdad de las intensidades luminosas, tomado con signo negativo.*

Determinación de la constante K.—Es necesario hacer constar que el valor de K difiere sensiblemente con el instrumento empleado.

Hemos obtenido

$$K \varepsilon = C$$

de donde

$$K = \frac{C}{\varepsilon}$$

Para determinar K , es evidente conocer previa y exactamente la concentración C de la solución; y luego el coeficiente de extinción para una región determinada.

El valor hallado servirá para todas las investigaciones ulteriores para esa misma substancia y para la región espectral elegida.

Más adelante veremos el grado de exactitud de la fórmula anterior.

Vierordt ha comprobado que en la extremidad violeta del espectro, el módulo de absorción no es constante debido á la

dificultad de determinar con exactitud el valor de ϵ . Por el contrario, en las regiones más luminosas, la fórmula se verifica con gran exactitud.

Las operaciones esenciales que serán necesario efectuar, son tres:

- 1) Elección de la región espectral.
- 2) Determinación de ϵ .
- 3) Determinación del módulo de absorción.

1) La mejor región espectral es aquella que para pequeñas diferencias de concentración ó espesor, se obtienen mayores variaciones en la absorción de las radiaciones luminosas.

Por consiguiente, será menester hacer un estudio de la marcha de la absorción. Las zonas oscuras indican desde luego las regiones en donde existen un máximo de absorción. Pero la simple observación no basta; en efecto, determinaciones fotométricas prueban que para la oxihemoglobina la absorción es máxima en la región $\lambda = 531.5 - 542.5$, situada en la segunda banda, á pesar de que la primera parezca mucho más oscura. Con mayor razón se efectuará este estudio, si la substancia no presenta alguna zona de absorción. Se determina entonces sucesivamente el coeficiente de extinción bajo espesores variables, en diversos puntos del espectro y se elige, como hemos dicho ya, las regiones más sensibles, aquellas que para pequeñas diferencias de concentración presentan variaciones notables en la absorción.

La región más sensible de la oxihemoglobina es la citada más arriba. Para la mayoría de las substancias, el máximo de absorción está situado en la parte menos refrangible del espectro; y es precisamente en esta parte en donde se verifica con mayor exactitud la ecuación de la ley de absorción.

2) Se deberá elegir la concentración de tal manera que la absorción no sea ni muy fuerte ni muy débil. Para una dilución muy fuerte disminuye la precisión del coeficiente de extinción y la exactitud del dosaje. Soluciones muy concentradas dan zonas muy oscuras, haciendo incierto el valor de α .

La concentración debe ser tal que el valor de la intensidad residual esté comprendida entre 0,15 y 0,60.

Igualada la intensidad luminosa de los dos haces, se calculará ε del ángulo de rotación del analizador por la fórmula

$$\varepsilon = - \log \cos^2 \alpha$$

3) Por fin se determinará K , por la ecuación ya expresada.

Determinación de C.—Conocido el valor de la constante K , para la substancia que se va á analizar y para la región espectral que se va á observar, basta hallar el valor ε , para obtener la concentración C , de una solución cualquiera, aplicando la fórmula $C = K \varepsilon$.

La riqueza en materia colorante de una solución, es igual al producto del módulo de absorción K de esta substancia, determinada una vez para siempre y de una región espectral elegida, por el coeficiente de extinción, medido en la misma.

II). Soluciones que contienen una mezcla de materias colorantes.

Hemos supuesto hasta ahora que la solución contenía solamente una; vamos á ver qué sucede cuando contiene varias.

Consideraciones teóricas hacen prever que si esas substancias no se descomponen, ni tienen acción química, la una sobre la otra es decir que pueden coexistir sin modificación alguna, cada una obrará sobre la luz como si estuviera sola en

la solución; que el coeficiente de extinción de la mezcla será igual á la suma de los coeficientes de extinción que se hallarían si cada una de las sustancias ocupara sola toda la masa del vehículo.

Vierordt ha podido comprobar que la hipótesis anterior se verifica perfectamente.

Por otra parte, sería éste un nuevo método para averiguar si dos ó más sustancias pueden coexistir sin modificación en un disolvente.

Supongamos el caso de dos sustancias colorantes y sea x é y los pesos de las sustancias por cm^3 .

K' y K'' los módulos de absorción respectivamente, para dos regiones determinadas, de una de las materias colorantes, conocidos de antemano.

K_1 y K_2 idem para las mismas regiones, de la otra sustancia. ε' y ε'' los coeficientes de extinción de la mezcla.

De acuerdo con la hipótesis anterior se podrá escribir:

$$\varepsilon' = \frac{x}{K'} + \frac{y}{K''}$$

$$\varepsilon'' = \frac{x}{K_1} + \frac{y}{K_2}$$

de donde:

$$x = \frac{K'K_1(\varepsilon''K_2 - \varepsilon'K'')}{K'K_2 - K''K_1},$$

$$y = \frac{K''K_2(\varepsilon'K' - \varepsilon''K_1)}{K'K_2 - K''K_1}$$

INVESTIGACIÓN DE SUBSTANCIAS COLORANTES INCÓGNITAS.

Caracterización de una materia colorante.— Apoyándonos en lo demostrado anteriormente (relación entre los coeficientes de extinción), para investigar la naturaleza de una materia colorante, bastará determinar los coeficientes de extinción de una solución cualquiera en regiones conocidas, y hallar el cociente de su relación

$$\frac{\varepsilon_1}{\varepsilon_2} = \frac{\varepsilon_1'}{\varepsilon_2'} = \frac{K_1}{K_2} = \text{Const.}$$

la cual caracterizará la sustancia.

Inversamente podrá sentarse: si un líquido sometido á precipitaciones fraccionadas de naturaleza variable, presenta en dos regiones, coeficientes de extinción, cuyo cociente es constante, el líquido no contiene sino una sola materia colorante.

Es también un método precioso y elegante para saber si dos pigmentos de origen diverso, son idénticos ó no.

Caracterización de materias colorantes incógnitas que acompañan á una conocida.—Supongamos tener una mezcla de dos sustancias colorantes. Bastará hallar los valores de ε y de ε' de la solución con concentraciones diferentes: si el líquido contiene una sola materia colorante, los cocientes de las relaciones $\frac{\varepsilon}{\varepsilon'}$, serán sensiblemente iguales; en caso contrario, se procederá al examen de otras regiones, hasta encontrar una de las bandas de absorción característica de la sustancia conocida, la cual se pondrá en evidencia por las variaciones de dicha relación.

Este método servirá también para comprobar, en caso de duda, si al lado de una substancia conocida, existe ó no otra. Tratándose de n materias colorantes, se estudiará la marcha de la extinción de la luz por eliminaciones sucesivas de cada componente (precipitaciones fraccionadas, valiéndose de disolventes neutros, ó reactivos destructores, etc.), de las n substancias hasta $n - (n - 1)$, es decir hasta obtener un valor constante.

ESPECTROFOTÓMETROS

El problema fotométrico que es necesario resolver para la determinación de ϵ , ha sido ya expuesto. Los aparatos empleados con tal fin, se componen esencialmente de un espectroscopio, al cual se le ha agregado un fotómetro. Se han adoptado dos métodos fotométricos.

En el primero, los dos haces luminosos á comparar, después de haber sufrido la polarización á ángulo recto se sobreponen, constituyendo una parte común, la cual se recibe sobre un polariscopio: de aquí *espectrofotómetros de haces superpuestos*.

La igualdad de los dos haces se obtiene, cuando desaparecen las franjas complementarias en la parte común. En este principio se fundan los instrumentos ideados por Jamin, Trannin, Branly, etc.

Los basados en el segundo método, llevan el nombre de *espectrofotómetros de haces yuxtapuestos*, y se caracterizan por la yuxtaposición de las imágenes. Para su comparación se hace variar la intensidad de una de ellas hasta que ambas aparezcan igualmente iluminadas. En este principio están basados los aparatos de Vierordt, Crova, Krüs, Hüfner, etc.

El espectroscopio de hendiduras variables de Vierordt se basa, como lo indica su nombre, en el principio siguiente: la intensidad luminosa de una región espectral es proporcional

al ancho de la hendidura. Krüs lo modificó adaptándole una hendidura de ventanas con movimiento simétrico.

Hüfner empleó primero como aparato fotométrico, un sistema basado en la polarización por reflexión, que luego sustituyó por otro basado en la polarización por refracción. El de Crova es análogo á éste.

Espectrofotómetro de Hüfner

La fotografía adjunta da una idea general del último modelo.

Colimador—Delante de la hendidura espectral se encuentra el aparato polarizador, con sus piezas accesorias. Consta de un sistema de medios transparentes, el cual constituye una de las partes más importantes.

Se encuentra encerrado en una pequeña caja metálica *CM*, fijada al tubo colimador por dos tornillos de presión t_3 y poseyendo un movimiento giratorio al rededor de un centro c_1 , pudiendo ser fijada en un plano anteroposterior determinado por medio de otros dos tornillos de presión.

Un pequeño nicol polarizador, dentro de un cilindro metálico (asegurado con lámina delgada de corcho), mantenido en posición fija y determinada con el tornillo t , puede girar algunos grados de arco, con frotamiento suave, dentro de otro cilindro exterior, fijado al sistema por t_0 t_0 .

En la parte superior se encuentra una lámina de vidrio ahumado h , de unos 70 mm. de largo, 14 de ancho y 4 de espesor, formada de dos cuñas de vidrio, una completamente incolora, y la otra ligeramente ahumada, uniéndose según la

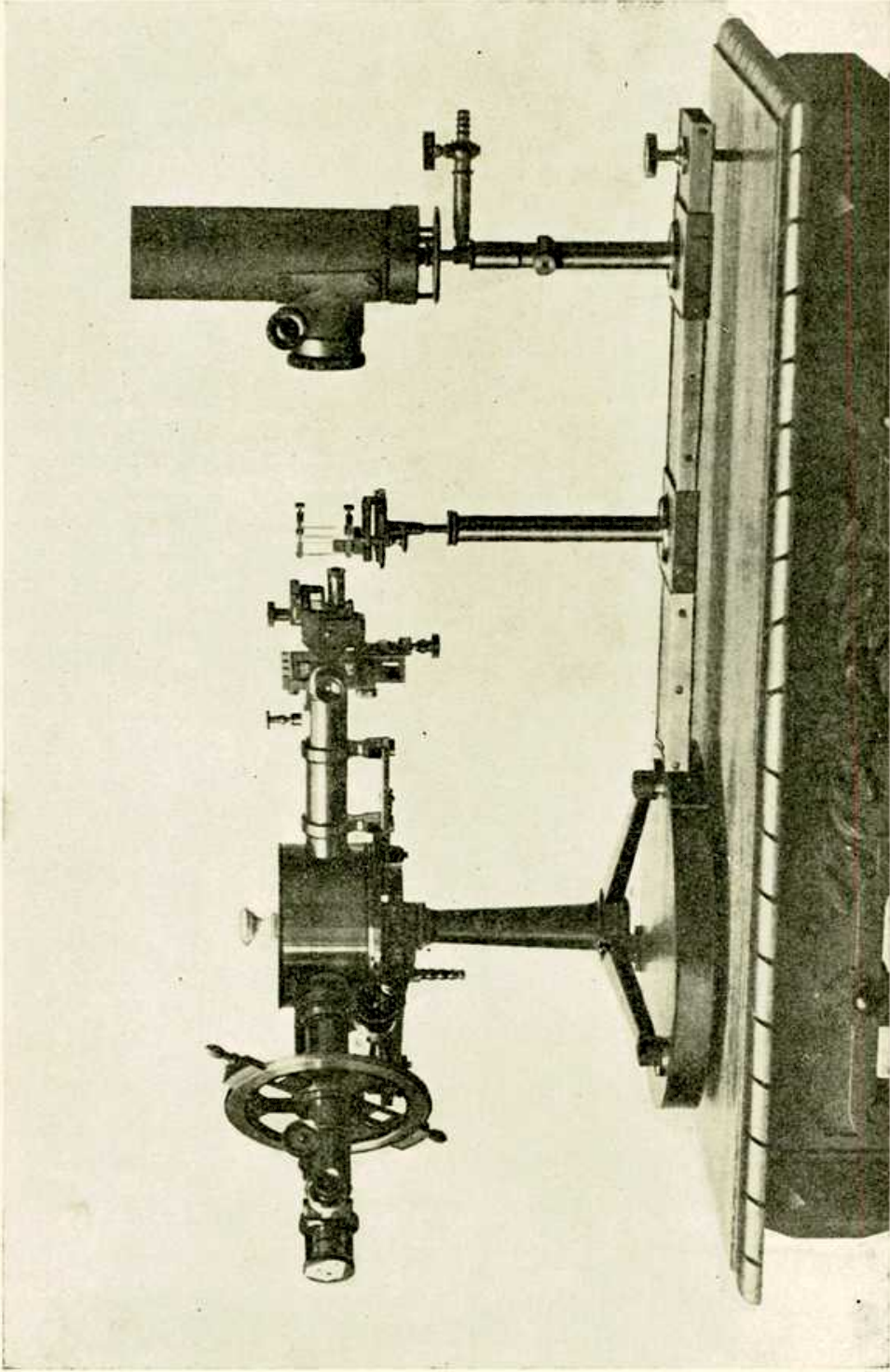


Fig. 2.



diagonal de las caras horizontales y constituyendo así un prisma rectangular. Las cuñas son de ángulo muy pequeño.

La lámina está sostenida por una corredera CM_1 , movable de derecha á izquierda é inversamente mediante un piñón dentado; el movimiento se efectúa paralelamente al plano de la hendidura. Una escala plateada indica el desplazamiento.

La escala comprende 60 divisiones; el 0 corresponde á la parte más clara; el 60 á la más oscura.

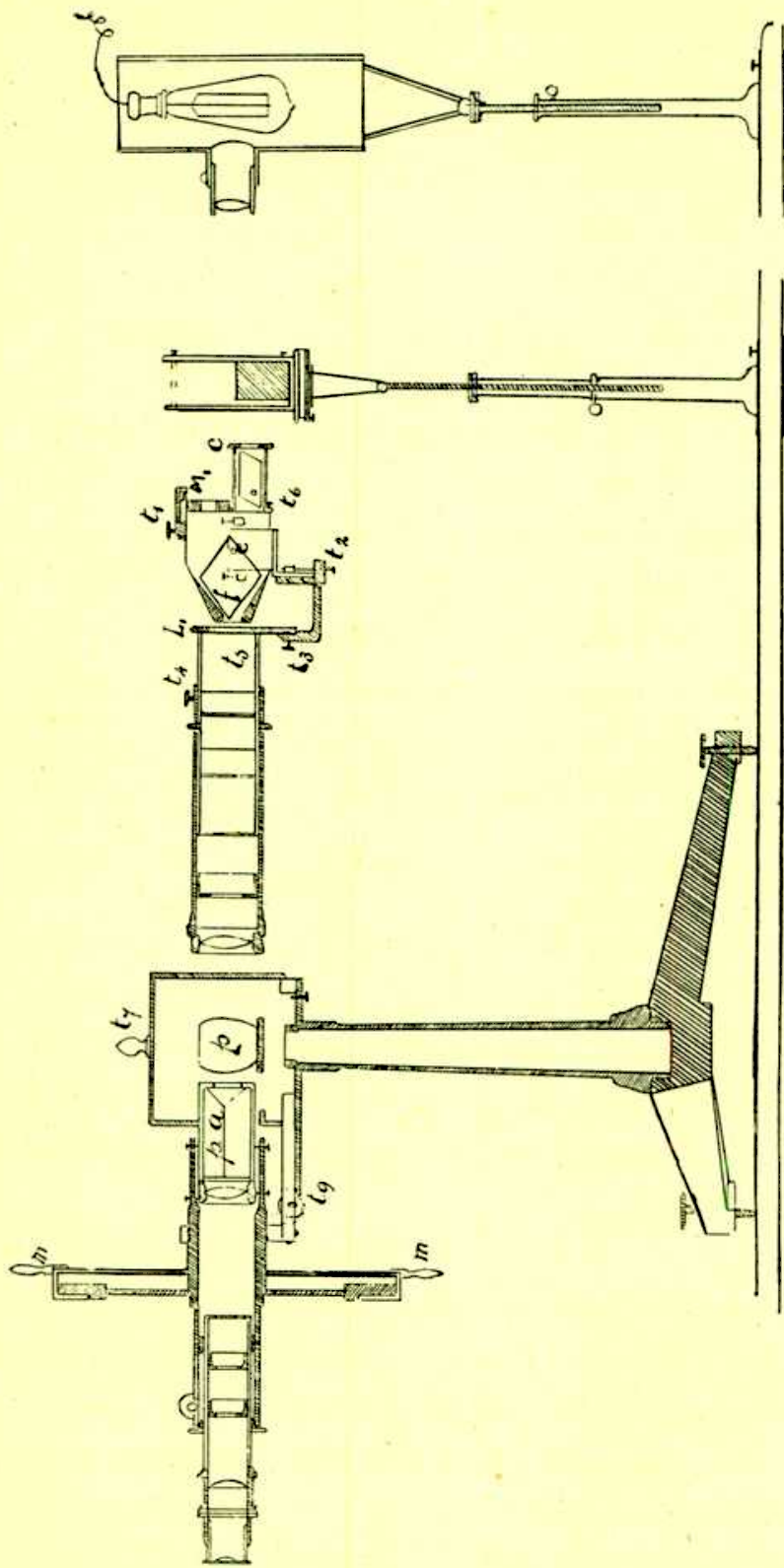
Detrás del nicol y del vidrio ahumado se halla un rombo de flint f , cuidadosamente trabajado y pulido, dispuesto en la forma indicada en la figura; esto es, que las diagonales son, una horizontal y otra vertical; sus aristas paralelas son normales á la vez á la hendidura y al eje del colimador. Una de las aristas coincide sensiblemente con la hendidura misma, la cual queda dividida en dos partes iguales.

Frente al aparato polarizador está la hendidura espectral ú objetiva, la cual está destinada á regular la cantidad de luz que debe penetrar en el instrumento. Está formada de dos diafragmas que terminan en bordes agudos y que se mueven transversalmente; este movimiento se efectúa simultánea y simétricamente gracias á un tornillo micrométrico t_3 , el cual lleva un tambor dividido en 100°.

Como el paso del tornillo es de $\frac{1}{5}$ mm., puede apreciarse

$\frac{1}{500}$ de mm.

El centro de la hendidura queda siempre en la misma posición y en el plano vertical que pasa por el eje del colimador. Este termina en un lente compuesto de aumento, cuyo foco coincide con el plano de la hendidura.



CORTE LONGITUDINAL

Fig. 3.

Prisma. — El prisma de dispersión, equilateral, de flint, de bastante poder dispersivo, está dispuesto sobre una plataforma horizontal, con sus aristas normales á ésta.

Está fijado en posición invariable por medio de un receptáculo triangular metálico, colocado en la plataforma, y de un tornillo de presión t_7 , situado en la tapa de la caja, que actúa sobre un muelle adaptado á la cara interna de la misma.

Anteojo ocular. — Un tubo corto, terminado en sus extremidades por dos lentes, *ligeramente descentradas*, contiene el nicol analizador. Siendo doble este tubo, el nicol que está ligado por medio de piezas accesorias á dos alidadas *mm.* puede girar, alrededor del eje óptico del anteojo.

Las alidadas *mm.* giran en una dirección diametralmente opuesta al anteojo, sobre un círculo graduado vertical; cada cuadrante está dividido en 90° . En la extremidad de las alidadas se encuentran dos verniers que aprecian $\frac{1}{10}$ grado, y

dos pequeños manubrios; cada vernier puede describir un arco de 90° á ambos lados de la posición o la cual corresponde á la coincidencia de las secciones principales de los dos nicoles.

Termina el anteojo ocular en un tubo movable en sentido anteroposterior gracias al tornillo t_8 ; contiene los diafragmas y las lentes oculares.

Los diafragmas oculares, que se pueden desplazar transversalmente, constan de dos hendiduras: una circular, fija, que sirve para ver el espectro total, y otra, de ventanas, que se alejan ó acercan simótricamente; sus limbos son arcos de circunferencia de gran radio, su distancia puede ser graduada (en la limitación de la región espectral) por medio de un tornillo micrométrico terminado en un tambor dividido en 100° .

Se observan los desplazamientos sobre una pequeña escala

dividida en 5 grados (cada uno de medio mm.), puede pues apreciarse 5 micrones.

El diafragma circular posee un retículo (cruz de San Andrés), para la determinación del sitio que ocupan en la escala las diversas radiaciones.

La lente ocular posee un vidrio ahumado para la observación del espectro solar.

Sistema de orientación.—Con el fin de llevar las imágenes de las diversas radiaciones en el campo de la hendidura ocular, existe un sistema que permite hacer girar el anteojo alrededor de un centro, constituido por el centro del prisma.

El desplazamiento angular se efectúa con el tornillo micrométrico t_0 . Este, que gira dentro de un tuerca fija, desplaza al anteojo. Los desplazamientos laterales, pueden ser valuados sobre una escala plateada horizontal y unida al anteojo. Un índice indica el valor angular del movimiento.

La escala está dividida en 40° ; como el tornillo t_0 está provisto de un tambor dividido en 100 partes, se puede determinar 4.000 puntos sobre el espectro.

Además de este sistema de orientación, existe el clásico de Kirchoff: un anteojo que lleva un micrómetro; la imagen de éste, después de reflejarse sobre una de las caras del prisma, cae sobre el anteojo ocular, superponiéndose al espectro de la fuente.

Estativo.—Este está provisto de un brazo rígido, el cual reposa sobre tres brazos pequeños, casi horizontales, y éstos á su vez sobre el banco óptico.

Cuba de absorción.—La cuba de absorción de Schulz es empleada hoy universalmente, para la observación de los

espectros de absorción. (Véase fotografía y corte longitudinal del instrumento).

Está constituida por un cuerpo esmerilado, hueco, en forma de *U* y cuyo vacío está limitado por dos caras planas paralelas, normales á una tercera plana y horizontal.

Dos láminas de vidrio perfectamente transparentes se adaptan exteriormente limitando una cavidad, herméticamente cerrada. Dos muelles, bajo la presión de tornillos, mantienen unidas estas dos placas de vidrio al cuerpo de la cuba.

En la parte inferior de ésta se coloca el cuerpo de Schulz, que consiste en un paralelepípedo de flint de una perfecta transparencia y que queda completamente sumergido en la solución.

Entre las paredes de la cuba, hay una distancia interna de 11 mm., mientras que el espesor del cuerpo anterior es de 10 mm.; luego el espesor de la solución es de 11 mm. en la parte superior, mientras que en la inferior es de 1 mm.

Todo sucede como si el rayo luminoso inferior penetrase directamente en el colimador, y el superior después de atravesar una solución del espesor de 10 mm. (unidad de espesor convencionalmente aceptada).

El estativo que sostiene la cuba de absorción puede ser levantado ó bajado, valiéndose de un tornillo macrométrico. Para los movimientos pequeños lleva otro micrométrico.

Se puede desplazar sobre la regla metálica que hace las veces de banco óptico.

Fuente luminosa.—Se empleaba, en modelos antiguos, una lámpara alimentada con petróleo.

Hoy se usa generalmente una lámpara incandescente, sistema Auer de Welsbach, que presenta todas las cualidades de la luz oxhídrica, luz blanca y estable.

Sirve de chimenea un cilindro hueco, ligeramente cónico, de terracota, llevando en el lado que mira hacia el instrumento, un tubo metálico, el cual contiene á otro terminado en una gran lente en cuyo foco debe encontrarse la fuente luminosa. Un tornillo de gran paso sirve para afocar.

El estativo, que puede levantarse ó bajarse, se desliza sobre el banco óptico.

Hemos empleado con gran ventaja una lámpara eléctrica de filamento metálico de 50 bujías, alimentada con una corriente de 110 volts, colocada frente á la lente.

Cámara obscura.—Para efectuar investigaciones fotométricas es indispensable una cámara perfectamente oscura, en donde no pueda penetrar ningún rayo de luz.

Para la lectura de las rotaciones del analizador se usa otra lámpara eléctrica que se enciende ó apaga á voluntad.

La mesa sobre la cual descansa el instrumento, deberá ser muy pesada y robusta.

MARCHA DE LOS RAYOS LUMINOSOS

He aquí la marcha según el mismo Hüfner:

Sean a , las paredes de vidrio de la cuba de absorción, b el dado de Schulz, c la solución absorbente, d nicol polarizador, e prisma compensador (vidrio ahumado) f , el rombo de flint.

La luz procedente de la fuente, se divide en dos porciones, una inferior r' atraviesa la cuba á la altura del dado b , penetra en el nicol d (en donde se polariza), luego en el rombo f , saliendo por la cara superior para entrar por la hendidura espectral en el colimador y caer sobre el prisma dispersivo; la otra superior r , atravesando la solución de materia

colorante y el vidrio ahumado, cae sobre el rombo f , para salir por la cara inferior, penetrar en el colimador y dispersarse en el prisma.

El límite entre los dos rayos es la arista h del rombo de flint; ésta, está tan cerca de la hendidura g , que se les puede considerar coincidentes, es decir, como si estuviesen en el mismo plano. Su imagen aparecerá pues, como una línea horizontal muy sutil, que divide en dos mitades, superior é inferior, el campo espectral.

Estas porciones pueden variar haciendo uso del tornillo t_2 que desplaza el aparato polarizador en sentido vertical. Tie-

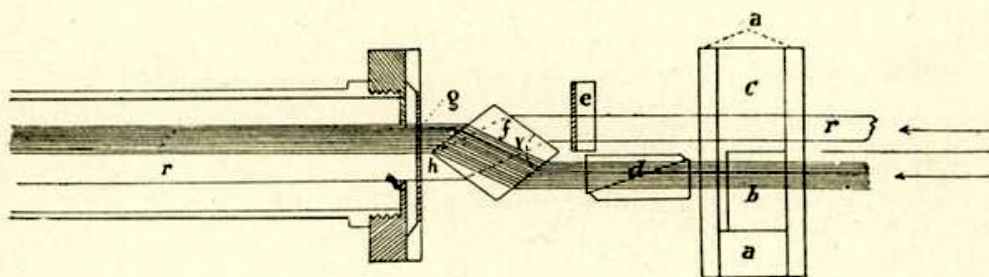


Fig. 4.

ne esto fundamental importancia, porque coincidiendo así, las imágenes de las líneas de Frunhofer, resultan igualmente claras y pueden observarse simultáneamente.

El cuerpo de flint fué propuesto por el mecánico de la Universidad de Tubinga, Eugenio Albrecht.

En un principio, se dió al rombo una posición ligeramente oblicua, porque de lo contrario, los dos espectros yuxtapuestos, aparecerían separados por una línea gruesa y muy oscura, haciendo imposible la comparación exacta de ambos espectros de una región determinada. La línea oscura y gruesa se debe á la luz reflejada sobre las caras del lado in-

ferior, inconveniente que es salvado por la posición oblicua del rombo.

Pero esta disposición tenía un nuevo y grave inconveniente; si por una causa eventual, se movía la pieza de flint, el defecto anterior se volvía á producir; y volverla á su posición primitiva, es de lo más difícil.

Hüfner resolvió por fin el problema, dando al rombo un ángulo inferior tal, que las imágenes de las caras inferiores caían fuera del campo. La modificación de este ángulo es tan pequeña que no trae ninguna influencia perjudicial sobre la reflexión total y la claridad del espectro. En los últimos modelos pues, tiene una posición vertical fija.

Además, gracias á la aproximación sufrida por los haces luminosos, la cara superior del dado de Schulz puede ser desplazado unos dos milímetros en el sentido vertical sin que este desplazamiento haga aparecer la línea sombría y gruesa que separa los dos espectros y que es tan perjudicial para su comparación.

La adición del cuerpo de flint, trajo otro inconveniente: y es que, debido al ángulo de incidencia demasiado grande bajo el cual caen los rayos r y r' sobre dicho cuerpo, sufren éstos una polarización parcial, aún mismo el rayo r que no atraviesa el nicol polarizador. Esta causa de error fué advertida por Braun.

Felizmente, Hüfner, consiguió transformar este defecto del instrumento en ventaja, haciendo de él un compensador de la polarización sufrida por los rayos al atravesar el prisma dispersivo. Y basta para esto, hacer caer el rayo superior r , sobre el cuerpo f bajo el mismo ángulo de incidencia i que sobre el prisma de dispersión: los planos de incidencia forman un ángulo recto, es decir, que el ángulo refringente del

prisma, ha sido colocado á 90° respecto del ángulo h del cuerpo f y el ángulo i es igual al de desviación mínima.

Veamos lo que sucede entonces: el haz r cae en el prisma f bajo el ángulo i y sale con el mismo ángulo; siendo el plano de incidencia vertical, se polariza parcialmente, normalmente á este plano. Como este mismo rayo cae sobre el prisma de dispersión bajo el ángulo i , sale formando el mismo ángulo comportándose por consiguiente como en f . Y como en este caso el plano de incidencia es horizontal, la polarización parcial que sufre es vertical é igual en valor absoluto á la que ha sufrido al atravesar el rombo. El haz á la salida del prisma está polarizado igualmente, en dos planos rectangulares; está pues, formado de luz natural.

Supongamos la luz del rayo r compuesta de partes iguales de luz polarizada, en dos planos perpendiculares, uno vertical, el otro horizontal.

Por hipótesis, sea 18 % la pérdida que sufre la parte de luz polarizada paralelamente al plano de incidencia, al atravesar f ; y 2 % la polarizada normalmente.

En el colimador el rayo estará pues formado de $50 \times \frac{82}{100}$ de luz polarizada verticalmente y de $50 \times \frac{98}{100}$ horizontalmente. Cae sobre el prisma bajo el mismo ángulo; y como el plano de incidencia es horizontal, la luz polarizada verticalmente sufrirá una reducción del 2 %, es decir, igual á $50 \times \frac{82}{100} \times \frac{98}{100}$; la polarizada horizontalmente será igual, por las mismas razones, á $50 \times \frac{98}{100} \times \frac{82}{100}$.

Siendo estas cantidades iguales, el rayo emergente estará constituido, pues, por mitades iguales, de luz polarizada en dos planos normales y por consiguiente será luz natural.

Los rayos que caen paralelamente sobre el prisma, salen

desviados y dispersos; atraviesan el analizador y lentes accesorios que lo hacen converger en un punto en donde se forma la imagen espectral de la hendidura; esta imagen real da otra virtual recta y aumentada, gracias al sistema de lentes con que termina el anteojo ocular.

Por otra parte, los rayos emanados del micrómetro son enviados paralelamente sobre el prisma por un lente en cuyo foco están colocadas las divisiones; son reflejadas por una cara de aquél y enviadas al anteojo ocular en donde se superpone á la de la hendidura.

Los primeros modelos de espectrofotómetros Hüfner presentaban una causa de error muy importante. Y es la siguiente: Supongamos que, observando la llama del sódio, hayamos colocado la raya *D*, amarilla, característica, exactamente sobre la división 100 del micrómetro, con la precaución de tener el analizador en el cero de la escala. Haciendo girar entonces éste se observa un desplazamiento bastante sensible de la raya *D*, cualquiera fuese el sentido de la rotación.

Por consiguiente, si se observa una zona estrecha, ésta variará á medida que se efectúe la rotación.

Es fácil comprender, por otra parte, el fenómeno, si se tiene en cuenta que el nicol deja pasar solamente el rayo extraordinario, el cual se refracta en un plano variable segun el ángulo que hace con el plano de incidencia la sección principal del analizador.

El último modelo está exento de esta causa de error. Tuvo Albrecht la satisfacción de resolver el primero este problema. Y lo consiguió yuxtaponiendo al analizador una lente ligeramente descentrada, que girando al mismo tiempo que aquel, corrige el movimiento de las rayas, produciendo otro igual pero de sentido inverso. A. Kruss, de Hamburgo, ha empleado para el aparato de Hüfner, dos lentes descentradas.

CONDICIONES QUE DEBEN SATISFACER EL INSTRUMENTO Y CADA UNA
DE SUS PIEZAS

El banco óptico, sobre el que reposa el instrumento debe, ante todo, estar perfectamente horizontal.

Intensidad de la fuente luminosa.—La distancia á que debe ser colocada de la cuba de absorción no debe ser menor de 23 cm., según Hüfner. Por otra parte, es necesario impedir la calefacción de la solución, que produce una evaporación del disolvente ó trae una modificación del pigmento; la luz eléctrica no tiene este inconveniente, contrariamente á la luz producida por el kerosene.

La intensidad luminosa debe ser tal que la intensidad residual no sea inferior á un cierto límite, para que sea exacta la determinación de ϵ .

El espectroscopio de Hüfner, permite medidas aun buenas aunque el valor de aquella llegue á ser igual á 0,08 á 0,03, es decir, que es posible el examen de soluciones muy concentradas, cuyos coeficientes de extinción oscilen entre 0.08 y 1,15, por ejemplo.

En general, la constancia en la intensidad de la fuente es indispensable, como también, una vez retirada la cuba de absorción, que los haces luminosos iluminen igual y constantemente las dos mitades, inferior y superior de la hendidura.

Si es de capital importancia que no se produzcan variaciones en la intensidad absoluta de la fuente, lo es más todavía la constancia de la relatividad de los dos haces.

Para obtener dicha constancia he empleado una lámpara eléctrica de 50 bujías, alimentada por una corriente constante de 110 volts, producida por un pequeño dinamo.

Hendidura espectral.—Dos condiciones son indispensables: 1.º que la hendidura espectral sea vertical, normal al banco óptico y á la base del prisma, á la arista h del rombo de flint, el cual debe coincidir con la superficie superior del dado de Schultz; 2.º que sea paralela á la hendidura ocular.

Para llenar estas dos condiciones se hace uso de los tornillos de presión t_4 y t_{10} .

3) El centro de la hendidura debe coincidir con el centro óptico del colimador.

En los nuevos modelos esta condición se verifica siempre: el movimiento de las ventanas es simétrico.

Nicol polarizador.—El plano de polarización de éste debe ser paralelo al del analizador, cuando éste se encuentra en el cero de la escala. Al hablar de este último, diremos cómo se le consigue en la práctica.

Prisma dispersivo.—Es condición indispensable que no se mueva de su posición, porque de lo contrario variarían las posiciones absolutas y relativas de las diversas radiaciones y la extensión del espectro.

Nicol analizador.—Por las consideraciones que hemos hecho al hablar de la marcha de los rayos, se deduce que:

1) El nicol analizador debe estar perfectamente centrado. En caso de no estarlo, se consigue haciendo girar las lentes descentradas, hasta que no varíe la posición de la raya D , por ejemplo, por la rotación del nicol. Se hace la corrección retirando el aparato polarizador.

2) Su plano principal, estando en el cero de la escala, debe coincidir con el del polarizador.

Llena la cuba de absorción de la solución colorante, y con el dado de Schultz, si no se obtiene iguales lecturas en ambos

lados por la rotación á derecha é izquierda, los planos no coinciden.

Para que así suceda, será necesario, hacer diversos tanteos hasta la obtención de igualdad en ambas lecturas. Supongamos que hemos hallado 20° para la rotación á la izquierda y 40° á la derecha, implica que el plano principal del polarizador hace con el cero de la escala un ángulo de $\frac{40 - 20}{2} = 10^\circ$, entorces, colocando el analizador de modo que marque $\frac{40 + 20}{2} = 30^\circ$, se hace girar el polarizador hasta igualar de tinte, y se fija en esa posición con el tornillo *t*. Se comprueba haciendo girar en otro sentido 30° , y empleando otras soluciones.

Si una rotación á la izquierda (en sentido contrario á las agujas de un reloj) del polarizador obscurece la mitad inferior, implica que forma un ángulo con el plano del analizador, á la derecha; si aclara, el ángulo está á la izquierda. Inversamente sucede si la rotación se efectúa á la derecha.

Hendidura ocular.—Debe ser paralela á la hendidura objetiva, y por consiguiente, á las líneas de Fraunhofer y las bandas de absorción.

Dimensiones de la cuba de absorción.—Hemos deducido la relación $c = K\varepsilon$, y por consiguiente, la constancia de K , admitiendo que la determinación de ε se obtiene observando la solución de materia colorante bajo el espesor exacto de 1 cm.

Pero en la práctica, el espesor activo de la cuba no es nunca 1 cm. exactamente. Es necesario, pues, la determinación de las dimensiones de la cuba y del dado con un palmer de alta precisión.

El verdadero valor del espesor activo se obtiene de la siguiente manera: sea a el valor medio de las distancias internas, en la mitad superior de la cuba, b en la mitad inferior, y c del espesor del dado, se tendrá:

$$\text{Espesor activo } E = a - (b - c).$$

Los valores de ε hallados están, pues, afectados de un error, para obtener el verdadero será necesario multiplicarlo por el coeficiente constante de corrección $q = \frac{1}{E}$

$$\varepsilon' = \varepsilon q$$

El factor de corrección para la cuba abierta que hemos empleado es $q = 0,9965$; para cuba cerrada $q = 1,0011$.

CURVA DE TRANSFORMACIÓN DE LOS GRADOS DE LA ESCALA EN LONGITUDES DE ONDAS

Determinando la posición de las principales rayas de Fraunhofer y algunas características de ciertos metales y metaloides, Na , Li , K , Tl , Ru , con el micrómetro ocular y tomando sobre el eje de las x los valores obtenidos, y como ordenadas las correspondientes longitudes de onda (en un sistema ortogonal), y uniendo los puntos que se obtienen por la intersección de las líneas horizontales y verticales correspondiente á cada raya estudiada, por una curva, se tendrá la *curva de transformación de las longitudes de ondas en grado de la escala y viceversa*.

He aquí los resultados obtenidos:

<i>A</i>	= 14,09 =	0,0007680
<i>a</i>	= 14,29 =	7185
<i>B</i>	= 14,68 =	6867
<i>Li^a</i>	= 15,02 =	6706
<i>C</i>	= 15,35 =	6561
<i>D</i>	= 17,17 =	5892
<i>Na</i>	= 17,17 =	5892
<i>Tl</i>	= 19,27 =	5340
<i>E</i>	= 19,66 =	5269
<i>b₁</i>	= 20,05 =	5183
<i>b₂</i>	= 20,12 =	5166
<i>c</i>	= 21,23 =	4956
<i>F</i>	= 21,88 =	4860
<i>Sr_g</i>	= 23,86 =	4607
<i>C</i>	= 27,23 =	4307
<i>Ru</i>	= 28,90 =	4200
<i>h</i>	= 30,89 =	4100

Estos resultados traducidos en el sistema ortogonal dan la siguiente curva:

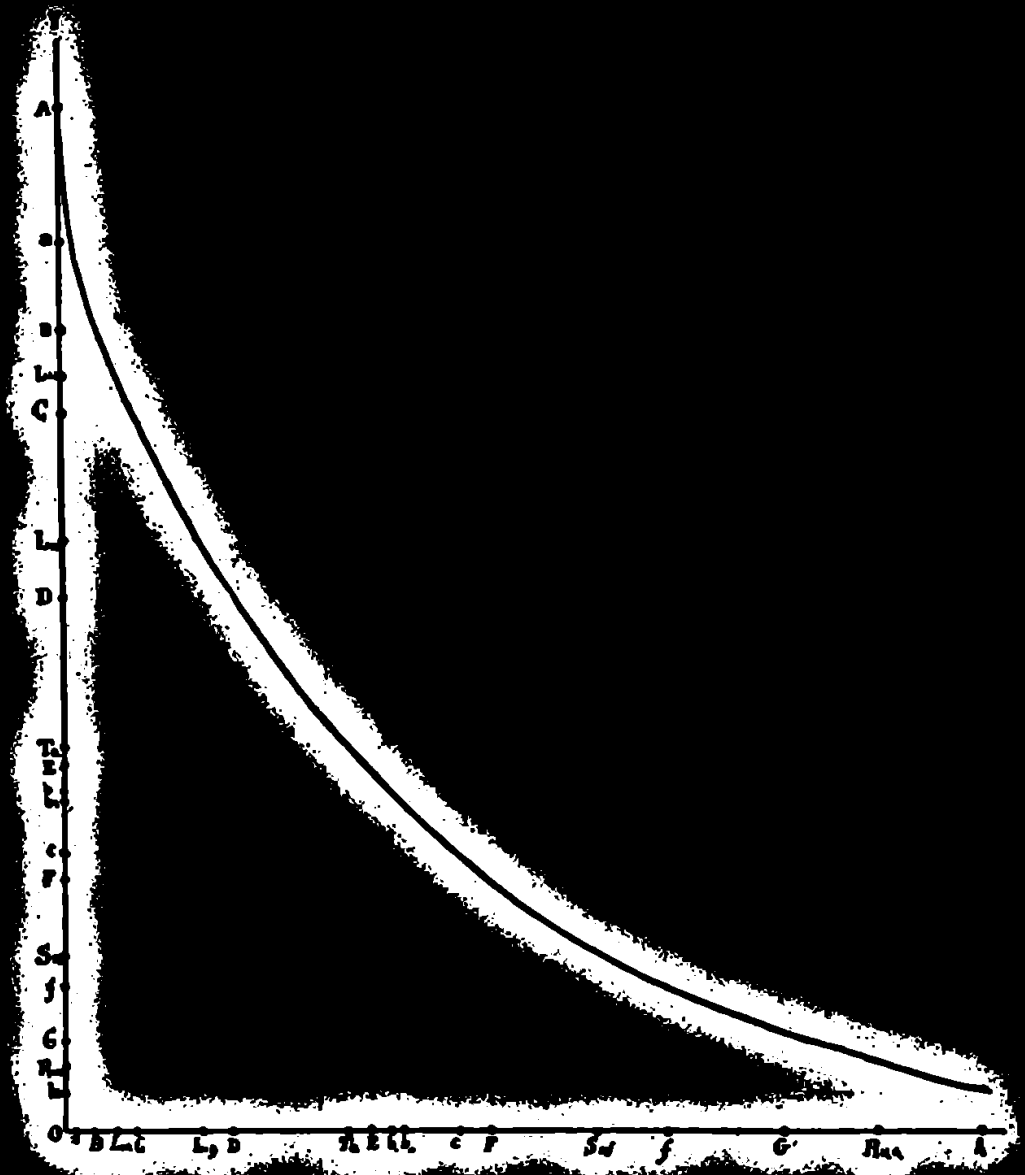


Fig. 6

Modo de indicar una región espectral. — El mejor modo de indicarla es referirla á la longitud de onda correspondiente; por ejemplo: las zonas entre las rayas *D* y *E* se designará:

$$\lambda = 0,5888 \mu - 0,5269 \mu \quad \text{ó} \quad \lambda = 0,5888 \mu - \lambda = 0,5269 \mu$$

Pero en las operaciones de espectrofotometría se usa la nomenclatura de Stokes, más sencilla aunque menos exacta que la presente.

Divide el intervalo que media entre dos líneas principales de Fraunhofer en 100 partes iguales y designa la posición de las zonas por la posición de las líneas que la limitan expresadas en grados de la nueva escala. Por ejemplo, las bandas

$$B \ 53 \ C - B \ 67 \ C$$

$$D \ 90 \ E - E \ \text{etc.}$$

Para la región *B—C*, por ejemplo, Stokes supone 0° en *B* y 100° en *C*. Como la raya *B* corresponde en la escala micrómetro ocular á 14,68 divisiones y la *C* á 15,35, el espacio *B—C* corresponderá á $15,35 - 14,68 = 0,67$ divisiones. Luego un grado de la escala de Stokes corresponderá á $\frac{0,67}{100}$ grados de la escala del micrómetro del antejo ocular. La posición de la línea límite *B 53 C* de la primera zona será:

$$14,68 + \left(\frac{0,67}{100} \times 53 \right) = 15,03$$

y la posición de *B 67 C* será:

$$14,68 + \left(\frac{0,67}{100} \times 67 \right) = 15,13$$

La línea media de la misma banda será:

$$14,68 + \left(\frac{0,67}{100} \times \frac{67+53}{2} \right) = 15,08.$$

VALOR DE LAS DIVISIONES DE STOKES
DE UNA REGIÓN DETERMINADA EN FUNCIÓN DE LAS DE LA ESCALA
DEL DIAFRAGMA.

Para determinarlo se procede así: sea la región $D - E$.

El punto de cruce del retículo se lleva á la posición D 50 E (en nuestro espectroscopio á la división $17,17 + \frac{2,49}{100} \times 50 = 18,41$) por medio de t_p . Se hace correr el diafragma de ventana á la derecha hasta el tope de detención. Si el tambor marca 0° , el eje de la hendidura coincide con el punto medio del intervalo $D - E$.

Haciendo deslizar las ventanas simétricamente hasta que los bordos coincidan con D y E , se lee la rotación que fué necesaria imprimir al tambor.

Una simple proporción indicará los valores de las divisiones de Stokes en función de las de la escala del diafragma.

En el espectroscopio hemos encontrado:

1 div. Stokes	=	0,0222	divisiones	escala	ocular.
1 div. esc. diaf. ocular	=	0,63	div. esc.	anteojo	ocular.
1 div. Stokes	=	0,0352	div. esc.	diaf.	
1 div. esc. diaf. ocular	=	28,4	div. Stokes.		

DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE EXTINCIÓN. — ARREGLO
Y MANEJO DEL INSTRUMENTO.

Sea determinar el coeficiente de extinción de una solución de oxihemoglobina de concentración, exactamente conocida y de una región determinada. La solución debe tener una concentración tal que la intensidad residual no sea inferior á $\frac{1}{10}$ de su valor primitivo. Es inútil agregar que debe operarse en una cámara perfectamente oscura.

Se coloca la cuba de absorción perfectamente limpia y transparente sus caras, sin el dado, llena de la solución, en su estativo, frente mismo al polarizador y tocándolo, de manera que una vez sumergido el dado, éste ocupe exactamente el círculo exterior del cilindro que contiene el nicol.

El vidrio ahumado y el analizador deben marcar *O* en sus respectivas escalas.

La línea de separación de ambos espectros debe ocupar el medio de la altura del campo, consiguiéndolo con el tornillo t_2 .

La hendidura deberá ocupar en el sentido antero-posterior una posición tal que se obtenga una perfecta visibilidad y claridad del espectro; esta posición debe mantenerse siempre fija.

Situada la fuente luminosa á unos 25 cm., se arregla la lente biconvexa de tal manera, que caiga sobre el instrumento un haz de rayos paralelos al eje del colimador. La intensidad de la fuente debe ser constante.

Para evitar la luz difusa conviene encerrar la lámpara dentro de una caja.

El ángulo α que será necesario hacer girar el analizador, aumenta ó disminuye según que disminuya ó aumente la intensidad relativa de la luz que atraviesa la solución coloreada con respecto á la que atraviesa el polarizador. Es indispensable pues que exista igualdad de intensidad en los dos haces primitivos. Y se comprende fácilmente que esto puede ser debido á que la lámpara esté demasiado baja ó alta.

Se regulará la altura, hasta que los dos haces sean iguales en lo posible; como rigurosamente no se puede conseguir, se trata que el haz inferior sea un poco menos intenso que el superior; fija la lámpara se establece la igualdad con el vidrio ahumado.

Para comprobar la perfecta igualdad se hace girar el analizador y se trata de volver al punto de partida 0° , corrigiendo la posición del vidrio hasta conseguirlo.

Para obtener una máxima claridad conviene observar con la más pequeña abertura posible de la hendidura. Se comprende que esta mínima abertura tiene un límite, pues la claridad y la intensidad son cualidades opuestas en este caso; sucede algo así como la oposición entre las dos condiciones de sensibilidad de un termómetro: ambas se limitan. Además dependerá de la intensidad residual. En una serie de observaciones sobre el mismo argumento, es indispensable mantener constante la abertura de la hendidura.

Es necesario ahora limitar con los diafragmas oculares la zona espectral elegida, cuyo correspondiente coeficiente de extinción se investiga. Sea por ejemplo limitar la zona D 63 E — D 84 E . Hemos hallado ya que una división Stokes es igual á $\frac{2.49}{100}$ divisiones de la escala del antejo ocular para la región D — E .

$$(E = 19,17) - (D = 17,17) = 2,49.$$

El punto medio de la región será: $D \frac{63 + 84}{2} E$, es decir, corresponde á $17,17 + \left(\frac{63 + 84}{2} \times \frac{249}{100} \right) = 19,00$ divisiones de la escala del antejo, posición que debe ocupar este. El cruce de los hilos del retículo, indica precisamente ese punto medio.

Se hace correr el diafragma á la derecha hasta el tope de detención.

Falta ahora determinar la rotación del tambor de aquél. Una operación previa nos ha mostrado que una división Stokes de la región $D - E$ es igual á 0,0395 divisiones de la escala del diafragma; luego $84 - 63 = 21$ div. Stokes (ancho de la zona) será igual á $21 \times 0,0395 = 0,83$ div.; y como el movimiento de las pantallas es simétrico, la rotación del tambor será $\frac{0,83}{2} = 0,415$.

Se apagan todas las luces accesorias, se oculta perfectamente la proveniente de la fuente luminosa; se hace girar entonces el analizador hasta obtener igualdad en las intensidades de los dos espectros yuxtapuestos.

Si α es el ángulo de rotación, se tendrá:

$$\varepsilon = - \lg \cos^2 \alpha.$$

que corregido por las no exactas dimensiones de la cuba, será

$$\varepsilon' = \varepsilon q.$$

Creo necesario hacer algunas observaciones que el profesor Gallerani ha expuesto con suma claridad y que son de capital importancia.

El determinar exactamente el momento en que ambos espectros poseen igual intensidad es difícil y sólo se consigue con una larga experiencia.

Es muy conveniente limitar lo más posible la abertura del ocular, adaptándole una pantalla de fino cartón atravesada de un pequeño agujero que coincida con el centro de la lente. Se practica con una aguja llevada al rojo, para obtenerlo con bordes bien netos. La razón es que, si el centro de la pupila ocupa un punto periférico de la lente, se obtienen valores de α que difieren de los que se obtienen cuando ocupa el centro mismo.

Para evitar el cansancio de la vista debe observarse teniendo los dos ojos abiertos. Debe reposarse de vez en cuando para devolver á la retina su primitiva sensibilidad.

Para alcanzar la igualdad de tintes, deberá hacerse girar el analizador con un movimiento *lento y uniforme*, es decir, sin detenciones ni marchas bruscas.

Si por ejemplo el verdadero valor de $\alpha = 70^{\circ} 20'$, para la solución estudiada para obtener este valor se deberá hacerlo girar en ambas direcciones, es decir, de 0° á 90° y de 90° á 0° hasta alcanzar un valor común.

Y para alcanzar la exactitud que nos da el método, es indispensable hacer numerosas determinaciones de α .

Sensibilidad y exactitud del método.—Se determina la primera de estas condiciones, determinando los errores relativos de los resultados que se obtienen como valores de K , ϵ y c .

« El grado de exactitud que comporta este método depende: 1.º de la exactitud con que se puede determinar la constante K y del coeficiente de extinción; 2.º del grado de precisión que se alcance en la preparación de las soluciones. »

« Los aparatos que han sido estudiados con más cuidado bajo el punto de vista de las causas de error que comporta su uso, son los de Vierordt y Hüfner. Los aparatos de este género permiten en general apreciar la igualdad de intensidad de dos zonas con una aproximación que varía de $\frac{1}{50}$ á $\frac{1}{100}$. Es en la región amarilla en donde la sensibilidad es máxima. Disminuye mucho en la violeta. La intensidad absoluta de los rayos á comparar parecen tener menos influencia. Debe ser elegida de tal manera, que el ojo pueda soportar los repetidos exámenes sin cansancio. Parece, por otra parte, que hay para cada color espectral un valor absoluto de las intensidades observadas, para las cuales la sensibilidad es máxima.»

«Admitamos que la aproximación media de la observación fotométrica sea de $\frac{1}{80}$. Se concibe desde luego que las soluciones más concentradas, es decir, que ejercen un efecto absorbente más enérgico, se prestan á determinaciones más exactas. En efecto, Vierordt ha comprobado experimentalmente que las más pequeñas diferencias relativas de concentraciones aún reveladas por el espectrofotómetro, están en razón inversa de éstas. Además, á concentraciones iguales, las materias colorantes ejercen efectos absorbentes de intensidad muy variable, lo cual quiere decir que su espectro es más ó menos favorable á determinaciones cuantitativas exactas. En fin, la preparación de líquidos titulados, comporta igualmente una exactitud variable según la alterabilidad de la substancia, las condiciones de su preparación al estado de pureza, etc.»

«Por estas razones conviene estudiar el valor del método en cada caso particular: para cada substancia y para con-

centraciones muy diversas, para comprender los casos que presenta practicamente el dosaje de la substancia.»

«Este estudio ha sido hecho con mucho cuidado para la oxihemoglobina por Hüfner y sus alumnos. Otto, que ha estudiado nuevamente esta cuestión, ha encontrado para

$$K_o = 0,001880 \pm (0,64 \%)$$

$$K'_o = 0,001403 \pm (0,92 \%)$$

Se puede pues, afirmar, que las constantes determinadas lo son con una exactitud muy suficiente, y por consiguiente, la determinación de ϵ es susceptible de una gran precisión. En fin, si se tiene un cuidado muy minucioso en la dilución, operando con pipetas calibradas con el mercurio, se llega á resultados, cuyos errores oscilan entre 1 y 1,20 gramos por cien de hemoglobina. Sobre los 14 gramos de hemoglobina que contienen 100 cm³ de sangre en el hombre, se cometerá pues con el aparato Hüfner, un error medio de 0,14 á 0,16 gramos.

« Los aparatos de haces yuxtapuestos, sobre todo el de Hüfner, conducen pues á resultados notables.»

Hüfner ha llegado á las siguientes conclusiones:

1.º El grado de exactitud que puede obtenerse es tanto mayor cuanto más concentradas son las soluciones.

Es evidente que esta concentración tiene un límite el cual depende de la intensidad luminosa de la fuente.

2.º Los resultados obtenidos son tanto más exactos cuanto mayor capacidad de absorción tienen las substancias colorantes.

Hemoglobina y derivados

CARACTERES ESPECTROSCÓPICOS Y CONSTANTES

En el estudio y observación de los espectros de absorción de las materias colorantes se usa como fuente luminosa la que produce un intenso espectro continuo.

No todas las sustancias gozan de la propiedad de suministrar bandas de absorción, las cuales se caracterizan por su forma y posición.

Las observaciones se hacen colocando los líquidos en cubas ó frascos de caras normales, ó en cubas prismáticas que permiten examinarlos bajo espesores variables.

Las posiciones de las bandas se determinan con relación á las líneas de Fraunhofer ó longitudes de ondas.

Muy cómodo es usar las cubas de Schulz empleando, en vez del dado, un prisma alargado rectangular.

Oxihemoglobina. — Mientras está unida al estroma globular presenta 2 bandas espectrales de absorción: α ($\lambda = 575$) y β ($\lambda = 535$).

Estas bandas α y β situadas entre el amarillo y el verde, entre las rayas *D* y *E* están separadas por un espacio amarillo verdoso, son características y fueron descritas por Hoppe-Seyler y Stokes. La más cercana á la raya *D*, es más

angosta, pero de borde más netos que la otra. Además, aparece oscura toda la extremidad violeta hasta la raya *F*.

El aspecto cambia empleando soluciones más ó menos concentradas ó mayores espesores.

Para representar gráficamente estas variaciones, se procederá de la siguiente manera: Se llevará las longitudes de ondas sobre el eje de las abscisas y las concentraciones ó espesores sobre el eje de las ordenadas; la figura siguiente trazada por Rollet muestra estas variaciones.

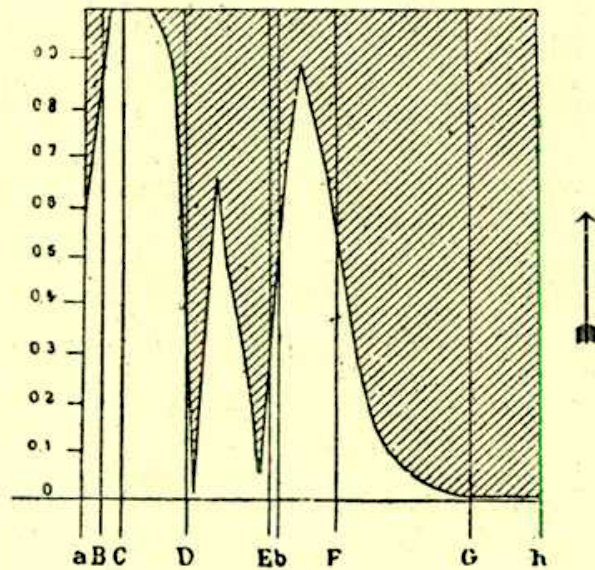


Fig. 7.

Desplazando una línea recta paralelamente á *ha* en el sentido indicado por la flecha, se obtienen sucesivamente todos los espectros que se observan con soluciones de concentración crecientes examinadas bajo un espesor de 10 mm.

Para concentraciones débiles 0,003 %, aparece solamente la banda α ($\lambda = 575$). Para mayor concentración se hace visible la β ($\lambda = 535$) y la extremidad violeta empieza á oscure-

cerse. Luego, las bandas se ensanchan de más en más, pero la primera mucho más lentamente que la segunda.

Bajo un espesor suficiente (observación hecha en largos tubos de Etard), se nota una tercera banda ($\lambda = 634$) que es debido probablemente á una débil cantidad de metemoglobinina. Bajo espesores muy considerables se reúnen las bandas α y β , limitadas por bordes rojo uno y verde el otro. En fin, la banda que se inició en el violeta se une á la anterior y el espectro se reduce á la región del rojo.

Las líneas medias de las bandas α y β son sensiblemente constantes, para α , $\lambda = 577,5$. y para β , $\lambda = 539,5$. Estas longitudes de ondas limitan una región espectral que corresponden en la notación de Stokes-Vierordt á la zona *D 15 E* — *D 73 E*.

La zona *D 32 E* — *D 53 E* ó sea $\lambda = 569 - 556$ elegida para el examen de la sangre, se encuentra entre las dos bandas y muy cerca de la línea media del intervalo; esto es, en una región en donde la absorción es un mínimo. *D 73 E* es la línea media de la zona *D 63 E* — *D 84 E* ($\lambda = 550 - 537$).

Estas zonas, especialmente la segunda, son las que presentan mayor ventaja para el examen espectrofotométrico, y han sido elegidas por Hüfner después de pacientes y largas observaciones.

Lambling ha investigado la marcha real de la absorción, sirviéndose del aparato de Trannin. He aquí los resultados obtenidos con una solución al centésimo de sangre de caballo y observada bajo la unidad de espesor.

Regiones espectrales	Intensidad residual	Regiones espectrales	Intensidad residual
640 — 606	93	558 — 554	15
606 — 597	83	554 — 551	12
597 — 592	70	551 — 548	10
592 — 589	55	548 — 545	7
589 — 584	33	545 — 536	5
			(2. ^a banda).
584 — 580	16	536 — 533	6
580 — 576	7	533 — 530	9
576 — 570	4	530 — 524	12
	(1. ^a banda).		
570 — 565	8	524 — 522	15
565 — 562	12	522 — 517	21
562 — 558	14	517 — 510	25

E. Cherbuliez ha representado gráficamente la absorción, en función de las longitudes de onda, de acuerdo con las indicaciones de Vierordt, usando el aparato de Dupré.

Se determinan las fracciones de luz absorbidas á intervalos pequeños y regulares. Se comprende que, si la absorción es grande, las observaciones se harán bajo pequeños espesores; si es débil, bajo un espesor mayor.

Las longitudes de onda han sido llevadas sobre el eje de las x ; y las fracciones de luz absorbidas sobre el eje de las y . La curva gruesa C_1 corresponde á una concentración de 0,616 gramos de oxihemoglobina por mil gramos de solución; las otras llevan un índice C_3 , $C_{1/2}$, etc que dan la concentración de la solución, tomando como unidad C_1 .

Es importante hacer notar que los resultados obtenidos pueden variar sensiblemente según el instrumento empleado.

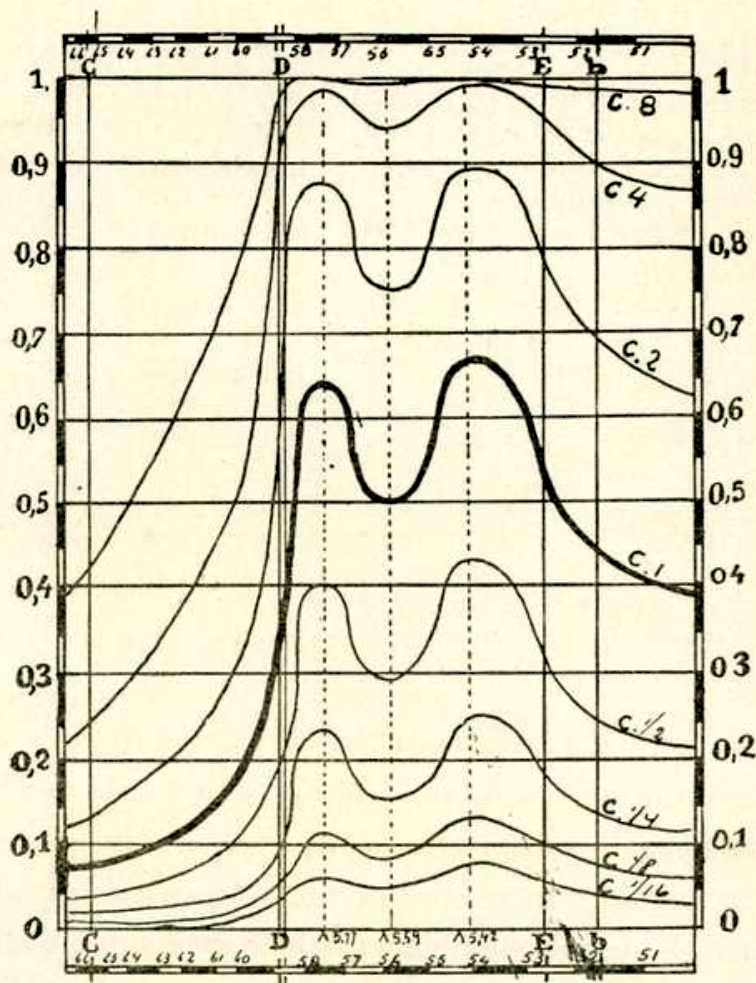


Fig. 8.

El siguiente cuadro, tomado de Lambling « Sang et respiration », da una idea de las constantes de absorción K obtenidas por los diferentes autores.

Naturaleza del aparato	Origen	K_0	K'_0	$\frac{K_0}{K'_0}$	Observaciones
Aparato de Hüfner					
1 ^{er} . modelo ...	Perro	0,001324	0,001000	1,324	Von Noorden
id. ...	Caballo	1360	1031	1,325	Bücheler
id. ...	Ratón	1491	1105	1,349	Von Noorden
id. ...	Cobayo	1395	1027	1,357	—
2 ^o . modelo ...	Perro	1880	1403	1,339	J. Otto
Aparato de Vierordt ...	id.	1426	1049	1,359	Lambling
id. ...	id.	1443	1076	1,341	id.
id. ...	Caballo	1448	1085	1,335	J. Otto

Se notará que á pesar de estas variaciones, la relación $\frac{K_0}{K'_0}$ no varía sensiblemente con los diversos aparatos.

Hemoglobina. — Para obtenerla, se vierte en una solución concentrada de sangre, un volumen de sulfhidrato de amoníaco igual al volumen de aquella, empleando como disolvente una solución de carbonato de sodio al milésimo; se vierte en una cuba de Schulz herméticamente cerrada, hasta llenarla por completo.

La transformación se opera lentamente. Al cabo de cierto tiempo se ve desaparecer poco á poco los bordes, mientras que el espacio intermedio se oscurece para formar al fin una sola banda oscura, ancha, mal definida, cuyo punto medio es $\lambda = 554$: es la banda de Stokes.

Las dos extremidades del espectro ocupan una extensión más ó menos grande según el espesor y la concentración. Además existe una absorción mayor en la extremidad del rojo y menor en el violeta que la producida por la oxihemoglobina. El punto medio de la banda de Stokes, $\lambda = 554$ no coincide con la 1.^a zona de Vierhordt. El inconveniente es pequeño, pues la banda es muy ancha y la absorción varía muy poco en la vecindad de su punto medio.

La segunda banda por el contrario, tiene una posición poco ventajosa.

La siguiente figura gráfica, debida á Rollet, muestra las variaciones que presenta el espectro de la hemoglobina con concentraciones crecientes.

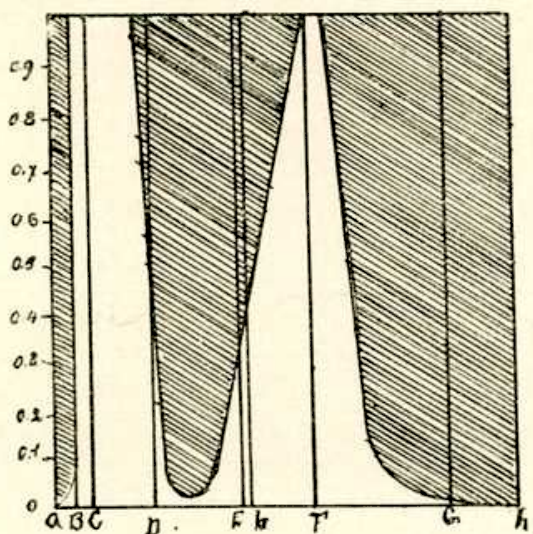


Fig. 9.

Una particularidad interesante es la que ha puesto de manifiesto Hoppe-Seyler: cuando á una solución muy diluída, pero que sin embargo sean visibles las bandas α y β , aunque débiles, se agrega sulfuro de amonio, no se apercibe comple-

ta ó muy difícilmente la banda de Stokes. Luego, pues, si se tiene una mezcla de oxi y hemoglobina, la presencia de aquella será revelada por las dos bandas, examinando la so-

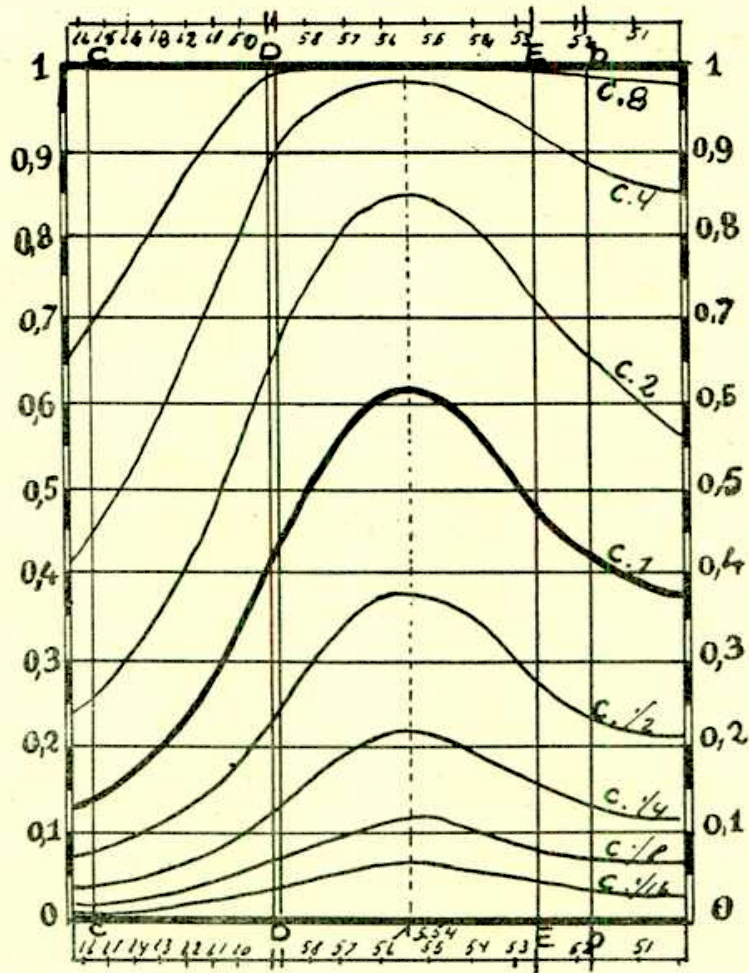


Fig. 10.

lución bajo débiles espesores, y ésta por la fuerte absorción en la región situada entre las dos bandas.

El gráfico (Fig. 10), debido á Cherbuliez, representa la

absorción de la luz para las diversas regiones del espectro.

El estudio fotométrico fué hecho por Vierhordt y luego por Hüfner y sus alumnos. En el cuadro siguiente K_r y K'_r designan las relaciones de absorción de la hemoglobina para las regiones $D\ 32\ E - D\ 54\ E$ y $D\ 63\ E - D\ 84\ E$.

Naturaleza del aparato	Origen	K_r	K'_r	$\frac{K_r}{K'_r}$
Apar. de Hüfner (1. ^o modelo)	Perro	0,001091	0,001351	0,807
id. de id. (2. ^o id)...	id.	1543	1895	0,814
Apar. de Viernordt	id.	1184	1453	0,815

Carboxihemoglobina. — Para prepararla, se agita una solución de sangre al 1 % en volumen (como disolvente carbonato de sódio al 1 ‰) con CO hasta saturación: adquiere un tinte rojo cereza más claro que la de la oxihemoglobina, coloración que persiste mucho tiempo: resiste á la putrefacción más enérgica.

El espectro de absorción se asemeja mucho al de la oxihemoglobina; á concentración igual las dos bandas de la carboxihemoglobina son más pálidas y sus bordes más difusos. El espacio intermediario es más oscuro; las dos bandas están desplazadas un poco hacia el violeta con respecto á las α y β .

Según Joderholm los puntos medios son $\lambda=572$ y $\lambda=532$.

El medio de la segunda banda coincide sensiblemente con la segunda zona espectral elegida, mientras que la primera coincidiendo con la α , se encuentra en una posición, en donde

la absorción varía muy rápidamente y por consiguiente des-ventajosa. Los máximos de absorción corresponden:

$$\lambda = 569 \text{ y } \lambda = 538.$$

Las constantes de absorción halladas por Bücheler y Kulz para las regiones ya nombradas, son:

	K _{co}	K' _{co}	$\frac{K_{co}}{K'_{co}}$
Sangre de caballo.....	0,001124	0,000999	1,13

Metahemoglobina.—Para obtenerla pura, es necesario, según Henninger, partir de la hemoglobina reducida. Se somete repetidas veces y alternativamente, una solución de 0,615 gramos por mil gramos de solución de oxihemoglobina á una corriente de hidrógeno y al vacío.

Conseguida la reducción, se trasvasa sin contacto con el aire á una cuba de Schultz cerrada, llena previamente de CO₂ y canteniendo un cristal de ferricianuro de potasio.

El espectro debe ser examinado en medio neutro ó muy ligeramente ácido. Da 4 bandas bajo un espesor conveniente.

1.º Una banda entre *C* y *D*, en el rojo, y cuyo punto medio es $\lambda = 633$ perfectamente neta, y más cerca de *C*.

2.º Dos bandas entre *D* y *E* cuyos centros están en $\lambda = 580$ y $\lambda = 538,5$ ocupando la posición de las 2 de la oxihemoglobina.

3.º Por fin otra banda, muy ancha, algo difusa, cuyo centro es $\lambda = 500$, visible solamente con soluciones muy diluidas.

Si se agrega una solución recién preparada de Na Fl puro, á una solución de sangre metahemoglobisada, se observa un

desplazamiento de la banda $\lambda = 633$, en el rojo, hacia la derecha apareciendo más intensa aún: su centro es $\lambda = 612$; se llama *banda de Menzies*. Este desplazamiento es característico y de una sensibilidad extrema.

Las bandas $\lambda = 530$ y $\lambda = 538,5$ han sido muy discutidas. Joderholm las consideraba como pertenecientes á la metahemoglobina, pero Hoppe-Seyler las atribuía á un resto de oxihemoglobina.

Henninger trató de demostrar la opinión vertida por éste de la siguiente manera: A medida que la transformación de oxihemoglobina se acentúa y se hace más completa en metahemoglobina, va disminuyendo la intensidad de las dos bandas; y más aún, tales bandas desaparecen por completo si se prepara ésta partiendo de la hemoglobina reducida.

Si Bertin-Sans ha tratado en vano de justificar el pretendido espectro de cuatro bandas, los últimos trabajos de Araki y de Dittrior han confirmado plenamente los resultados de Hoppe-Seyler, etc.

El espectro es algo semejante al de la hematina; pero en solución difiere bastante. Agregando una ó dos gotas de potasa, la banda en el rojo desaparece, reemplazándola otras tres bandas: dos situadas entre *D* y *E* (que coinciden y pueden confundirse con las α y β) y una tercera pálida antes de *D*. Los centros de estas tres bandas son $\lambda = 603$, $\lambda = 578,3$, $\lambda = 538,5$.

Las constantes de absorción halladas son para las regiones $\lambda = 554 - 565$ y $\lambda = 531,1 - 542,5$.

$$\text{Caballo} \quad K_m = 0,002052 \quad K'_m = 0,001729 \quad \frac{K_m}{K'_m} = 1,187$$

$$\text{Buey} \quad \text{»} = 0,002030 \quad K'_m = 0,001770 \quad \text{»} = 1,176$$

Hematina.—Para prepararla se calienta á baño maría 20 cm³ de sangre y 40 cm³ de agua adicionada de 2 cm³ de ácido acético glacial; luego se filtra.

Las soluciones ácidas absorben débilmente las radiaciones de gran longitud de onda; por el contrario, fuertemente la extremidad violeta.

Presenta una banda entre *C* y *D*, de bordes netos, pero cuya posición puede variar según el ácido empleado; para el H₂SO₄ el centro es $\lambda = 627$ etc.

Una segunda banda muy ancha entre *D* y *F*, de bordes menos netos, se resuelve en dos bandas más estrechas, para concentraciones determinadas, situada una entre *D* y *E* (muy cerca de *E*) y la otra entre *b* y *F* (cerca de *F*).

Para una solución suficiente aparece una cuarta, débil entre *D* y *E*.

De estas cuatro bandas, solo las 3 primeras se ven generalmente.

Las soluciones alcalinas absorben también la extremidad violeta; presentan una banda ancha de bordes difusos, entre *C* y *D*, ocupando una porción de la región *D* — *E*; su centro es $\lambda = 618$.

Hemocromógeno. — Se prepara tratando la hematina por los reductores ó haciendo actuar ácidos ó bases sobre la hemoglobina al abrigo del aire. Da excelentes resultados, si se trata una solución de ésta perfectamente reducida, por piridina.

En solución concentrada, presenta 2 bandas; una muy neta entre *D* y *E*, la otra más pálida, ocupando toda la región *E* — *b*. El centro de la 1.^a es $\lambda = 560$ y aparece siempre á pesar de diluciones considerables.

Hematoporfirina.—La disolución de este pigmento en alcohol fuertemente clorhídrico, da el siguiente espectro: una banda α sobre la raya D , no muy oscura; bordes poco netos; otra β , muy poco acentuada, que se une á la γ ; la γ está situada en el verde. La posición varía según el disolvente ácido empleado y su cantidad.

El espectro de la alcalina es: una banda α en el rojo estrecha, una β en el verde, otra γ en el verde ancha y oscura, y por fin una δ en el azul.

Si á la solución que da el espectro de la hematóporfirina alcalina se le agrega $Zn Cl_2$ amoniacal, se obtiene el espectro de la metálica: una banda α , á la izquierda de D y una β á la derecha de E .

MÓDULOS DE ABSORCIÓN DE LA HEMOGLOBINA Y DERIVADOS

Las operaciones previas y fundamentales necesarias para su determinación son, según ya hemos dicho:

- 1.º Conocer exactamente la concentración de la solución.
- 2.º Determinar con precisión el coeficiente de extinción para una zona espectral elegida convenientemente.

Oxihemoglobina. — *Determinación de c.*— *Preparación de la oxihemoglobina pura:*— Los mejores métodos para obtener cristales puros, son los de Hoppe-Seyler modificado por Jaquet y Zinoffsky, y el empleado por Piettre y Vila en el Instituto de París.

Se abandona al reposo durante 2 ó 3 horas á una temperatura de 2º, en una probeta, uno ó dos litros de sangre defibrinada de caballo. Se observa una capa oscura formada de glóbulos, seguida de otra delgada y gris, de leucocitos.

Se decanta entonces el suero que sobrenada; y empleando agua á 35º se trata los glóbulos tres veces consecutivos en volúmenes iguales.

La hemoglobina se disuelve; se enfría, se agita con 10 cm³ de éter, se vierte gota á gota el cuarto de su volumen de alcohol, el cual ha sido previamente enfriado debajo de cero grado. Se deberá emplear alcohol absoluto ó muy concentrado.

La solución obtenida es enfriada algunos grados bajo cero y abandonada á la cristalización durante 3 días.

Se filtra, rodeando el embudo de hielo. Dura esta filtración varios días.

Se trata entonces la masa roja por 3 veces su volumen de agua destilada á 35° y se filtra. Conviene cambiar á menudo el filtro. Se agrega á la solución algunos cm³ de éter, se agita y después de haber enfriado debajo de cero grado $\frac{1}{4}$ de su volumen de alcohol.

Se deja cristalizar durante 3 días y se empieza la misma serie de operaciones hasta obtener una 4.^a cristalización.

La solución extendida y enfriada á cero grado no debe precipitar enseguida por el AgNO₃ ni por el HgCl₂ ni por el (CH₃ — CO.O)₂ Pb, en soluciones diluidas y enfriadas también á cero grado.

El procedimiento de Piettre y Vila consiste en lo siguiente: Una vez defibrinada la sangre se la coloca en la heladera hasta depósito de los glóbulos.

Valiéndose de un sifón se extrae el suero y la capa de los leucocitos. Se trata por diez veces su volumen de solución fisiológica. Centrifugando, se obtiene un jarabe rojo obscuro de glóbulos; se le lava nuevamente.

Se agrega á los glóbulos 3 volúmenes de agua á 35°, se agita y se enfría rápidamente á cero. Entonces se agrega un cm³ de éter por cien de solución y se mezcla.

Se centrifuga nuevamente para separar los estromas globulares. Se decanta el líquido claro, se agrega 15 á 20 por ciento de alcohol y se enfría á 15°. Después de 3 días se recogen los cristales, se lavan 2 veces con una mezcla enfriada á cero grado de un volumen de alcohol y cuatro de agua; luego se disuelve en 3 volúmenes de agua á 35°, se filtra, se enfría, se agrega alcohol frío y se lleva á la heladera. Se repite una segunda cristalización.

Hemos empleado el primero por ser el más usado entre los diversos experimentadores que han determinado el módulo de absorción.

Se prepara una solución, más ó menos al 3 ‰ con la pasta obtenida, en el agua destilada ligeramente alcoholizada. Se filtra, y con una pipeta calibrada al mercurio, se toma 10 cm³ que se vierten en una cápsula de platino de fondo plano, previamente tarada, se lava bien la pipeta.

Se hace evaporar el líquido en el vacío empleando como sustancia higroscópica el H₂SO₄ monohidratado, y rodeando la campana con hielo fundente.

Al cabo de 36 á 48 horas, el residuo está casi seco; entonces se le lleva á una estufa á 110° (temperatura constante), bajo una corriente de hidrógeno seco, hasta peso constante. Se puede usar una estufa con toluol llevado á la ebullición.

Del aumento de peso de la cápsula se deduce el título de la solución. Luego se diluye convenientemente para obtener una de 1,5 gramos por litro, empleando Na₂ CO₃ al 1 ‰.

Saint-Martin ha demostrado que ni el aire ni el tiempo, ni la temperatura ordinaria del laboratorio alteran la hemoglobina de una manera sensible.

Determinación de ϵ y de K. — Conocida exactamente la concentración, se determina enseguida los coeficientes de extinción para las regiones.

D 32 E — D 53 E, D 63 E — D 84 E.

He aquí los resultados obtenidos:
Sangre de cobayo.

CRISTALES DE OXIHEM.—(2 CRISTALIZACIONES)

C	Angulo de rotación α : media de 20 deter.		K_0	Valor medio de K_0
0,001579 1655 1707 1739	66°1 69°3 69° 70°5	0,78478 90328 85284 95300	0,002012 1832 2001 1824	0,001917
id. 0,001579 1655 1707 1739	id. 75°4 77°6 77°3 78°2	id. 1,33620 1,31576 1,37864 1,37864	K'_0 0,001300 1209 1298 1262	K'_0 0,001279
3 cristalizaciones				
id. 0,0016538 14901 14230 15381	id. 66°7 64°9 63°6 65°3	id. 0,80560 0,74486 0,70400 0,75792	K_0 0,002053 2000 2021 2029	K_0 0,002026
id. 0,0016538 14901 14230 15381	id. 76°4 74°8 73°4 75°3	id. 1,25734 1,16278 1,08822 1,19116	K'_0 0,001315 0,001281 1307 1291	K'_0 0,001299
4 cristalizaciones				
0,001563 0,001613 0,001485 1735	64°8 65°7 63°7 67°4	0,74164 0,77124 0,70706 0,83066	K_0 0,002107 2091 0,002101 2089	K_0 0,002097
id. 0,001563 1013 1485 1735	id. 75°2 76°0 74°2 77°5	id. 1,18540 1,23264 1,12996 1,32932	K'_0 0,001318 1316 1314 1305	id. K'_0 0,001313

Los resultados obtenidos por diversos autores, son:

Módulos de absorción	Cherbuliez 1. ^a reg. $\lambda = 541 - 536$ 2. ^a reg. $\lambda = 558 - 553$	G. Hüfner $\lambda = 546 - 535.1$ 568,7—537,5	Saint-Martin $\lambda = 549 - 538$ 568,3—557,2
K _o	0,001326	0,001312	0,001330
K _o	2038	2070	2153
K'	1867	1778	1753
K	1521	1354	1545
K' _{co}	1228	1268	1320
K _{co}	1536	1380	1520

Constantes de la hemoglobina reducida.— Para obtener una solución se toman 10 cm³ de la solución tipo anterior, se le agrega 150 de solución de Na₂ CO₃; se mezcla bien, se añade 10 cm³ de hidrosulfito de soda, recientemente preparado y se completa á 200 cm³.

Se vierte inmediatamente en una cuba de Schulz, la que se cierra herméticamente y se observa sin pérdida de tiempo, pues el hidrosulfito no tarda mucho en alterar la hemoglobina.

Hüfner prepara esta solución sometiendo la oxihemoglobina á la acción sucesiva y repetida de una corriente de hidrógeno y del vacío.

He aquí los resultados obtenidos:

C	Ang. de rotación α : media de 20 deter.		
0,001485	71, 50	0,99704	K _r = 0,001501
0,001485	67, 35	0,82886	K' _r = 0,001796

Carboxihemoglobina. — Se prepara una solución de título conocido, agitando mucho tiempo una solución de oxihemoglobina con CO puro.

C	Ang. de rotación α : media de 20 deter.	ϵ	
0,001563	71, 85	1,01306	$K_{co} = 0,001542$
"	75, 90	1,2266	$K'_{co} = 0,001275$

DOSAJE DE LA OXIHEMOGLOBINA Y DE LA HEMOGLOBINA
EN LA SANGRE.

Oxihemoglobina. — Conociendo su módulo de absorción, para determinar la cantidad contenida en la sangre, basta determinar ϵ de una solución de la misma.

Hüfner ha demostrado con el método de los mínimos cuadrados, que se obtiene una mayor precisión en los valores del ang. α y por consiguiente de ϵ , cuando la solución tiene una concentración tal que la intensidad residual oscila entre 0,15 y 0,30.

Las soluciones deben tener un título, que varíen dentro de los límites para los cuales han sido determinados los valores de K . Hüfner y Otto aconsejan una dilución de la sangre con 150 á 200 volúmenes de agua. De Saint-Martin dice haber conseguido mayor precisión con 75 á 100 volúmenes.

La cantidad de sangre necesaria para una determinación cuantitativa es muy pequeña, puesto que siendo la capacidad de la cuba 5 cm³, bastan 0,033 á 0,025 cm³ de aquella. Es

esto de una importancia capital en investigaciones fisiológicas y patológicas, pues se puede repetir el ensayo muchas veces sin causar mayores molestias ni trastornos y con suma facilidad.

La precisión del método depende en gran parte de la exactitud con que se hace la solución de sangre. Leichtenstern, citado por Gallerani, encontró que el error en la dilución tiene una influencia 10 veces mayor que el error que se comete en la determinación de ϵ .

Otto operaba de la siguiente manera: tomaba 2 pipetas calibradas con el mercurio, una para la sangre y la otra para el disolvente. La primera de tubo capilar, tenía 3 trazos marcando así 3 volúmenes diversos: la segunda era de 2 cm³, de manera que la dilución podía ser: $\frac{1}{150}$, $\frac{1}{175}$ ó $\frac{1}{200}$. Operaba como en el método de Hayem para la numeración de las hematias. Aconseja este procedimiento, habiendo encontrado como error medio 0,96 ‰ en cien ensayos efectuados. Desechaba aquellas en donde había solamente trazos de coagulación.

Cuando se puede tener sangre en gran cantidad (de caballo, perro, etc.), es muy cómodo y exacto operar sobre sangre defibrada.

Cuando, por el contrario, no se puede conseguir sino en pequeñas cantidades, Saint-Martin recomienda: «En la yema de un dedo aséptico, se practica con una aguja ó lanceta quemada, de lámina ancha, una escarificación longitudinal. Un anillo de caucho estrecha en el origen del primer metacarpiano, el dedo elegido que se mantiene en una posición inclinada. Se recibe la sangre que cae gota á gota en una pequeña probeta que contiene 2 miligramos de oxalato neutro de potasa pulverizado y se bate sin interrupción, valiéndose de

una gruesa varilla de vidrio, hasta que se haya recogido 30 á 35 gotas, ó sea unos 2 cm³. La adición de oxalato indicada por Arthus impide la coagulación de la sangre. Para medir un volumen determinado se sirve de una pipeta de 1 cm³, terminada en sus dos extremidades por tubos capilares y calibrada con el mercurio puro y seco. Es decir, que se ha determinado con cuidado su capacidad y no el peso del agua que deja escurrir cuando se le vacía.»

«Se le llena de sangre defibrinada ó hecha incoagulable por la adición de oxalato. En este último caso no hacemos la corrección muy mínima, teóricamente necesaria; el error cometido muy pequeño se encuentra compensado por la pérdida de agua evaporada.»

« Se vierte el contenido de la pipeta, secada exteriormente con papel secante, en un balón de 100 cm³. Se le lava 5 ó 6 veces con agua alcalinizada, hasta desaparición completa de toda coloración, teniendo cuidado de hacer caer las aguas de lavaje en el balón; luego se completa. Se filtra; si se ha empleado el oxalato, se deberá filtrar con papel Schleicher y Schüll (No. 602 duro; ó 575 endurecido). »

«El líquido filtrado se examina en la cuba de Schulz. En ciertos casos de anemia profunda la dilución no será mayor de $\frac{1}{50}$ á $\frac{1}{75}$.»

Saint-Martin y Gallerani han construído tablas especiales que dan inmediatamente el valor de c para los valores de α hallados.

Dosaje de la oxihemoglobina y de la hemoglobina simultáneamente.— El método espectrofotométrico es el único exacto si se tiene cuidado de tomar algunas precauciones. Es una de las aplicaciones más felices y elegantes de las teorías expuestas en párrafos anteriores.

Si se designan con H_r la cantidad de hemoglobina contenida en un cm^3 , K_r y K'_r los módulos de absorción para las zonas espectrales ya mencionadas: H_o la proporción de oxihemoglobina, K_o y K'_o los módulos de absorción para las mismas regiones, y en fin, con ε y ε' los coeficientes de extinción encontrados para la mezcla, se tendrá según la teoría de Vierordt:

$$H_o = \frac{K_o K'_o (\varepsilon K_r - \varepsilon' K'_r)}{K_r K'_o - K_o K'_r} \quad (\text{A})$$

y

$$H_r = \frac{K_r K'_r (\varepsilon' K'_o - \varepsilon K_o)}{K_r K'_o - K_o K'_r} \quad (\text{B})$$

La dificultad principal estriba en mezclar al abrigo del aire, un volumen conocido de sangre (que ha sido extraída de una vena ó arteria con las precauciones necesarias para evitar su oxidación) con la solución alcalina, que ha sido privada de gases por ebullición prolongada, y llevada á la cuba cerrada.

Hüfner y su alumno Otto lo consiguen así:

Hacen uso del aparato de dilución que lleva su nombre: consta de dos recipientes n y m , cuyas capacidades son desiguales: están separadas por una llave $b\beta$ de tres vías: en m se recoge la sangre y n se llena del líquido disolvente. (Véase figura siguiente).

La relación de las capacidades $\frac{n}{m}$ (incluyendo como capacidad de n la del agujero del tubo principal $b\beta$) varía como lo hemos dicho, de 150 á 200.

Los espacios n y m han sido calibrados con el mercurio puro y seco.

Para conseguir la solución de Na_2CO_3 exenta de gases, se la hace hervir durante dos horas, en un balón cerrado por un tapón de goma provisto de dos agujeros que dejan pasar dos tubos x y y , que terminan exteriormente en un tubo de goma y una pinza de presión; el tubo x se sumerge en el líquido, y el y acodado en ángulo recto termina un poco más abajo del tapón. Durante la ebullición ambas pinzas están abiertas; se cierran, apagando inmediatamente el gas; se abre luego la pinza b después de haber puesto en comunicación el tubo x con un aparato de Kipp, productor de hidrógeno puro.

Cuando la solución ha adquirido la temperatura ambiente, se une el tubo x con la extremidad f del aparato de Hüfner. La llave e se encuentra abierta; la $b \beta$ establece la comunicación entre m y n ; y se liga m por medio de la llave $d \delta$ y la extremidad g con una bomba neumática ó una trompa de agua, para hacer el vacío en todo el aparato. Producido, se abre con mucho cuidado la pinza a : todo el aparato se llena del líquido hervido; cuando este sale por g , se cierran todas las llaves.

Para llenar ahora el espacio m de sangre se coloca la cánula en la vena ó arteria elegida, puesta en comunicación por medio de un pequeño tubo de goma con la extremidad β de la llave b ; la sangre sigue el trayecto $\beta m e f$ y se escurre por este último. Previamente se le ha humedecido con una solución concentrada de Na_2CO_3 , para impedir la coagulación.

Se deja escurrir una cierta cantidad para tener la certidumbre de que el espacio m está lleno de sangre idéntica á la del vaso. Recién entonces se cierra la llave e y luego la $b \beta$ haciéndola girar de tal manera que comunique m con n .

Separado el aparato de la cánula, se agita vivamente en todos sentidos hasta obtener una mezcla homogénea.

Falta finalmente llenar la cuba cerrada: se hace girar $b \beta$ para impedir la comunicación entre m' y n ; se lava el trayecto $\beta m e f$ y se seca. Luego se monta el siguiente aparato:

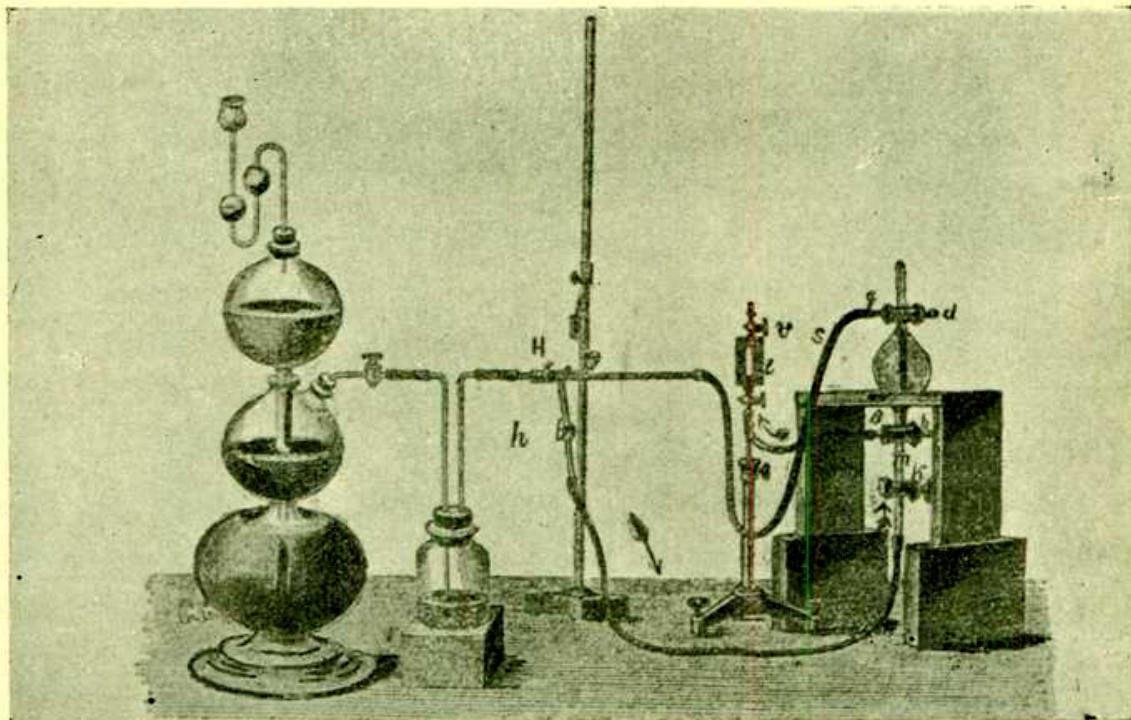


Fig. 11.

El hidrógeno producido se purifica al atravesar una solución concentrada de $K Mn O_4$ contenida en un frasco lavador; recorre el camino $Hs \delta g$; una vez expulsado todo el aire se cierra $d \delta$. Luego se hace pasar el hidrógeno por $Hh Km b \beta$, el tubo de goma y la cuba.

Expulsado todo el aire, se cierra v y e ; se abre $d \delta$ para que el hidrógeno llegue al recipiente n y luego $b \beta$, para poner en comunicación n con la cuba, y por fin la v .

La cuba se llena inmediatamente de la solución de sangre. Se cierran todas las llaves una vez que aquella empieza á salir por v , y se determinan sin pérdida de tiempo los coeficientes de extinción.

Aplicando las fórmulas (A) y (B), se obtienen las cantidades de hemoglobina y oxihemoglobina contenidas en la mezcla.

En el cálculo es necesario introducir el valor de la dilución que ha sufrido la sangre para obtener la proporción relativa de ambos pigmentos contenidos en 1 cm³ de sangre. El volumen total ocupado por la mezcla será $m + n = V$; la dilución será pues $\frac{V}{v}$ siendo $v = \text{vol. de } m$.

Luego las proporciones encontradas, multiplicadas por el factor constante $\frac{V}{v}$, darán el porcentaje verdadero.

Puede simplificarse el modo operatorio de Hüfner y Otto de la siguiente manera: se retira el tubo h y se une g con v . Se hace pasar el hidrógeno por Hs ve β m f , se cierran las llaves, se retira el tubo vg , haciendo recorrer al hidrógeno por H s n (haciendo presión sobre el líquido lo obliga á trasladarse á la cuba por β). Se cierran las llaves correspondientes y se observa.

Se controlan los resultados obtenidos, agitando al aire una parte de la mezcla y observando,

$$H_o \text{ total} = H_o + H_r .$$

Hüfner y Otto valiéndose de este procedimiento han demostrado que los resultados obtenidos con la pompa de mer-

curio, esto es, que la sangre arterial no está nunca saturada de oxígeno, son verdaderos.

Resultados obtenidos por Hufner:

I. *Sangre de la vena crural.*

$$\begin{array}{r} h_r \quad 4,092 \text{ gr.} \\ h_o \quad 12,300 \text{ " } \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{r} h_r \\ h_o \end{array}} \right\} h_r + h_o = 16,392 \text{ gr.}$$

II. *Sangre de la arteria crural.*

$$\begin{array}{r} h_r \quad 1,022 \text{ gr.} \\ h_o \quad 19,312 \text{ " } \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{r} h_r \\ h_o \end{array}} \right\} h_r + h_o = 15,334 \text{ gr.}$$

Los de Otto, son:

I. *Sangre de la arteria crural izquierda (perro).*

$$\begin{array}{r} h_o \quad 14,184 \text{ gr.} \\ h_r \quad 1,101 \text{ " } \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{r} h_o \\ h_r \end{array}} \right\} h_r + h_o = 15,285 \text{ gr.}$$

Experiencia de control $H_o = 15,341 \text{ gr.}$

II. *Sangre de la vena crural izquierda (perro).*

$$\begin{array}{r} h_o = 10,216 \text{ gr.} \\ h_r = 6,214 \text{ " } \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{r} h_o \\ h_r \end{array}} \right\} h_o + h_r = 16,430 \text{ gr.}$$

Experiencia de control $H = 16,512 \text{ gr.}$

Dosaje simultáneo de la carboxi y oxihemoglobina.—Tratándose de sangre intoxicada por el CO, la solución se prepara de idéntica manera que la de la oxihemoglobina, y se llena completamente una cuba cerrada para evitar la disociación que puede tener lugar cuando se opera sobre sangre fuertemente intoxicada.

Puesto que K'_o y K'_{co} son sensiblemente iguales, puede admitirse $K'_o = K'_{co}$; entonces:

$$\varepsilon = \frac{C_o}{K_o} + \frac{C_{co}}{K_{co}} \quad \text{y} \quad \varepsilon' = \frac{C_o + C_{co}}{K'_o};$$

de donde:

$$C_o + C_{co} = K'_o \varepsilon' = C_t.$$

(C_t = cantidad total de hemoglobina).

Por consiguiente:

$$C_o = K_o \frac{C_t - K_{co} \varepsilon}{K_o - K_{co}} \quad (1)$$

$$C_{co} = K_{co} \frac{K_o \varepsilon - C_t}{K_o - K_{co}} \quad (2)$$

La primera puede escribirse:

$$C_o = \frac{K_o}{K_o - K_{co}} C_t - \frac{K_o K_{co} \varepsilon}{K_o - K_{co}},$$

ecuación que es de la forma

$$C_o = MC_t - N\varepsilon \quad (3)$$

en donde M y N son constantes:

La (3) puede escribirse: $\frac{C_o}{C_t} = M - N \frac{\varepsilon}{C_t}$, ecuación de una recta en la que M es el valor de la ordenada en el origen y $-\frac{N}{C_t}$ es el parámetro angular; construida la recta obtendremos los valores de $\frac{C_o}{C_t}$ en función $\frac{\varepsilon}{C_t}$.

Para una solución de oxihemoglobina pura: $C_o = C_t$ y $C_{co} = 0$, luego.

$$\frac{C_o}{C_t} = 1 \quad y \quad \frac{\varepsilon}{C_t} = \frac{1}{K_{co}} = 476.$$

Para una solución de carboxihemoglobina pura se tendrá: $C_{co} = C_t$ y $C_o = 0$, de donde:

$$\frac{C_o}{C_t} = 0 \quad y \quad \frac{\varepsilon}{C_t} = \frac{1}{K_{co}} = 648.$$

Saint-Martin determina el valor de $\frac{C_o}{C_t}$ con una aproximación de 1 % de la siguiente manera: toma papel milimetrado y representa por una división una unidad de la relación $\frac{\varepsilon}{C_t}$.

Toma en el origen de la abscisa el valor de $\frac{1}{K_o} = 476$, á partir del cual numera las divisiones hasta el otro límite $\frac{1}{K_{co}} = 648$. En el punto de origen levanta la ordenada $\frac{C_o}{C_t} = 1$ tomándolo igual á 100 divisiones y une por una recta este punto con el de abscisa 648 sobre el eje mismo, que será la recta buscada, pues cada división vertical representa uno por ciento del valor de la relación.

El empleo del diagrama es muy fácil: después de haber determinado ε y ε' , se calcula C_t por la fórmula $C_t = K'_o \varepsilon'$. Se divide C_t por ε y se busca sobre el eje de las x la cifra obtenida; la ordenada correspondiente dará el porcentaje en

oxihemoglobina $a = \frac{C_o}{C_t}$. El porcentaje en carboxihemoglobina será $b = \frac{C_{co}}{C_t} = 1 - a$.

Los valores absolutos de C_o y de C_{co} serán respectivamente iguales á C_a y C_b .

He aquí un ejemplo citado por Saint-Martin: Un cm^3 de sangre de perro, al cual se le había hecho respirar durante una hora una mezcla de 200 litros de aire con $\frac{1}{2}$ litro de CO, fué diluída á 100 cm^3 obtuvo:

$$\text{Región } \lambda = 549 \quad - \quad 538, \quad \text{ang } \alpha = 73^\circ 25'$$

$$\text{» } \lambda = 568,3 \quad - \quad 557,2 \quad \text{» } \alpha = 65^\circ 20'$$

La tabla da: $C_t = 0,0014434$ y $\varepsilon = 0,7591294$; la relación $\frac{C_t}{\varepsilon} = 526$; el valor de la ordenada correspondiente á la abscisa 526 es $0,68 = \frac{C_o}{C_t}$ y por diferencia $\frac{C_{co}}{C_t} = 0,32$. Luego la solución de sangre encerraba $0,1444 \text{ gr.}$ de hemoglobina total por 100 cm^3 , de los cuales $68 \text{ por } \%$ de oxihemoglobina y 32% de carboxihemoglobina.

En consecuencia, la sangre contenía $14,44 \text{ gr.}$ de hemoglobina total por 100 cm^3 , de los cuales $4,52 \text{ grs.}$ de carboxih. ó sea $6,05 \text{ cm}^3$ de CO. (un gramo de hemoglobina absorbe $1,339 \text{ cm}^3$ de este gas ó de O).

Pero no se podrá calcular la cantidad de oxihemoglobina contenida en la sangre, pues si la hemoglobina está saturada de O en la solución, no lo estará en la sangre misma: la cifra obtenida se refiere á una mezcla de ambas. Sin embargo se pueden calcular, dosando el O contenido en 100 cm^3 de sangre valiéndose de la pompa de mercurio.

El porcentaje de la oxihemoglobina se obtendrá dividiendo el volumen hallado de O, en cm^3 por 1,34. Por diferencia la hemoglobina.

De la misma manera si se ha dosado simultáneamente O y CO, se podrá deducir la proporción de oxihemoglobina y carboxihemoglobina. Faltará solamente dosar la hemoglobina total por el espectrofotómetro y deducir el de la reducida.

Según Arthus, para el dosaje de estos gases, por medio de la pompa se deberá agregar directamente á la sangre á la salida de los vasos una solución saturada de Na Fl en la proporción de $\frac{1}{3}$ en peso, para impedir la fijación del O durante la extracción.

Saint-Martin verifica la exactitud de este método de la siguiente manera: Se limpia y seca un balón esférico de 500 cm^3 de capacidad de cuello largo y análogos á los empleados por Chancel en la determinación de la densidad de los gases y se vierten 60 cm^3 de sangre defibrinada muy fresca. Valiéndose de una trompa de agua se hace el vacío, y se le imprime 300 sacudidas enérgicas después de haberlo llenado de CO puro; se hace nuevamente el vacío y entrar enseguida CO. Se agita como antes y se le sumerje cuello abajo en una probeta llena de hielo fundente. Bastan algunos minutos para hacer subir á la parte superior las burbujas de gas; se extraen 30 cm^3 .

Procediendo de la misma manera y reemplazando el CO por el O, se prepara sangre oxigenada.

Empleando pipetas calibradas al mercurio se hacen las siguientes soluciones:

Solución A.

Sangre oxigenada.....	5 cm^3
» oxicarbónica	5 »
Agua alcalinizada, c s para hacer..	500 »

Solución B.

Sangre oxigenada	10 cm ³
Agua alcalinizada hasta	500 »



Con el fin de evitar la disociación parcial de la carboxihemoglobina, se agregan gota á gota y agitando 5 cm³ de sangre oxigenada luego 5 de oxicarbonica sobre 400 cm³ de agua alcalinizada. Si presenta cierta opacidad, es indispensable esperar que se vuelva límpida; se filtra enseguida.

Se preparan luego las soluciones siguientes:

N.º de la solución	1	2	3	4	5	6
Tanto por ciento de hemog.-oxicarb. en relación á la hemog. total	8,25	16,50	24,75	33	41,25	49,50
Solución A.	15 cm ³	30	45	60	75	90
Solución B.	85	70	55	40	25	10

Según Bunsen 1.000 cm³ de agua pueden disolver 25 de CO á la temperatura de 15°. Un litro de sangre conteniendo 800 grs. de agua disolverá 20 cm³ más del que se combina á la hemoglobina. Y como un litro de sangre de perro contiene unos 150 grs. de hemoglobina, que absorben 200 cm³ de óxido de carbono, podemos aumentar sin error apreciable en un décimo el porcentaje de la carboxihemoglobina, pues es fácil comprender, que aquel gas disuelto por el suero, se fija sobre la hemoglobina. Los resultados de la experiencia concuerdan perfectamente con la hipótesis anterior.

Para determinar ϵ' es necesario diluir con su volumen de agua las soluciones anteriores.

He aquí los resultados:

SANGRE DE PERRO

Número de la dilución	Porcentaje de la hemoglobina oxicarbonica con relación á la hemoglobina total.	
	Encontrada	Calculada
1	8	8,25
2	16,4	16,50
3	24	24,75
4	33	33
5	41	41,25
6	50	49,50
Solución A	54,5	55

El error cometido no excede de 1 % en general.

Las conclusiones á que ha llegado sobre el valor del método, son las siguientes:

1.º Permite determinar con exactitud, en el hombre y en el perro, el grado de saturación de la hemoglobina por el CO, por lo menos entre 0 y 55 %. Sus experiencias no permiten afirmar que sea verdadero y exacto cuando es superior á este límite. Por otra parte, carece de importancia para la medicina legal, pues es sumamente raro un grado tan elevado de intoxicación.

2.º El método es aplicable para el conejo y probablemente para los herbívoros, para saturaciones inferiores al 20 %.

3.º Con estas reservas, este método presenta sobre los demás la indiscutible ventaja de poder efectuar el dosaje con una cantidad mínima de sangre, pues una gota basta.

Con el fin exclusivo de practicar los métodos anteriores, y sin mayores precauciones para evitar el contacto con el oxígeno atmosférico, he efectuado algunas experiencias:

I. *Sangre de Cobayo.*

$$\left. \begin{array}{l} h_r = 2,082 \\ h_o = 8,752 \end{array} \right\} h_r + h_o = 10,834$$

experiencia de control $h_t = 10,971$

II. *Sangre de Cobayo.*—Habiendo preparado las soluciones (A) y (B) indicadas por Saint-Martin, y las 3 diluciones siguientes:

Solución (A).....	10	20	30
» (B).....	90	80	70

he encontrado:

Número de la dilución	Porcentaje de carboxihemoglobina con relación á la hemoglobina total.	
	Encontrado	Calculado
1	6,40	5,50
2	10,00	11,00
3	14,70	16,50

Sin alcanzar los resultados satisfactorios de Saint-Martin, pues los errores se han elevado de 0,90 á 1,80 por ciento, puede considerarse como un excelente y á la vez exacto método de dosaje.

CONSTANTES DE LA OXIHEMOGLOBINA DE LA SANGRE HUMANA

Como no me ha sido posible obtener sangre humana en suficiente cantidad, he tratado de obtener los módulos de los coeficientes de extinción.

Las concentraciones oscilaban alrededor de 0,0015

1. ^a	dilución.....	$\frac{\epsilon'_o}{\epsilon_o}$	= 1,623
2. ^a	»	»	= 1,607
3. ^a	»	»	= 1,620
4. ^a	»	»	= 1,618
5. ^a	»	»	= 1,616

lo cual nos dice que la oxihemoglobina humana es muy vecina, ópticamente, de la de los diversos mamíferos y que las constantes de absorción difieren en muy pequeñas cantidades de las halladas para la oxihemoglobina de cobayo.

¿Existen variedades de oxihemoglobinas?

TEORÍA UNITARIA DE OTTO - HÜFNER—TEORÍA DE LA MULTIPLICIDAD
DE BOHR - GALLERANI.

Es interesante ver como la escuela de Hüfner demuestra, mejor dicho, trata de demostrar, partiendo de la teoría expuesta anteriormente y de los resultados obtenidos, la unidad de las hemoglobinas, no solo en la misma especie animal, sino en gran número de mamíferos.

Al afirmar de una manera categórica que la espectrofotometría sirve para dosar la oxihemoglobina de la sangre, habiendo determinado previamente los valores de K_0 y de K'_0 , « se admite implícitamente: 1.º que la sangre no contiene sino una sola materia colorante: la oxihemoglobina; 2.º que esta substancia se comporta ópticamente de la misma manera en las soluciones sanguíneas extendidas y en las soluciones hechas con las mismas materias colorantes cristalizadas. Sería posible, en efecto, que en la sangre, otras substancias, especialmente la materia colorante amarilla del suero, ó tal vez también productos de la alteración de la oxihemoglobina, produjesen un efecto absorbente sensible y por consiguiente perjudicial á la exactitud de los resultados. Por otra parte, en el glóbulo la oxihemoglobina está débilmente combinada á substancias aún mal determinadas y queda la duda si en la

sangre misma extendida de agua pueden tener alguna influencia sobre los fenómenos ópticos de aquel pigmento. Basta algunas determinaciones fotométricas para demostrar que estas dudas no tienen fundamento» (Lambling).

He aquí como Otto razona: Si ε y ε' son los respectivos coeficientes de extinción para las regiones $D\ 32\ E - D\ 54\ E$ y $D\ 63\ E - D\ 84\ E$ de una solución de cristales puros de oxihemoglobina de título C , se tendrá:

$$C = K_o \varepsilon, \quad C = K'_o \varepsilon'.$$

Luego

$$K_o \varepsilon = K'_o \varepsilon',$$

de donde

$$\frac{\varepsilon'}{\varepsilon} = \frac{K_o}{K'_o},$$

Y para soluciones de la misma substancia, en las mismas regiones, pero de concentraciones diferentes,

$$\frac{\varepsilon'}{\varepsilon} = \frac{\varepsilon'_1}{\varepsilon_1} = \frac{\varepsilon'_2}{\varepsilon_2} = \dots = \frac{K_o}{K'_o}$$

Los coeficientes de extinción son proporcionales á las constantes de absorción.

Si se determinan pués, ε y ε' de una serie de soluciones de sangre y se constata que la relación $\frac{\varepsilon'}{\varepsilon}$ es sensiblemente constante, quedará demostrada la primera hipótesis.

Saint-Martin ha encontrado para la sangre de caballo el valor 1,621. Bücheler, bajo la dirección de Hüfner, ha encontrado para la misma clase de sangre:

ε_0	ε'_0	$\frac{\varepsilon'_0}{\varepsilon_0}$
0,74132	0,97854	1,320
0,62902	0,76866	1,222
0,65742	0,91381	1,390
0,62722	0,84075	1,340
0,57432	0,76385	1,330
0,73542	1,05606	1,436
0,53432	0,71544	1,339
0,88431	1,18497	1,340
0,53521	0,71343	1,333
0,64524	0,85817	1,330
	Media	1,338

Otto halló, como valor para la sangre de perro 1,340.

La segunda hipótesis puede demostrarse basándose en la ecuación general hallada $\frac{\varepsilon_0}{\varepsilon'_0} = \frac{K'_0}{K_0}$. Quiere decir, que si la relación entre los coeficientes de extinción de 2 regiones de una solución de sangre, es igual á la relación entre las constantes de absorción de las mismas regiones, habrá identidad óptica entre la sangre y la materia colorante cristalizada.

Saint-Martin ha encontrado para la sangre de caballo: $K_0 = 0,0021531$, $K'_0 = 0,001330$. Luego $K_0 \div K'_0 = 1,621$, igual al valor encontrado $\frac{\varepsilon'}{\varepsilon} = 1,621$.

Bücheler da los siguientes valores:

$$\frac{K_0}{K'_0} = \frac{0,001360}{0,001031} = 1,325$$

no difiriendo sensiblemente de $\frac{\varepsilon'}{\varepsilon} = 1,338$.

Otto hace luego un estudio comparativo de las sangres de hombre, de conejo y de perro, y encuentra:

Ohm. de perro	Sangre de perro	Sangre humana	Sangre de conejo
1,34	1,332	1,346	1,328
»	1,384	1,337	1,348
»	1,335	1,333	1,326
»	1,338	1,339	1,337
»	1,332	1,341	1,340
»	1,33E	1,334	1,337
»	1,345	1,344	1,346
»	1,342	1,340	1,339
Media	1,339	1,339	1,338

Y obtiene como conclusión la igualdad del principio colorante:

$$K_o = K'_o = K''_o = K'''_o$$

$$K = K'_1 = K''_1 = K'''_1,$$

aduciendo que no es posible ni científico suponer por una mera casualidad, la existencia de la igualdad de estas relaciones.

Y tanto más es esto admisible, agrega Otto, si se piensa que todas las especies de oxihemoglobinas, hasta ahora estudiadas, han mostrado las mismas constantes espectrofotométricas.

Lambling da las siguientes: 1,586 para el buey, 1,608 para el carnero, 1,584 para el caballo, 1,615 para el perro. Hüf-

ner admite 1,577 para la sangre de buey y conejo; Saint-Martin, 1,617 para la humana, 1,623 para el perro, 1,621 para el caballo y 1,616 para el conejo.

Resulta de todo esto, que los diversos valores hallados difieren muy poco de un autor á otro, y que los obtenidos por el mismo experimentador son sensiblemente iguales para sangre de los diversos mamíferos.

Branly, operando con un espectrofotómetro de haces polarizados á ángulo recto y superpuestos ha llegado á resultados análogos, y se expresa así:

«Introduciendo dos especies diferentes de sangre en las cubas prismáticas, se consigue hacer desaparecer las franjas en la parte común de dos espectros, por un desplazamiento conveniente de aquéllas, y desaparecen simultáneamente en todos los colores». Lo ha constatado en la sangre humana normal y patológica, de buey, de perro, caballo, etc., y en las hemoglobinas correspondientes.

«Es lógico pues admitir que todas las hemoglobinas, dice Lambling, poseen el mismo núcleo coloreado, y que solamente el núcleo albuminóideo varía de una especie animal á otra.

«Hoppe-Seyler no admite esta identidad. Hace resaltar las diferencias profundas en la solubilidad, pero Rollet no concede á este argumento sino un valor secundario. Según él, falta aún estudios completos sobre esta cuestión. Determinaciones comparativas hechas con sustancias puras y en condiciones idénticas faltan totalmente.

«Las diferencias que se observan en la composición centesimal carecerían de valor, pues la materia analizada no es nunca pura: así el olor propio de cada sangre subsiste á pesar de las repetidas cristalizaciones.

Al contrario, la identidad de los fenómenos espectroscó-

picos es un buen argumento á favor de la unidad de las hemoglobinas. Se sabe que ésta se compone de un núcleo de naturaleza albuminóidea sobre la cual se fija otro núcleo coloreado. Medidas espectrofotométricas han conducido á Hüfner á las siguientes hipótesis: Es muy probable que si las hemoglobinas difieren entre sí, lo son únicamente por su núcleo albuminóideo. El núcleo coloreado no cambia probablemente. Esta hipótesis no se funda solamente sobre una simple inspección del espectro, sino sobre exactas medidas espectrofotométricas (Lambling).

«Si esta coincidencia no demuestra absolutamente la identidad óptica de las materias colorantes de la sangre de los diversos animales, la hace infinitamente probable, porque es difícil admitir que los valores de K_0 y K'_0 difieren de una especie á otra, de tal manera que su relación sea constante.

«Es, pues, permitido usar para el dosaje de las oxihemoglobina humana, de perro y conejo, las constantes determinadas con la de caballo. Y esta asimilación será aún más legítima si se recuerda que para todas las oxihemoglobinas puras examinadas, de perro, ratón, caballo, cobayo y ardilla, se ha encontrado las mismas constantes. Este resultado parece demostrar además que contienen el mismo núcleo coloreado.» (Lambling, citado por Saint-Martin).

Hüfner y sus discípulos Otto, Noorden, etc., aceptaron pues, como demostrada la existencia de un mismo núcleo coloreado; Lambling, Saint-Martin, etc., lo aceptaron como un hecho infinitamente probable.

Chr. Bohr hizo notar desde luego las divergencias notables que se observan en los resultados obtenidos por diversos autores en el dosaje del fierro de las oxihemoglobinas de sangre de perro y caballo.

Los valores encontrados por Schmidt, Hoppe-Seyler,

Kossel, etc., son muy superiores á los de Zinosffsky y Jaquet, los cuales operaron sobre productos más puros que los de aquellos: no obstante, si esas diferencias tuviesen por causa las impurezas de los cristales de oxihemoglobina (exentos de fierro necesariamente), las recristalizaciones repetidas tendrían por efecto elevar la proporción de este metal, lo que no sucede precisamente.

En efecto, Hűfner halló:

0,43 % de fierro (hem. de perro)
0,47 » » » (» » caballo)

Las recientes determinaciones de Zinoffsky y Jaquet, los cuales operaron con el producto más puro hasta ahora obtenido, bajo la dirección de Bunge, dan las siguientes cifras:

0,335 % de fierro (hem. de caballo)
0,336 » » » (» » perro)

Las mismas oxihemoglobinas han dado respectivamente:

0,3899 % de azufre
0,568 » » »

lo cual nos muestra que para un átomo de fierro la hemoglobina de caballo contiene 2 de azufre y la de perro 3.

Las relaciones obtenidas por Schmidt, Kossel, Bucheler, son más complejas; para un átomo de fierro 1,60 á 2,68 de azufre (ohm. de perro) y 2,42 á 2,60 (caballo).

Se adoptarán, como se comprende, las relaciones analíticas

de los primeros; pero entonces se observa una divergencia de importancia: resultaría 133 cm³ de oxígeno débilmente combinada á 100 gr. de hemoglobina, cifra que se aleja considerablemente de la obtenida directamente por la experiencia.

Por otra parte, analizando los resultados de Preyer, Hüfner, Otto, Hoppe-Seyler, Worm-Müller, etc., sobre las cantidades de oxígeno fijado por cien gramos de pigmento, se nota enseguida que en medio de algunas series de determinaciones bastante concordantes, existen siempre algunas presentando con otras diferencias que superan de mucho los errores probables imputables al método é instrumento empleados.

Kupffer (1884) y Krüger (1887) habían ya hecho notar que cristalizaciones repetidas hacían elevar el módulo de absorción, mientras que la eliminación progresiva de las impurezas (no coloreadas) deberían producir una disminución.

Bohr ha agregado á estas razones críticas, numerosas pruebas experimentales que ha detallado ampliamente en la memoria que presentó á la Academia de Ciencias de Copenhague el 9 de Mayo de 1890, con el título «Sobre las combinaciones de la hemoglobina con el oxígeno».

Bohr fué, pues, el verdadero fundador de la teoría «Multiplicidad de las hemoglobinas».

Varias oxihemoglobinas cristalizadas provenientes de diversos perros y purificadas por una sola cristalización y por lavajes en agua helada y turbinando, han dado las siguientes cifras: el porcentaje de fierro osciló entre 0,316 y 0,461; la cantidad de oxígeno fijado por 100 gr. de pigmento, entre 101 y 138 cm³ (0° y 760 mm). El peso molecular relativo entre 3,000 y 15,200. Los módulos de absorción para la región $\lambda = 545$, entre 1 y 1,4.

Parece lógico admitir que las diversas variedades se trans-

forman las unas en las otras bajo influencias muy pequeñas.

Bohr resume así las conclusiones:

1.º Se puede preparar varias especies de hemoglobinas, que en idénticas condiciones exteriores absorben diferentes cantidades de oxígeno, pero que son vecinas por sus caracteres químicos.

2.º Los cristales de hemoglobina obtenidos por el método ordinario tienen una composición variable, aún en animales de la misma especie.

3.º Se puede constatar que la hemoglobina ordinaria es una mezcla de varias hemoglobinas que absorben una cantidad de oxígeno diferente.

Esta mezcla de hemoglobinas, ¿existe realmente en la sangre, ó proviene de las diversas manipulaciones?

G. Hüfner (*Arch für anat et phsiol.* 1894) fué el primero en contestar á las objeciones que Bohr hacía á su teoría unitaria. Y trató de demostrar que éste había operado con mezclas de hemoglobinas y diversos productos de su alteración, concluyendo nuevamente que no hay en realidad, en la sangre de un mismo animal y de una misma especie, sino una sola oxihemoglobina.

Gallerani, estudió más tarde este problema de bioquímica. Ha expuesto en numerosas monografías sus resultados.

He aquí un párrafo de sus conclusiones: «Dejando de lado la cuestión de probabilidad que, si la relación entre las constantes es la misma, éstas no deben ser diferentes, hago resaltar que según mis estudios, la relación deducida por Otto no es sino una media relativa á varios hemo y oxihemoglobinas, media que permanece constante gracias al poder regulador

que vigila constantemente sobre toda la economía animal; y que por otra parte existen diferencias entre los diversos individuos de una misma especie.»

En el Congreso Internacional de Roma (1894) (tom. II pág. 145), se expresaba así:

«Hasta ahora no se ha demostrado si el valor 1,339 es la media de varios, vale decir, si existen en la sangre normal diversas hemo y oxihemoglobinas de naturaleza química diferente (tal vez agregaciones moleculares).

«He observado que la sangre proveniente de animales á los cuales practicaba una sangría diaria, contenía una mezcla de oxihemoglobinas, diferente según el tiempo de formación, que era reemplazada por otra, que se acercaba cada vez más á la de reciente formación. Examinando todos los días en el espectrofotómetro, la sangre de perro así tratada, encontré que á pesar de la invariabilidad del espectro respecto de las bandas de absorción, la relación $\frac{\epsilon'_o}{\epsilon_o}$ variaba constantemente de cantidades muy pequeñas (siempre superiores á los errores probables), progresivamente en un sentido determinado. Esto demuestra que la naturaleza química de la hemoglobina depende del tiempo de formación.

Saint-Martin, antiguo partidario de la teoría unitaria, como consecuencia de sus primeros trabajos, presentó al Cuarto Congreso Internacional de Fisiología de Cambridge 1898. una memoria haciendo resaltar las divergencias en 46 poderes de absorción de la sangre con respecto al CO, que no podían ser inculcados al método ni considerados como errores instrumentales; y que por consiguiente no se podía admitir sin ciertas restricciones, con Hüfner, la unidad de las hemoglobinas.

Ha constatado, dosando al mismo tiempo, la oxihemoglo-

bina contenida en la sangre fresca de buey, perro y humana, que la cantidad de CO fijada por gramo de materia colorante oscila entre límites bastante extensos: entre 1,10 cm³ á 1,70:

Las variaciones en la sangre humana oscilan entre 1,18 y 1,34 cm³, en el perro 1,20 á 1,35.

Estos valores parecen contradecir las experiencias de Hüfner. Pero es menester observar que si la cifra 1,33 (valor medio) resulta de experiencias absorciométricas muy concordantes, por el contrario en otra serie, en donde desplazaba el CO por el NO, los resultados han variado notablemente. Hüfner cita una variación entre 1,21 á 2,10 cm³.

Si se extrae 60 gramos de sangre á un conejo que contiene 11,6 gramos de oxihemoglobina por ciento absorbe 1,18 centímetros cúbicos de CO (y por consiguiente de O) por gramo de pigmento.

Al cabo de seis días la sangre contiene 10,83 % de éste y absorbe 1,65 cm³ de CO. Parece pues que la oxihemoglobina de reciente formación posee un poder absorbente mayor.

«Según Bard y Mallet, se encuentra en la sangre normal, al lado de la hemoglobina definitivamente constituida, hemoglobinas en vía de formación y todavía imperfectas; ciertos estados patológicos traerían como consecuencia el predominio de la hemoglobina de reciente formación (clorosis) ó de la antigua (caquexia) según que se conserve ó no la hematopoesis. La diferencia entre los dos grados evolutivos de la hemoglobina estribaría en este hecho: la hemoglobina imperfecta posee todo su fierro, no sucediendo así con su poder colorante que aumenta en la definitivamente constituida. De esta manera Bard y Mallet interpretan las divergencias que presentan los dosajes de hemoglobina basados en la determinación cuantitativa del hierro y en la intensidad colorante» (Hugounenq).

Teoría Bohr-Gallerani

ESTUDIO CRÍTICO - EXPERIMENTAL DE LAS VARIACIONES DE LAS CONSTANTES DE ABSORCIÓN Y DE LOS MÓDULOS DE LOS COEFICIENTES DE EXTINCIÓN

Como hemos demostrado en páginas anteriores, los módulos de absorción caracterizan las sustancias colorantes.

Basado en este principio general, pensamos determinar las variaciones en esos módulos para encontrar un argumento nuevo en pro ó contra de la teoría de Bohr.

Pero se comprende fácilmente, que la fuerza de esta argumentación es solo aparente. En efecto, supongamos que exista realmente esa variación, como lo sostienen Kulz y otros. Parecería á primera vista, que evidentemente deben existir diversas hemoglobinas. Si se tiene en cuenta la objeción de Hüfner, tal evidencia no es sino aparente.

Para Kulz, Bohr, etc., las cristalizaciones repetidas, tendrían por efecto la purificación de una oxihemoglobina (α) separándola de otras (β , γ , etc.), gracias á la diferencia de solubilidad: esto explicaría las variaciones de los módulos.

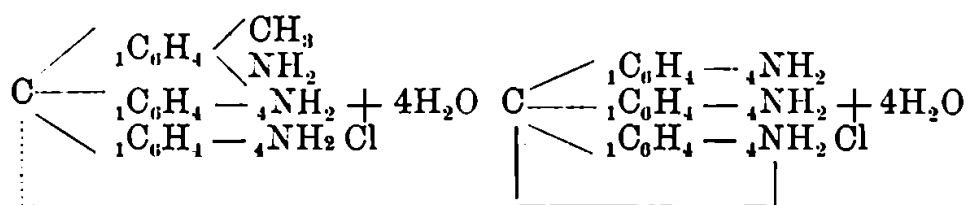
Para Hüfner las cristalizaciones, separarían la oxihemoglobina pura, de los diversos productos de su alteración que se producen en las sucesivas manipulaciones y que tienen también un poder absorbente para la luz, explicando de esta

manera las variaciones de esas constantes. Sostiene que la pureza de los cristales empleados por aquellos dejaban mucho que desear.

Siñ poder demostrar el grado de verdad que encierra esta objeción, por falta de los datos necesarios, diremos en pocas palabras, el método que vamos á emplear en este trabajo para llegar á una conclusión general y que se basa en el siguiente principio ya demostrado: si los valores de ϵ_0 y ϵ'_0 para dos regiones espectrales y para una misma substancia, varían según la concentración, no sucede así con su relación $\frac{\epsilon'_0}{\epsilon_0}$ que permanece constante.

Por razones que se comprenderán y que se desprenden de lo anterior, no hemos elegido las relaciones $\frac{K_0}{K'_0}$ con este fin.

Antes de describir el método y los trabajos efectuados, cabe preguntar si diferentes substancias colorantes pueden dar idénticos espectros de absorción ó muy parecidos. Esta duda la resuelve Formanek, con sus estudios estequiométricos sobre las materias colorantes: ha demostrado que existe una relación determinada entre la constitución molecular de éstas y las bandas de absorción. Para que dos ó más substancias colorantes presenten iguales bandas de absorción ó muy parecidas necesitan que sus cromóforos y radicales salificables sean idénticos como sucede en la fucsina y en la pararosanilina (clorhidrato).



El método, pues, empleado es el que con su ayuda demostró Gallerani la teoría de Bohr.

Lo seguiremos en su parte fundamental; nos alejaremos solamente en la manera de aplicar el principio.

El método de Gallerani consiste en el estudio de las variaciones de los módulos de los coeficientes, diariamente, sobre animales que han sido sangrados.

El que hemos adoptado, estudia las variaciones de las mismas para tres soluciones distintas (concentración 0,0005, 0,001 y 0,0015 de pigmento) de sangre y de oxihemoglobina pura (3 recristalizaciones). Apoyándose en el principio enunciado, se llegará á la unidad ó la multiplicidad de las oxihemoglobinas.

La objeción varias veces formulada, de la influencia del color del suero ha sido destruida por varios experimentadores. Por mi parte, partiendo de suero perfectamente puro y libre de hemoglobina (ni la reacción de Almen, ni el espectroscopio revelaban la presencia de ésta; las cenizas no contenían hierro) de sangre de caballo y preparada por el método de Socin (Lambling. *Sang et Respiration*. — Encyclopédie. — Fremy), he observado que tales pretendidas influencias, muy pequeñas, caían dentro de los errores probables del instrumento.

Las conclusiones son tanto más exactas cuanto mayor cuidado se ha puesto en anular las causas de error, y reducir á un mínimo aquellos que no han podido ser eliminados.

El método elegido es sin duda ninguna el más exacto y preciso que nos da la teoría espectrofotométrica; y por consiguiente, mejor que cualquier otro, químico ó físico, por su sensibilidad, reconocido unánimemente por todos los autores.

En el estudio de las causas de error y de la manera de suprimirlas seguiremos á Liagre, Terquem y Damien, Merriman, Chwolson, Prevot, etc.

Los errores son pequeñas inexactitudes inevitables que tienen por causas la imperfección de los aparatos y de nuestros sentidos. Es naturalmente imposible suprimir los errores, cualquiera que sea la perfección á que haya alcanzado la construcción de los instrumentos y el cuidado y esmero con que se ejecuten las operaciones. Una larga práctica y una organización racional de las observaciones, pueden reducir á un minimum la amplitud de los errores, pero imposible anularlos completamente.

He aquí cómo se clasifican los errores: los accidentales, son pequeñas inexactitudes fortuitas, debidas á causas pasajeras y que obran irregularmente, á veces en un sentido y á veces en otro, pasando por valores que se suceden en un orden cualquiera. Pudiendo ser indistintamente positivos ó negativos, su suma en una serie de medidas, no crece proporcionalmente á su número, sino que hay, por el contrario, una especie de compensación entre los errores sucesivos, errores que pueden someterse al análisis y que dan lugar á la teoría de los cuadrados mínimos.

Los errores sistemáticos son los que provienen de una causa permanente, conocida ó no, y se producen por lo tanto, siempre de la misma manera según una cierta ley. Estos errores pueden ser constantes ó variables.

Están caracterizados por la permanencia de las causas que determinan necesariamente la del efecto. Por ejemplo, las lecturas que se obtienen con limbos mal graduados ó mal centrados (error de excentricidad); si se conoce la causa, es fácil corregir los resultados, cosa que no pasa con los errores accidentales que son necesarios calcularlos.

El arreglo del instrumento ha sido efectuado de acuerdo con todas las observaciones y consejos dados por Otto, Hüfner, Saint-Martin, etc., etc.

Por otra parte, el instrumento adoptado es de una alta precisión. Quedan así suprimidos los errores instrumentales y los sistemáticos ó constantes provenientes de aquellos, tales por ejemplo, el coeficiente de corrección de la cuba de Schultz, etc.

Las diluciones han sido efectuadas con una pipeta calibrada con el mercurio, en seco, y usando siempre un mismo balón aforado.

Puesto que es imposible eliminar los errores accidentales he recurrido al método de los mínimos cuadrados, ya que caen dentro de la ley de las probabilidades. He repetido 20 veces la determinación del ángulo α , para el mismo argumento, siendo este valor la media aritmética de una á la derecha y otra á la izquierda: $\alpha = \frac{x_1 + x_2}{2}$, rechazando todos aquellos que no merecieran igual confianza, vale decir, de igual peso.

El resultado más probable es la media aritmética x de los valores obtenidos x_1, x_2, x_3, \dots etc.

El error probable del resultado estará dado por:

$$Ep = \frac{2}{3} \pm \sqrt{\frac{\sum e^2}{n(n-1)}}$$

siendo e las diferencias entre la media aritmética y los diversos valores.

He desechado siempre los valores medios de los ángulos de rotación del analizador, cuyos errores probables eran superiores á ± 0.09 .

CUADRO DE LOS RESULTADOS GENERALES

Oxihemoglobina de cobayo (4 cristalizaciones).

Concentración media 0,0005.			Concentración media 0,001		
$x = \frac{x_1 + x_2}{2}$	ε	$\frac{\varepsilon'_o}{\varepsilon_o}$	$x = \frac{x_1 + x_2}{2}$	ε	$\frac{\varepsilon'_o}{\varepsilon_o}$
(20 determinaciones)			(20 determinaciones)		
40°30	$\varepsilon = 0,23790$	} 1,598	55°90	$\varepsilon = 0,50264$	} 1,588
49°90	$\varepsilon' = 0,38206$		66°50	$\varepsilon' = 0,79860$	
40°60	$\varepsilon = 0,23920$	} 1,600	54°70	$\varepsilon = 0,47636$	} 1,593
49°95	$\varepsilon' = 0,38296$		65°30	$\varepsilon' = 0,75792$	
41°60	$\varepsilon = 0,25244$	} 1,608	54°50	$\varepsilon = 0,47210$	} 1,577
52°20	$\varepsilon' = 0,42522$		64°90	$\varepsilon' = 0,74486$	
42°20	$\varepsilon = 0,26060$	} 1,594	53°70	$\varepsilon = 0,45534$	} 1,580
51°70	$\varepsilon' = 0,41552$		64°10	$\varepsilon' = 0,71944$	

Concentración media 0,0015

64°80	$\varepsilon = 0,74164$	} 1,598
75°20	$\varepsilon' = 1,18540$	
65°70	$\varepsilon = 0,77124$	} 1,588
76°	$\varepsilon' = 1,23264$	
63°70	$\varepsilon = 0,70706$	} 1,599
74°20	$\varepsilon' = 1,12996$	
67°40	$\varepsilon = 0,83066$	} 1,600
77°50	$\varepsilon' = 1,32932$	

Sangre de Cobayo

Concentración media 0,0005			Concentración media 0,001		
$\alpha = \frac{x^1 + x^2}{2}$	ε	$\frac{\varepsilon'_o}{\varepsilon_o}$	$x = \frac{x^1 + x^2}{2}$	ε	$\frac{\varepsilon'_o}{\varepsilon_o}$
43°40	$\varepsilon = 0,27744$	} 1,630	53°30	$\varepsilon = 0,44714$	} 1,599
53°55	$\varepsilon' = 0,45226$		63°95	$\varepsilon' = 0,71476$	
41°80	$\varepsilon = 0,25514$	} 1,613	54°50	$\varepsilon = 0,47210$	} 1,584
51°50	$\varepsilon' = 0,41170$		65°	$\varepsilon' = 0,74810$	
40°90	$\varepsilon = 0,24312$	} 1,602	55°80	$\varepsilon = 0,50040$	} 1,569
50°30	$\varepsilon' = 0,38932$		66°10	$\varepsilon' = 0,78478$	
44°10	$\varepsilon = 0,28760$	} 1,625	53°70	$\varepsilon = 0,45534$	} 1,607
54°30	$\varepsilon' = 0,46786$		64°50	$\varepsilon' = 0,73204$	

Concentración media 0,0015		
68°20	$\epsilon = 0,86040$	} 1,617
78°40	$\epsilon' = 1,39828$	
65°10	$\epsilon = 0,75136$	} 1,602
75°50	$\epsilon' = 1,20280$	
69°40	$\epsilon = 0,90730$	} 1,595
79°10	$\epsilon' = 1,44664$	
67°40	$\epsilon = 0,83066$	} 1,613
77°70	$\epsilon' = 1,343120$	

Un estudio atento de los valores medios $\frac{\epsilon'_o}{\epsilon_o}$ y de sus variaciones nos muestran que las divergencias, no pueden atribuirse á los errores, ni de método, ni instrumentales, ni fortuitos.

Los valores medios correspondientes á la oxihemoglobina cristalizada, con sus pequeñas variaciones, implican la existencia de una sola materia colorante.

Por el contrario: los valores medios para la sangre, con profundas divergencias con los anteriores y con grandes variaciones, muestra la existencia de una variedad de pigmentos.



Conclusiones

Las variaciones que se observan en los módulos de absorción demuestran:

1) Que para la determinación de los valores constantes y característicos K_o , K'_o , K_h , K'_h , etc., es necesario operar con cristales de oxihemoglobina purificados por tres recristalizaciones sucesivas, por lo menos.

Del valor medio encontrado como módulo de los coeficientes de extinción para la sangre humana y para una concentración de 1,5 por mil ó muy vecina, se deduce:

2) Que para la determinación cuantitativa de la hemoglobina en la sangre humana y con fines clínicos, se puede usar sin error sensible las constantes halladas para la hemoglobina de cobayo.

Los esbozos de Hoppe-Seyler, ampliados por Jaquet, Zinoffsky, etc., y completados por las nuevas ideas y resultados obtenidos por Bohr, Gallerani, Sain-Martin, etc., encuentran una nueva comprobación en el estudio que acabamos de hacer.

3) No solamente cada especie de la clase de los mamíferos y cada individuo posee una hemoglobina propia, sino que

cada uno de éstos poseen varias: «existen tantas hemoglobinas y oxihemoglobinas cuantos son, por así decir, los momentos de su existencia» (Gallerani).

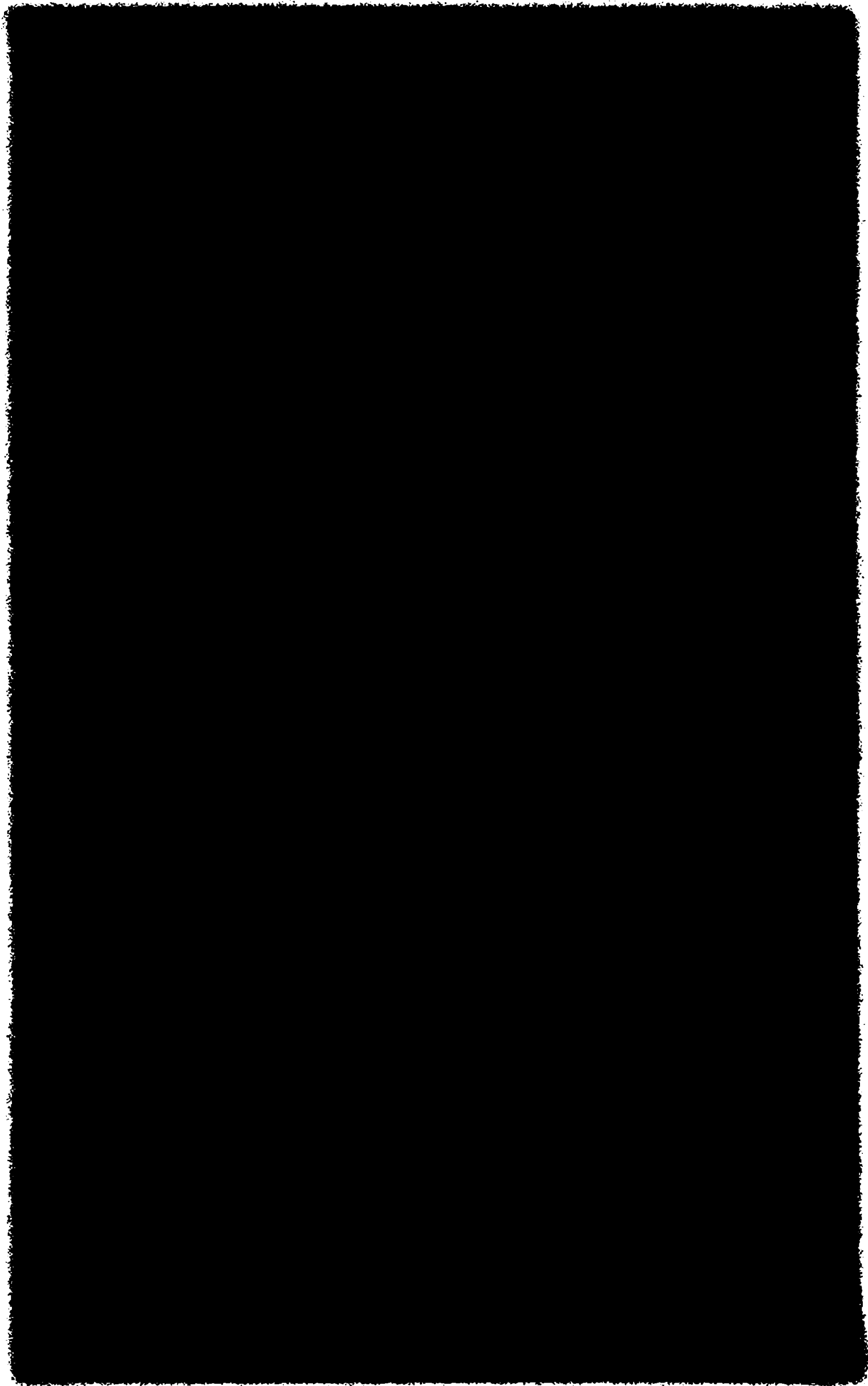
Hay, pues, diferenciación no solamente en el núcleo albuminóideo, sino también en el núcleo coloreado. Y por extensión es lógico deducir que derivan otras tantas carboxihemoglobinas, etc.

En la ciudad de Buenos Aires, á los diez y ocho días del mes de Octubre de mil novecientos diez, los miembros de la comisión examinadora que suscriben procedieron á examinar la tesis presentada por el ex-alumno Alfredo Sanguineti, para optar el grado de Doctor en Química y resolvieron aceptarla.

Enrique Herrero Ducloux.—Horacio Damianovich.—Angel Gallardo.—Eduardo L. Holmberg.—Jacinto T. Raffo.—Guillermo Schaefer.—Miguel Puiggari.—Enrique J. Poussart.

OTTO KRAUSE
Decano.

Pedro J. Coni
Secretario.



BIBLIOGRAFIA

- ALBERTONI y STEFANI.—Manual de Fisiología Humana.
- BERG C.—Tratado elemental de Zoología (1893).
- BOHR CHR.—Sur les combinaisons de l'hémoglobine avec l'oxygène (Bulletin de l'Académie royale danoise.—9 Mai 1890).—Comptes rendus Ac. Sc. 4 Août 1890).
- BRANLY.—Dosage de l'hémoglobine par les procédés optiques (1882).
- CHWOLSON O. D.—Traité de Physique (1906-1910).
- GALLERANI G.—La Spettrofotometria, etc., (1903).
- » Multiplicité des oxyhémoglobines dans le sang normal (XI Congrès de Médecine, Rome 1894).
- GARNIER.—Analyse chimique des liquides, etc. Encyclopédie de Chimie de Frémy.—tome IX.—2^e section (1888).
- GUIART et GRIMBERT.—Diagnostic chimique, microscopique et parasitologique (1908).
- HOPPE-SEYLER F.—Zeitschr, für physiol chemie.—IV Band, 1 Heft — pag. 9 (1880).
- HÜFNER G.—Zeitschr für physikalische chemie.—III band, 6 Heft.—Leipzig (1889).
- HUGOUNENQ.—Chimie Physiologique et Pathologique (1903).
- JAMIN et BOUTY.—Cours de Physique de l'École Polytechnique.
- KAYSER.—Handbuch der spectroscopie (1900-1909).
- KRÜSS.—Kolorimetrie und Quantitative spektralanalyse (1909).
- LABBÉ H.—Analyse chimique du sang.
- LAMBLING E. — Des procédés de Dosage l'hémoglobine (1882). Sang et Respiration.—Encyclopédie de chimie de Frémy.—Tome IX.—2^e section.—2^e fascicule.—3^e partie.
- LANGLOIS et DE VARIGNY.—Eléments de Physiologie.—2^e édition. (1909).
- LECOQ DE BOISBAUDRAN. — Spectres lumineux (1874).

- LIAGRE.—Calcul des Probabilités et théorie des erreurs, etc.—
Bruxelles 1852.
- LUCIANI L.—Fisiología Humana.
- MANSFIELD MERRIMAN.—Método de los cuadrados mínimos.—Tra-
ducido por Valentin Balbin (1889).
- MASCART.—Traité d'optique (1889-1891).
- MOREL ALBERT.—Précis de technique chimique, etc. (1909).
- SALET G.—Traité élémentaire d'Analyse Spectrale (1887).
- SIGALAS G.—Physique appliqué à la pharmacie (1905).
- SAINT-MARTIN G. L.—4^e Congrès Internat. de Physiologie.—Cam-
bridge (1900).
- WURTZ.—Dictionnaire de Chimie.—Art Hémoglobine.
-