

Tesis de Posgrado

Contribución al estudio espectrográfico de la bilirrubina

Grinberg, Alberto

1946

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:

Grinberg, Alberto. (1946). Contribución al estudio espectrográfico de la bilirrubina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0429_Grinberg.pdf

Cita tipo Chicago:

Grinberg, Alberto. "Contribución al estudio espectrográfico de la bilirrubina". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1946.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0429_Grinberg.pdf

"CONTRIBUCION AL ESTUDIO ESPECTROGRAFICO DE LA HEMIRRUBINA"

TESIS

**para optar al grado de
Doctor en Química**

POR Alberto Grinberg

Folio 429

Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Buenos Aires, 1946

El presente trabajo ha sido realizado bajo la dirección inmediata del profesor de Física de la Universidad de La Plata, Dr. Federico Viehböller, en el Laboratorio de Física, del cual es jefe, del Instituto Municipal de Radiología y Fisioterapia. He aplicado los métodos generales y conceptos sobre fotometría y espectrografía ensayados por él durante muchos años de investigación. Sea esta la oportunidad para expresarle mi reconocimiento por todo lo que pude aprender y realizar.

Expreso también mi reconocimiento al titular de la Cátedra de Análisis Biológicas, profesor Dr. Ventura Herrera, no sólo por algunos útiles consejos sobre cuestiones químicas, sino especialmente por haberme alentado durante el curso de realización del trabajo.

Mi agradecimiento al Cirujano de Regimiento, Dr. Paulino Masacchio, por la amplitud y generosidad con que me brindó el uso del moderno instrumental del Instituto, que él dirige, y al Dr. A. López García, del Instituto de Investigaciones Físicas aplicadas a la Patología Humana, por haberme facilitado algunas muestras de bilirrubina.

Notas preliminares.

El informe que presente ha sido dividido en 4 partes: La bilirrubina; Métodos de trabajo; Resultados y conclusiones; Bibliografía. Aunque es lo corriente comenzar con una enunciación de propósitos, me pareció preferible hacerlo con una recopilación de informaciones sobre la bilirrubina, en especial en lo que pueda interesar para estudios espectrográficos, y luego presentar los limitados objetivos que se prop enía realizar este trabajo, ubicándolo dentro del amplísimo marco que comprende al tema de la bilirrubina.

La bibliografía publicada sobre esta sustancia es muy extensa, no sólo por el interés del tema, sino también por los numerosos problemas aun sin resolver. De todo ese material, he seleccionado los estudios en que se mencionaban nuevas características de la sustancia, y todos los trabajos que pude conocer, entre los que tienen alguna relación con la espectrografía de la bilirrubina.

Por la situación de emergencia que aun perdura, no me fué posible obtener algunos trabajos muy vinculados al tema tratado en éste. Los he citado de acuerdo al resumen del "Chemical Abstracts" (o del origen de la cita), tratando de reproducir sólo los datos que surgían en forma muy clara de esos resúmenes. En cada caso, hago constar que la cita es indirecta, escribiendo el título tal como aparece en el resumen y dejando constancia del origen de la cita.

I. LA BILIRRUBINA

Propiedades físicas y químicas.- Es el pigmento principal de la bilis humana. Se admite que generalmente está acompañado por otros pigmentos, en primer lugar la biliverdina, de color verde. Es también la bilirrubina la sustancia que en mayor grado determina el color del suero. Se la ha separado pura, en forma de cristales rojos; se prepara, generalmente, a partir de una variedad de cálculos biliares constituidos por bilirrubinate de calcio, Petersen (1) ideó un procedimiento de extracción de bilirrubina de la bilis, precipitándola en forma de bilirrubinate de calcio.

La bilirrubina es insoluble en agua; insoluble e poco soluble en los alcoholes metílicos y butílicos; soluble en tetracloruro de carbono, cloroformo y bromoformo (2), y en medida menor en acetona, álcalis y sustancias orgánicas básicas. En agua y en los alcoholes se la solubiliza, bajo forma de sal, alcalinizando el medio. Las soluciones de bilirrubina son de color amarillo oro.

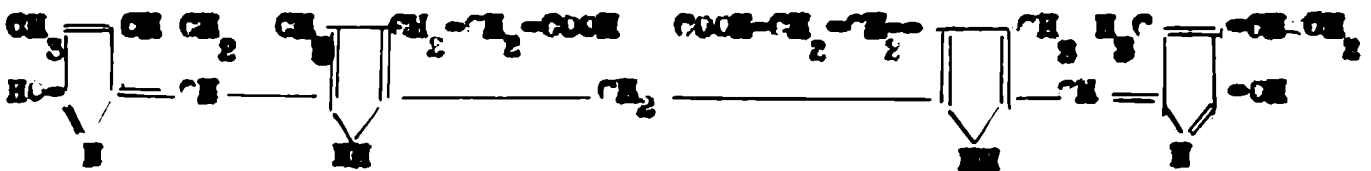
La oxidación de la bilirrubina por medio del ácido nítrico-nítrico origina, en las diversas etapas de la oxidación, sustancias de distintos colores (azul, verde, violeta, rojo, amarillo); en este proceso se basa la reacción de Gmelin.

La principal reacción de identificación, en la cual se fundan la mayoría de los métodos de valoración cuantitativa, es la diazorreacción de Ehrlich. El diazorreactivo es el ácido sulfanílico mesclado, en el momento de usarlo, con nitrito de sodio. En presencia de bilirrubina se produce una sustancia, la asobilirrubina, de color rojo que vira al violeta si se acidifica el medio.

1) Los números subrayados y entre paréntesis indican citas bibliográficas, cuya referencia se inserta al final del trabajo.

Litovitzky (g) encontró que la bilirrubina, obtenida de bilis humanas, y sus derivados, son ópticamente inactivos. Héro (g) estudió los espectros de fluorescencia de la bilirrubina con: con los naturales de fluorescencia rojo-naranja; con radiación ultravioleta (λ 425 m μ) y con los de Wood (λ 365 m μ), fluorescencia de color rojo bastante oscuro. También observó fluorescencia verde, producida por los naturales, en coloides de bilirrubina en agua con ácido glicocólico.

Para la bilirrubina se acepta la siguiente fórmula molecular: $C_{33}H_{36}O_6$, según un trabajo de Hérotier y Fischer, citado por Balgère (g). En 1931, Fischer y Adler (citados por Balgère, g), propusieron una fórmula estructural, confirmada 10 años después en un trabajo de E. Fischer, E. Plöninger y O. Weisberth (g).



En este último trabajo se describen una serie de experimentos: síntesis de varios derivados de la bilirrubina, estudio de sus propiedades de transformación, espectros de absorción de la luz y de rayos X. Esta fórmula revela la vinculación existente entre bilirrubina y hemoglobina: la diferencia fundamental reside en que en la primera se ha preservado la apertura del grupo protético, el hemo se ha transformado en 4 grupos pirrólicos dispuestos en cadena lineal. G. A. Adams (g) compara los espectros de absorción de hemoglobina y varios de sus derivados (hematina félica, hematoportirina, oxihemoglobina, carbonohemoglobina), con el de la bilirrubina. Todos ellos, a excepción del último, se caracterizan por una banda de absorción intensa en 4.100A (la presencia de esa banda en hematoportirina indica que ella no es atribuible a la presencia del hierro en la molécula); la

cula); la bilirrubina, en cambio, tiene una ancha banda de absorción entre 4.000 y 5.000 Å, sin áreas selectivas. Adams interpreta el hecho como demostrativo de la apertura del hem, y ello se confirma, por métodos químicos, en los trabajos de Fischer y colaboradores.

Inestabilidad de la solución. Las soluciones de bilirrubina, expuestas a la luz y en contacto con aire, son inestables. Al cabo de un cierto tiempo, variable según cual sea el disolvente utilizada, y de acuerdo con la concentración y otras condiciones, van perdiendo su color, que se transforma en un amarillo poco intenso, de tono cada vez más verdoso (atribuible a la transformación en biliverdina), llegándose finalmente a un precipitado de color rojo oscuro.

Esa inestabilidad es más notable en las soluciones alcalinas, en las que la cuantía de la transformación ha sido determinada por métodos espectrofotométricos, en función de la pérdida de color. Es así que Rahier (9) encuentra que la solución en hidróxido de sodio N/100 pierde al cabo de una hora el 30 % de su poder de absorción de la luz. Sheard, Mann y Belleman (10) determinan el valor de la alteración, en tiempos distintos a contar desde el momento de preparación de la solución. En soluciones debilmente alcalinas, según esos autores, la transmisión se aumenta, para la longitud de onda de 4.700 Å, de 20 % 81 %, en el plazo transcurrido entre las 12 horas y las 24 horas, después de la preparación de la solución. Sheard, Boldes, Mann y Belleman (11) hacen similares determinaciones sobre bilis de perro y en bilis, plasma y suero humanos, contando los tiempos a partir del momento de la extracción.

Lambrechts y Baras (12) determinan la pérdida de poder de transmisión en soluciones alcalinas, encontrando que la alteración es ya notable a los 20 minutos de preparada la solución.

Williams y Gabelle Ruiz (13) también observan un cambio en los espectros de soluciones clorofórmicas: la banda de absorción con máximo

en 4.300 Å se desplaza a las 48 horas hasta 4.050 Å y a los 15 días aparece otra poca marcada en 2.750 Å, desapareciendo la primera. También observan desplazamientos en soluciones preparadas por dilución de un volumen de solución clorofórmica con 9 volúmenes de alcohol etílico o metílico.

Roy y Bestario (14) demuestran la inestabilidad de soluciones clorofórmicas y alcohólicas, pues las determinaciones espectrofotométricas indican que no se cumple la ley de Beer. Se cumple en forma aproximada en un tubo de cubetas diluido con soluciones "buffer" de igual pH. En soluciones de bilirrubina en alcohol de sodio al 0,5 %, la densidad óptica disminuye rápidamente con las diluciones (15).

Se han ideado diversas métodos para conseguir la estabilidad de las soluciones de bilirrubina. Miller y Nagels (1) la obtienen, en forma no completa, agregando ácido acético a las soluciones alcohólicas, con el inconveniente de presentarse un fuerte efecto Tyndall. Hollnager, citado por estos mismos autores, neutraliza las soluciones alcohólicas, inmediatamente después de la disolución, con ácido tartárico. Burns (16) estudió, con resultados negativos, la posibilidad de estabilizar soluciones alcohólicas de bilirrubina con formal, hidrosulfato y tiosulfato de sodio; en cuanto a algunas antioxidantes enoxadas (polifenoles, Urag, formal, tirocina), las encuentra diversas inconvenientes. Finalmente utiliza, con buen resultado, el ácido ascórbico para la estabilización de bilirrubina en líquido dicromal, y lo aplica a soluciones alcohólicas en un trabajo realizado en colaboración con Lambrecht (17), en el que determinan espectrográficamente el grado de eficacia de la acción estabilizadora.

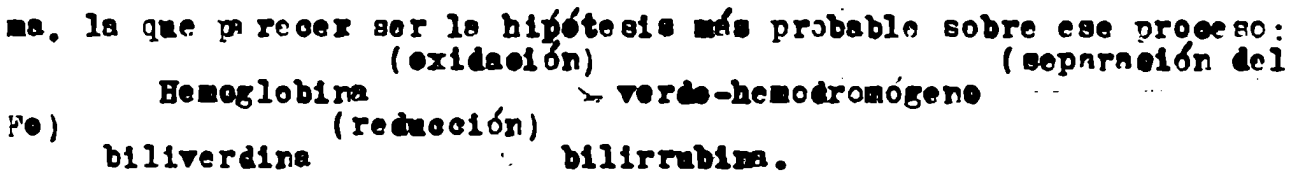
Henry y Henry-Cornet (18, 19) estudian espectrográficamente las soluciones acuosas y alcohólicas, alcohólicas, de bilirrubina, preservándolas con atmósfera de nitrógeno.

Roy y Bestario (14, 19) estabilizan soluciones alcohólicas o

clorofórmicas por dilución con suero, y también consiguen buenos resultados con soluciones "buffer" (pH 6,85-7,20) con el uso de proteínas del suero.

Hubbard y Heilbrun (20) estabilizan con fenol soluciones clorofórmicas concentradas, diluídas con otros disolventes.

Procesos de formación y transformación de la bilirrubina en el organismo.- La bilirrubina se forma de preferencia en el hígado y también en las células del sistema retículo-endotelial; esta producción extrahepática se demuestra por la extirpación del hígado (operación de Mann). H. Fischer demostró que la sustancia oscura que se forma en los hematomas (la antigua "hemateidina" de Virchow) no es otra cosa que bilirrubina. Si se inyecta bilirrubina a perros, aumenta la secreción de bilirrubina. Estas y otras experiencias, así como las consideraciones que se expusieron al hablar de la fórmula de la bilirrubina, demuestran la vinculación existente entre ésta y la hemoglobina. Cuáles son las fases en el proceso de transformación de hemoglobina en bilirrubina es cuestión que aun se discute; Deulofeu y Marenzi (21) (de cuyo libro extraetamos la mayor parte de estos aspectos biológicos de la bilirrubina) resumen, en el siguiente esquema, la que parece ser la hipótesis más probable sobre ese proceso:



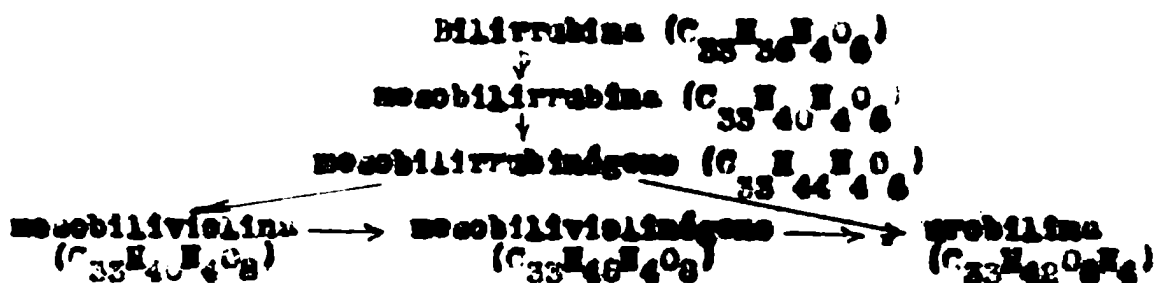
En el verde-hemocromógeno la oxidación ya ha abierto el núcleo del hem, pero contiene todavía hierro divalente unido a una sustancia básica y los grupos sustituyentes de los núcleos pirrólicos/ son los mismos que en el hem. En la biliverdina, por acción de los ácidos, se han perdido el hierro y las sustancias unidas a él. Por lo general, todas estas hipótesis se apoyan en experiencias realizadas "in vitro". Algunos

hechos se han comprobado "in vivo" (Zuelstorf y Harnasi, 21):

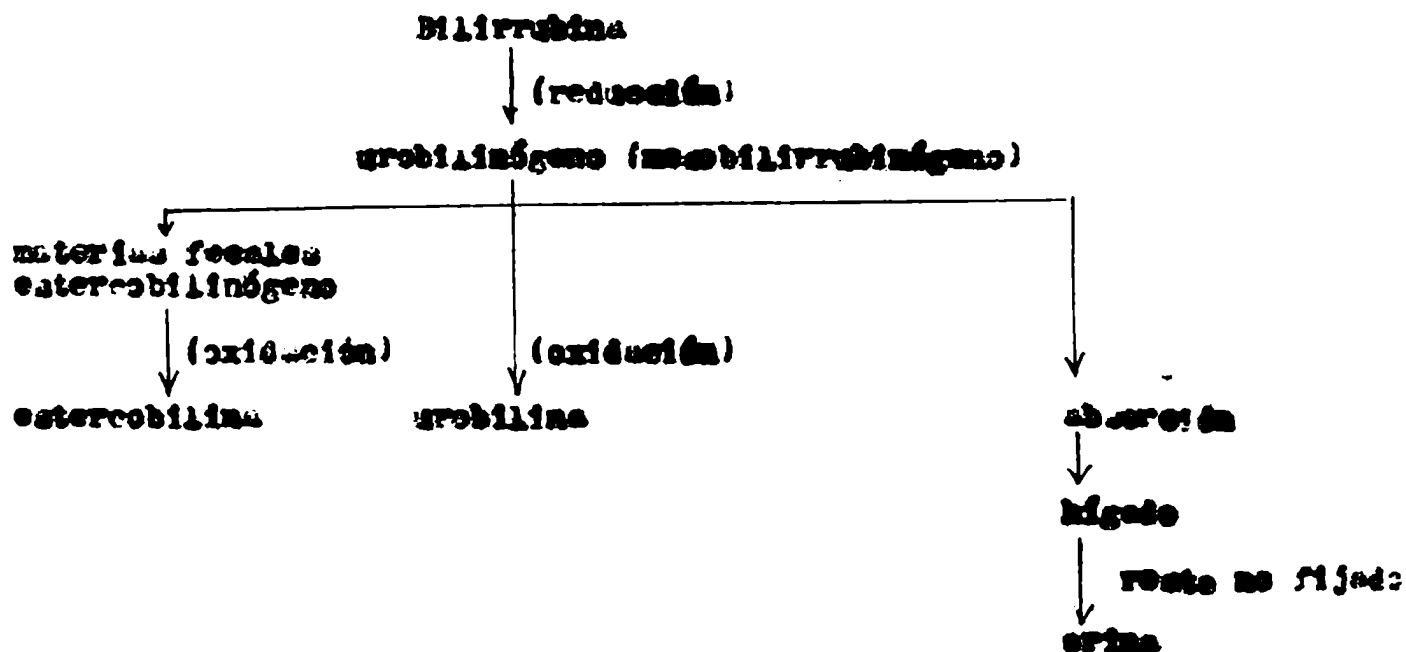
a) El verde-hemocromógeno ha sido hallado en hígado de caballo y en uero y glóbulos rojos de cerdo.

b) Se ha demostrado que ciertos tejidos, especialmente hígado, riñón y cerebro, son capaces de reducir biliverdina a bilirrubina.

De Rayer (22) da el siguiente esquema sobre las transformaciones sufridas por la bilirrubina en el organismo:



Zuelstorf y Harnasi (21) publican el siguiente esquema:



La urobilina y la esterco-bilina son sustancias muy semejantes.

Recher y Baumgartner, en trabajos citados por Rayer (22), obtienen meso-bilirrubina reduciendo bilirrubina por reducción hidrogenación catalítica, y preparan el mesobilirrubinógeno por reducción más energética (con

unligama de sodio. La mesobilirrubina ha sido obtenida como producto de oxidación del mesobilirrubinógeno.

Según Desloofes y Harens (21), el proceso más probable es éste: la reducción de bilirrubina en mesobilirrubinógeno ocurriría especialmente en la parte alta del intestino. El mesobilirrubinógeno algo modificado (estercobilinógeno) es eliminado por las materias fecales, aunque una parte es absorbida pasando a sangre; esta fracción, en su mayor proporción, es fijada nuevamente en el hígado, eliminándose el resto por orina.

Bilirrubina directa e indirecta.— H. van den Bergh utilizó la reacción de Ehrlich en su método de determinación cuantitativa de bilirrubina. Desde un principio, agregaba alcohol a las sueros, antes de hacer actuar el diazoreactivo. En 1921 descubrió que había sueros con los que no era necesaria la previa adición de alcohol para producir la diazoreacción. La primera forma de reacción se denominó directa (sin alcohol), la segunda indirecta. Se produce reacción directa en los sueros normales, en sueros de enfermos de ictericia hemolítica o de anemia perniciosa; se obtiene reacción directa en sueros de enfermos atacados de ictericia por obstrucción de las vías biliares, y en bilis normal. Varela Fuentes admitió la bilirrubina indirecta a la "reacción soluble"; es decir la que no extrae del suero mediante ese disolvente.

Posteriormente, fueron variando los conceptos, en forma paralela a la variación de la técnica empleada en la diazoreacción. Posteriormente, en lugar de alcohol, se agrega cafeína y benzoato de sodio, con lo cual se hacen reaccionar total la bilirrubina, y se llama bilirrubina directa a la que reacciona sin necesidad de esos agregados.

Gregory y Anderson (22), en un trabajo publicado en 1937 (en el que demuestran la inexactitud de la hipótesis de Vaughan y Hubbard que sostenían que la reacción directa es simplemente debida a la alta concentración de bilirrubina), citan diversas teorías sobre el signi-

fiende de los dos tipos de reacción:

a) Van den Bergh sostenía que la bilirrubina directa es la más fácilmente adsorbible por las proteínas precipitadas por alcohol.

b) Callison y Fowweather creen que la directa es probablemente una sal de amonio y la indirecta ácido libre.

c) Grossberg encuentra diferencias en la solubilidad en cloroformo entre los dos tipos de bilirrubina.

d) Hoover y Blankenhorn y Leaché hallan que la bilirrubina de los enfermos de ictericia por obstrucción es más fácilmente dializable por membranas de celodio, que la bilirrubina de los enfermos de ictericia hemolítica. Etc.

Griffiths (25) afirmaba haber aislado de la biliar un pigmento con reacción directa, con diferente estructura química que la bilirrubina del suero normal. Fowweather (26), sin llegar a resultados concluyentes, afirma la posibilidad de la existencia de sales de las dos formas de bilirrubina, con diferencias en su estabilidad y en otras características físicas y químicas.

Actualmente, muchos autores sostienen que no hay diferencias esenciales entre estas reacciones, y la conveniencia de substituir las denominaciones de "directa" e "indirecta" por las de reacción "pronta" e "retardada", o clasificarlas en base al porcentaje de cada tipo de reacción, sin límites netos o características. Las interpretaciones son aun hoy muy contradictorias, desde las que creen en la existencia de "dos" bilirrubinas químicamente distintas, pasando por las que sólo admiten diversidad en los estados físico-químicos, hasta las que no encuentran ninguna diferencia esencial y niegan o disminuyen el valor clínico de las dos formas de reacción.

En varios trabajos se pretende dilucidar la cuestión por métodos espectrográficos e espectrofotométricos. Keller y Engels (27) no

encuentran, entre los espectros de ~~bilirrubina~~ originada en uceros con reacción directa e indirecta, diferencias atribuibles a distinta configuración química de la bilirrubina.

Magath y Meurd (22) en un estudio espectrofotométrico de uceros con estos tipos de reacción, no encuentran diferencias que apoyen la hipótesis de las dos bilirrubinas químicamente distintas.

Heilmeyer y Krebs (23) compararon curvas de absorción de la luz de uceros de los dos tipos con las obtenidas con bilirrubina pura disuelta en clorofono o éter, tales como ~~siempre~~. Llegase a la conclusión de que no existen diferencias entre las moléculas de ambas bilirrubinas.

Por el contrario, Davis y Meurd (24), en un estudio espectrográfico de uceros ictericos, encuentran diferencias de posición de los máximos de absorción y de transmisión, entre los valores promedio de los de reacción directa y los de reacción indirecta. Como ventaja respecto a los trabajos anteriores, abarcan no sólo la región visible del espectro, sino también la ultravioleta, pero el pequeño número, nueve en total, de uceros estudiados, quizá hace aventurada la conclusión extraída, de que cada tipo de reacción se origina en una especie química que le es característica.

Bilirrubinemia normal y su valor diagnóstico. En comunicoión de Gaster y López García a la Academia Nacional de Medicina, citada por Delance (op. cit., pág. 43), se mencionan resultados obtenidos por varias series en determinaciones de bilirrubinemia normal. Las cifras son todas del orden entre 1 y 10 mg./L., oscilando entre los valores de 1 a 2,5 mg./L. de van den Bergh, hasta los valores de 10 mg./L. que Forster y Furtner y Schiff consideraban como máximos normales.

Delance (25), en determinaciones efectuadas entre uceros de más de 400 conscriptos argentinos, en las que utilizó el método de Heilmeyer y Krebs, encuentra una cifra promedio de 5,2 mg./L.; los valores más

frecuentes con los de 3, 4, 5 y 6 mg./l.; cifra mínima (un caso), 1,67 mg./l.; y considera máximas anormales (las que ocurren en el 9,2 % de los casos), las superiores a 10 mg./l. Sin tomar en cuenta cantidades exiguas (1 ó 2 mg./l.) de bilirrubina directa, encuentra ese tipo de reacción en el 8,4 % de casos sueros "normales" (explicando el presunto origen de la anomalía, en cada caso). En niños de corta edad (3 meses a 11 años, 31 casos) encuentra cifras en general más bajas; ninguno sobrepasa los 7 mg./l. En 19 determinaciones de sueros de mujeres adultas, no encuentra diferencias apreciables con las cifras correspondientes a hombres.

Malloy y Evelyn (21), empleando un nuevo método de determinación de bilirrubinemia basado en la utilización de un calorímetro con célula fotoeléctrica, encuentran, para un mismo suero, valores considerablemente más altos que los obtenidos por otros métodos, de donde surge la posibilidad de que las diferencias en las cifras promedio de bilirrubinemia normal, dadas por diversos autores, se deban más que a otra cosa, a la forma de efectuar las determinaciones.

Rodenas (22) considera la cifra de 9 mg./l. como bilirrubinemia normal mínima. Según el mismo autor, las cifras hasta 20 mg./l. indicarían ictericia latente, y las superiores a ese valor, ictericia clínica.

Rahier (2) sostiene que el coeficiente de extinción para sueros normales oscila poco alrededor de un promedio, y utiliza ese promedio como característica de una unidad estándar de bilirrubinemia. De acuerdo a ese criterio, y siguiendo siempre a Rahier, la ictericia correspondiente a 4 unidades y la apartada de bilirrubinemia, de significado patológico, coincidiría con bilirrubinemia de 9 unidades.

Castro, López García y Solano (23) encuentran los siguientes valores, en algunos casos de sueros de enfermos, en mg./l.: atropia amarilliza aguda: 400 (directa, 70; indirecta, 330), y 575 (dir., 205; ind.,

290); esteosia del colágeno: 250 (dfr., 200; infr., 20); ácidos cole-
steroles por absorción: 199,5 (dfr., 167; inf., 22,5); ictericia hemolíti-
ca (infr., 37,4); anemia perniciosa: 17,2 (infr., 17,2); ictericia he-
moltica: 64 (infr., 64).

Importancia de las estudios espectrográficos de soluciones de bi-
lirrubina. La bilirrubina plantea a la química biológica problemas in-
tercantes y de importancia. Por sus características peculiares resul-
tan notables las perspectivas que presenta la aplicación de los métodos
físicos a la resolución de esos problemas, para con los datos que permi-
ten estudiar la sustancia sin alterar la estructura. En lo que se refie-
re a la bilirrubina, los estudios espectrográficos (determinaciones de
curvas de absorción o de coeficientes de absorción molar) pueden con-
tribuir a seleccionar los siguientes aspectos:

A. Base para la identificación cualitativa.

B. Estudio de las variaciones de comportamiento en los diversos
disolventes y con distintas condiciones del medio (pH, estructura con-
o de nitrógeno, etc.).

C. Estudio de la inestabilidad de las soluciones, tomando espectros
en tiempos distintos, contados desde el momento de preparación de la so-
lución. Igualmente, estudio de la eficacia de los agentes estabilizadores
propuestos.

D. Estudio de la estructura química de la molécula, por compa-
ración con espectros de sustancias obtenidas por síntesis, o con espec-
tros de otras sustancias naturales, o por posible identificación de gru-
pos atómicos con máximos de absorción característicos.

E. Aplicación al análisis cuantitativo. Debe tenerse en cuenta
que los dos grandes grupos de métodos de determinación cuantitativa de
bilirrubina han sido fuertemente criticados:

1. Método del índice icterico, o sea determinación de bilirrubinemia

por medición del color amarillo del suero. Debe tenerse en cuenta que, aparte de la bilirrubina, pueden existir en el suero otros pigmentos (como rotens, xantófila, etc.) que contribuyen a determinar el color amarillo. Al separando esos pigmentos por medio del éter de petróleo, pueden quedar pigmentos amarillos, distintos de la bilirrubina: restos de xantófila, etc. (Lilica, loc. cit., págs. 51).

2°: Los métodos fundados en la medición del color obtengo por dilución sirven, más que todo, para la comparación de magnitudes relativas halladas en determinaciones sucesivas; en lo que se refiere a los valores absolutos, los diversos métodos dan resultados discordantes, por la distinta manera en que los reactivos afectan a la bilirrubina y dando exponentes del suero (en los métodos más antiguos, grandes pérdidas de bilirrubina por adsorción en el precipitado de proteínas). En otros casos, las discordancias surgen del mismo grado de sensibilidad o exactitud del instrumental (colorímetro, fotómetro, etc.) usado en la medición del color, del valor inadecuadamente determinado del color del testigo o en la acción de los filtros coloreados usados en los fotómetros. Es así que Malloy y Evelyn (31) encuentran, para un mismo suero, los siguientes valores de bilirrubinemia:

por el método van den Bergh: 2,6 mg./l.

Jendrassik-Anderson: 2,3 mg./l.

Jendrassik: 2,4 mg./l.

Malloy-Evelyn: 4,0 mg./l.

Y el caso se repite para varios otros sueros.

El método espectrográfico da la posibilidad de determinar la concentración de bilirrubina directamente sobre el líquido original, por medidas de absorción para una longitud de onda característica y específica de la sustancia (de máxima o mínima absorción). Claro es que

pueden presentarse objeciones e inconvenientes, por ejemplo, ¿en qué grado puede aplicarse un coeficiente determinado en solución de bilirrubina pura, al cálculo de su concentración en un líquido natural complejo? Además, el método espectrográfico es largo y costoso y requiere un intenso trabajo previo de estandarización, para cada aparato y sistema de condiciones de trabajo.

F. Se han aplicado la espectrografía y la espectrofotometría en tentativas de solucionar el problema de los dos tipos de diazorreacción.

Todos o casi todos los trabajos espectrográficos encaran la determinación completa de la curva de absorción, y han tomado en cuenta el problema de la inestabilidad de las soluciones. Ya se hizo referencia a los trabajos en que se estudia especialmente la inestabilidad, a los que encaran la cuestión de los dos tipos de reacción y a los que aplican la espectrografía al estudio de la estructura molecular (Adams y Fischer y colaboradores). Henry y Henry-Cornet (17, 18), Davis y Sheard (33), Sheard y Magath (28) y Rey y Bentarie (34) aplican la espectrografía a la determinación de bilirrubinemia.

Enumeraremos los trabajos sobre determinación espectrográfica (algunos de ellos espectrofotométricos) de curvas de absorción de soluciones de bilirrubina.

En la región visible del espectro:

Sheard, Beldes, Mann y Bolleman (11) en sueros, plasmas, bilis y mezclas de suero y bilis con alcohol (año 1926).

Sheard, Mann y Bolleman (10) en sueros, bilis de perros y soluciones alcalinas (1927).

Magath y Sheard (28) sobre sueros, diluidos o no con mezclas de alcohol-acetona (1927).

Rahier (9) en soluciones alcalinas (1929)

Kuller y Raga (2, 21, 22) en aceites, cloroformo y en soluciones acuosas con ácido ascórbico (1931).

Heilmeyer y Heilmeyer y Zapp (23, 24) en soluciones alcalinas, alcobólicas, cloroformicas, acetónicas (en agua con ácido tartárico) y en aceites (1932).

Roy y Bostaric (14, 15, 25) sobre soluciones cloroformicas y alcobólicas y en aceites (1939, 1941, 1943).

Sobre región ultravioleta (algunos comprenden también el visible):

Ottow, Emerson y Woodruff (26) en soluciones en cloroformo, acetona, alcohol alcalino y alcohol-acetona alcalina, y en aceites (1928).

Henry Adams (8) en soluciones acuosas y de alcohol-acetona alcalina (1936).

Henry-Cornet y Henry (17) en soluciones acuosas y alcobólicas alcalinas (1936); en aceites (18) (1937).

Davis y Beard (27) en soluciones alcalinas y en aceites; y en aceites con ambos tipos de reacción (30, 1937).

Lambrecht y Barac (12) en soluciones alcalinas, con y sin agregado de ácido ascórbico (1939).

Williams y Cabelle Fox (13) sobre soluciones cloroformicas, metil-alcobólicas, etil-alcobólicas, acetona-alcobólicas y en aceites humanos y de perros (1943).

Vierheller (29) en soluciones alcalinas y en aceites (1946).

Objetivo y características generales del presente trabajo. Se estudiaron soluciones de bilirrubina en tres disolventes distintos, en la región ultravioleta del espectro.

Se trató de obtener datos útiles para las condiciones corrientes de trabajo. No se utilizó bilirrubina purificada, sino la de varias marcas de uso común, considerando como estándar a la de la marca Hoffman-Laroche, que según van den Bergh es idéntica al preparado cristalino de E. Fischer (citado en 12).

El problema de la estabilidad sólo se encará en lo que pudiera afectar a los resultados descritos, es decir en cuanto a la validez de la curva de absorción. Por ello se tomaron copias de la misma sustancia al principio y al final de la irradiación de cada película, para constatar posibles variaciones ocurridas durante el curso de las experimentaciones. Por lo demás, se trabajó sin ninguna protección especial (atmósfera inerte, oscuridad, etc.) en parte por no contar con facilidades para la realización de esas condiciones, y también para obtener datos sobre estabilidad en condiciones similares a las corrientes en laboratorio. Solamente se usó la protección de un CaF_2 para diluciones o para el espectrograma final porciones irradiadas de la solución, pero esto constituiría un factor excepcional, entre los casos de producir alteraciones. Es así que la radiación ultravioleta acompaña al cloroformo, con protección de ácido clorhídrico (trabajo de D. Hill, citado en 22). Se acuerda, por lo tanto, porciones no irradiadas de las mismas soluciones iniciales.

Para la elección de los tres disolventes se tuvo en cuenta:

a) El cloroformo es el disolvente clásico y el más común para la bilirrubina; se le atribuyó una función selectiva en la separación de los "dos tipos" de bilirrubina.

b) El éter no ha sido estudiado para el ultravioleta; además, se ha hablado (Vercia Santos y colaboradores, citados en 22) de una bilirrubina "éter extrahible", observada en recipientes de la ampolla de Vater, y se la consideró como una nueva clase de bilirrubina.

c) El alcohol metílico ha sido preferido a otros disolventes (entre ellos la acetona, cuya absorción para distintos espesores de capa fue estudiada en una película previa) por su buena transmisión en una zona seria del espectro, hasta bajas longitudes de ondas (2850 Å), permitiendo comparar las diversas marcas de bilirrubina en zonas del espectro en que presenta una fuerte absorción. Datos de la sustancia. Mithard y Melbrum

(22) utilizan el metanol como disolvente del reactivo en diversas diluciones de la bilirrubina. También es usado en varios métodos de detección de bilirrubinemia, por ejemplo el de Giarano y Frostel (23) y el de Malloy y Evelyn (24).

Con estos disolventes como base, se han encontrado tres tipos de soluciones muy comunes en los estudios sobre bilirrubina:

1) Soluciones en cloroformo puro.

2) Soluciones alcalinas, en las que el disolvente es una mezcla de metanol con agua e hidróxido de sodio. Este tipo de solución ha sido utilizado en diversos alcoholos, en los que por lo general la bilirrubina es insoluble.

3) Diluciones de soluciones cloroformicas con otros disolventes. En este trabajo se han estudiado soluciones de bilirrubina en cloroformo con 9 volúmenes de éter. En estudio previo demostré que la solución preparada en cloroformo con 25 volúmenes de éter no era transparente.

En cuanto a la determinación cuantitativa de bilirrubina, sólo se vio la posibilidad de aplicarla a soluciones puras de bilirrubina. Su extensión a las determinaciones en líquidos naturales no puede preverse "a priori", y no parece recomendable sin la realización previa de ensayos numerosos y sistemáticos sobre esos mismos líquidos naturales, de constitución generalmente muy compleja.

Los resultados de este trabajo tal vez podrían contribuir a dilucidar algunos de los problemas enunciados (las "dos" bilirrubinas, etc.) por comparación de estas curvas con las obtenidas en otros. También es posible que resulten útiles estas curvas en la comparación con las obtenidas en extracciones, realizadas con estos tres disolventes, sobre líquidos naturales.

II. MÉTODOS DE TRABAJO.

1. Los reactivos.

Reactivos. Se utilizaron las siguientes marcas, indicándose la cantidad que declaraban:

Cloroformo: marca "La Holanda", "purísimo".

Éter: marca "Eran", "para análisis".

Alcohol metílico: marca "Merck", pura simplemente sin especificación

hidrúrico de sodio: marca "Merck", "pro análisis".

El cloroformo se purificó de acuerdo a lo recomendado por Orignor (42). Se trató con ácido hidrúrico, sin notarse coloración. Recientemente se lavó con agua, con solución concentrada de hidrúrico de sodio y nuevamente con agua, varias veces. Se secó y usó el cloroformo con el rare de calcio, y se lo destiló, recogiendo la fracción entre 61° y 62°.

El alcohol metílico se purificó por destilación, recogiendo la fracción entre 65° y 66° (43). Teniendo en cuenta que, a diferencia de etílico, el alcohol metílico no forma mezcla azeotrópica con el agua y que, en definitiva, el alcohol podría ser mezclado con una cantidad escasa, no se consideró indispensable la eliminación total del agua (por ejemplo, mediante destilación con magnesio).

Para desecar el éter se lo destiló sobre cal viva, recogiendo la fracción entre 34° y 35° (44).

Reactivos de hidrúrico. En la mayor parte de estas encuestas se siguieron las normas indicadas por la Farmacopea Nacional Argentina (45).

Cloroformo (op. cit., págs. 200-202): se evaporaron 10 c.c. de cloroformo, obteniéndose una pesada menor de 0,002 g. en el residuo. Se lo hizo evaporar, en pequeñas porciones, sobre papel de filtro, sin recibir el extracto. Para el ensayo de lactosa, cloruro y cloro libre

se agitó cloroforme con agua destilada, utilizándose 3 porciones distintas de la capa acuosa para comprobar la inexistencia de esos impurezas, mediante el uso de tornasol, nitrato de plata y almidón-ioduro de potasio, respectivamente. Con vainillina y resorcina se obtuvo al cabo de una hora una mezcla opalescente e insoluble; al agregar amoníaco se comprobó la inexistencia de ácido clorhídrico. Mezclado el cloroforme con ácido sulfúrico permaneció insoluble, aun agregando nitrato de plata, la capa ácida. El cloroforme con ácido sulfúrico y solución de metanol 5:1, al cabo de media hora, una mezcla prácticamente insoluble, indicando que no existían o eran muy escasas las sustancias de decomposición. La inexistencia de aldehydos y cetonas: se probó así: sobre una extracción acuosa de cloroforme se agregó solución alcohólica de ioduro potásico y mercurico, no observándose enturbiamiento ni precipitado al cabo de un minuto.

Éter (op. cit., págs. 280-281): La inexistencia de ácidos se demostró agregando alcohol de 80° con feniltalceína e hidróxido de sodio 0,02 N (hasta coloración rosada) a una porción de éter con 2 gotas de la misma solución alcalina se obtuvo esta reacción básica. Con solución de ioduro de potasio el éter no dió coloración, por inexistencia de peróxidos. Tampoco se obtuvo color característico al éter un trozo de hidróxido de potasio, por ausencia de sustancias reductoras orgánicas. Mezclado éter, solución alcalina de ioduro mercurico y potásico y solución saturada de cloruro de sodio, no se observó prácticamente ningún enturbiamiento (después de agitación y reposo) que indicara la presencia de aldehydos o cetonas. Evaporados 50 c.c. de éter, el residuo no alcanzó a 1 mgr. Hecha evaporar una porción sobre papel de filtro, no se percibió olor extraño. La inexistencia de alcohol vinílico: se demostró al no tener opalescencia con solución ácida de sulfato mercurico.

Hidróxido de sodio: el carbonato se ensayó sobre el residuo de la solución de la droga en alcohol de 80° neutro, empleándose para

neutralizarlo con 1 cmc. de ácido sulfúrico 0,2 N (entre 0,2 g. de droga). Neutralizado 5 g. de droga con ácido clorhídrico y habiendo agregado amoníaco hasta reacción alcalina, el residuo de la filtración es de menos de 0,005 gr. (ensayo de aluminio, hierro y sustancias insolubles en ácido clorhídrico). La solución acuosa al 5 % resultó incolora y límpida, indicio de ausencia de sustancias insolubles y materia orgánica. Con ácido nítrico y nitrato de plata se ensayaron cloruros, no observándose prácticamente opalescencia. Tampoco se observó turbidez en el ensayo de sulfatos, realizado con cloruro de bario.

El alcohol metílico, una vez destilado, respondía a las normas "Anglar" (44). Sólo se utilizó la fracción que destilaba entre 65° y 66°. Con hidróxido de sodio, y lo mismo con ácido sulfúrico, no dió coloración, indicando la ausencia de impurezas orgánicas. Miscible en todas proporciones con el agua, con la formación de mezclas incoloras y transparentes. El residuo de evaporación de 60 cmc. pesaba menos de 0,001 gr. El ensayo de acetona, realizado con iodo y hidróxido de sodio y, después de reposo, con ácido sulfúrico y titulado con tiosulfato el iodo desprendido, dió una concentración de impureza inferior a 0,04 %.

Las disoluciones: El cloroformo se utilizó puro. Para las emulsiones que denominaremos "en éter" se mezclaba un volumen de solución cloroformica con 9 volúmenes de éter, y luego se diluía con la mezcla de disolventes (10 % de cloroformo) hasta llegar a la concentración deseada de bilirrubina. Las emulsiones de "alcohol metílico" se prepararon con una mezcla de 96 partes de alcohol metílico puro con 4 partes de solución acuosa N/10 de hidróxido de sodio. De esta manera, resultaba un alcohol metílico de 96°, el de uso más común, con concentración de hidróxido de sodio N/250. Teniendo en cuenta que a mayor concentración de álcali es mayor la inestabilidad, se trabajó con la alcalinidad mínima necesaria para una

buenas disoluciones; ensayos previos habían demostrado que con cantidades de muestra no se disolvía perfectamente la bilirrubina.

Las diluciones: Se pesaban en vidrio de reloj cantidades de muestra de 10 mg. de bilirrubina, por el método de la doble pesada. El error resultaba inferior al 1 %. El disolvente se agregó directamente sobre el vidrio de reloj y la solución se traspasó cuantitativamente a un matraz aforado de 50 ml., realizándose las lavadas necesarias. Se tomó como hora de preparación de la solución la del primer contacto de la bilirrubina con el disolvente.

Las diluciones se hacían en tubos de ensayo, utilizando pipetas graduadas de 10 ml. de capacidad, y una bureta de 50 ml. para las diluciones. De cada solución se reservaba una parte, que no se irradiaba, para posteriores diluciones. En general, las soluciones se preparaban por diluciones de las más concentradas, y no diluciones de la "stock". De esta manera, resulta más exacta la comparación entre espectros correspondientes a soluciones de distinta concentración, pero si bien puede haber error en el valor absoluto de las concentraciones, se mantiene muy aproximado el valor de las relaciones entre las diversas concentraciones.

El material volumétrico se calibró por pesada con agua destilada.

Las muestras de bilirrubina se mantuvieron resguardadas de la luz y de la humedad. En cambio, no se tomó ninguna precaución especial con las soluciones, aparte de conservarlas bien tapadas durante el tiempo requerido para la espectrografía. Al final de cada película se tomó un espectrograma con la misma solución utilizada para el primero.

2. Extinción

Regla general en extinción de absorción: Cuando un haz de radiación atraviesa un cuerpo no transparente, sufre pérdidas de energía. La ley de Lambert (según algunos autores, ley de Beer) expresa la relación entre la intensidad de luz que entró en el cuerpo (I_0) y la que salió del mismo (I_1), siendo h el espesor de la capa absorbente (47):

$$(1) \quad I_1 = I_0 e^{-h}$$

La intensidad I_0 es la del haz incidente menos la reflejada en la cara anterior; I_1 es la intensidad emergente menos la pérdida por reflexión en la cara posterior y en base a la (1) se define a h , constante para cada cuerpo, como "coeficiente de absorción". Más definitivos a I_0 como intensidad incidente y a I_1 como intensidad emergente; en esta forma resulta incorrecto llamar a h coeficiente de absorción.

La intensidad absorbida es

$$I_a = I_0 - I_1$$

Vierheller y colaboradores (48) exponen una forma más general de explicar el fenómeno, tomando en cuenta todos los factores. En efecto, además de las pérdidas por absorción y reflexión, hay pérdidas por difracción o dispersión (rayos con dirección no paralela a la del haz) y por refracción. En la relación

$$(2) \quad I = I_0 e^{-\mu h}$$

I e I_0 son intensidades emergente e incidente, y μ tiene un sentido más general que h ; es la magnitud que Vierheller y colaboradores denominan "coeficiente de extinción", que expresa total la pérdida de intensidad del haz incidente.

Una expresión más cómoda para el cálculo es esta:

$$(2) \quad I = I_0 \cdot 10^{-\epsilon l}$$

Es el "coeficiente de extinción" de Bunsen y Roscoe (42,50). Si-
 guiendo siempre a Viehwaller y colaboradores, parece preferible la uti-
 lización del coeficiente μ , directamente vinculado a la ecuación que
 representa matemáticamente al fenómeno, y cuya integración conduce a
 la (1). Se suele llamar "coeficiente de absorción" a μ y "coeficiente de
 extinción" a ϵ , lo cual es incorrecto para el segundo ya sólo una trans-
 formación algebraica del primero, mientras que la absorción y la extin-
 ción son dos fenómenos distintos. En el sentido en que hemos definido
 las magnitudes I_0 e I en la (2) (intensidad incidente y emergente), los
 coeficientes μ y ϵ son coeficientes de extinción, relacionados por
 la expresión

$$\mu = \epsilon / \log_e e$$

La ley de Beer, cuyo cumplimiento en muchos casos ha sido negado,
 establece que la absorción es proporcional a la concentración del soluto,
 en las soluciones (de la ley de Lambert se deduce que la absor-
 ción es proporcional a la longitud l). Puede expresarse así (51):

$$(4) \quad I = I_0 \cdot 10^{-kl}$$

en la que k es una constante del soluto.

Si llamamos K a la relación ϵ/c y reemplazamos ϵ en la (2), ten-
 dremos una expresión que reúne ambas leyes.

$$(5) \quad I = I_0 \cdot 10^{-Kc \cdot l} \quad \text{y} \quad (6) \quad Kc = \log_e I_0 / I$$

En las ecuaciones (5) y (6), K es el "coeficiente de extinción mo-
 lecular", siendo c la concentración en moles por litro. Se le define
 un "coeficiente de extinción específico", k , que es el que correspon-
 de al valor de c en gramos por litro (42), tal que

$$K = k \times \text{peso molecular}$$

En cuanto al valor del segundo miembro de la (6), algunos autores,
 lo llaman "extinción"

$$\log_e I_0/I = \Delta c = E$$

El término "densidad óptica" fue introducido en mediciones de espectroscopios mediante fotómetros, y se lo definió como el logaritmo del cociente de las intensidades del haz fotométrico, antes y después de atravesar la placa fotográfica:

$$(7) \quad \delta = \log_e I_0/I$$

Posteriormente se generalizó el significado de este nombre, aplicándolo al logaritmo de la relación entre intensidad recibida y transmitida por una solución. Concluido este significado, pueden igualarse la (7) y la (6):

$$\Delta c = \log_e I_0/I = \delta$$

Para estas y otras magnitudes existen similares correspondencias, haciendo a veces difícil la comparación entre los resultados obtenidos por los distintos autores. Como hecho concreto, la relación (6) nos permite calcular la concentración de un agente absorbente, una vez determinadas las intensidades emergente e incidente y conociendo el valor del coeficiente k o el coeficiente E que es una constante (en los casos en que se cumple la ley de Beer) para cada sustancia en cada una de las longitudes de onda.

Finalmente, debe tenerse en cuenta que en la mayoría de las técnicas de espectrografía de absorción se trata de determinar el efecto "neto" de la sustancia disuelta, para lo cual se "anula" el efecto del disolvente, es decir se compara la absorción de la solución con la del disolvente, en igualdad de espesores. En este sentido, I_0 es la intensidad transmitida por el disolvente, e I la transmitida por la solución. La relación

$$I/I_0 = T$$

es la "transmisión de la sustancia disuelta".

El espectrógrafo y los dispositivos auxiliares.- El espectrógrafo utilizado es de la marca Zeiss, modelo Q-24, para ultravioleta, es decir con óptica de cuarzo. Aunque la placa registra parte del espectro visible (hasta 5.500 Å), la dispersión es pequeña para zonas del espectro de longitudes de onda superiores a 4.000 Å; entre ésta y 2.300 Å se dispone de buena dispersión (y de suficiente sensibilidad en la película fotográfica) por lo cual se tomaron como límites en la zona de trabajo elegida.

La iluminación se obtiene mediante un chisómetro constituido por electrodos de tungsteno, separados por una distancia, constante durante todas las experiencias, de 2 mm. La energía se obtiene de la red de corriente alternada, tomándose ~ 220 V, tensión que se eleva, mediante un transformador, a ~ 15.000 V. Una capacidad de 5.000 cm., colocada en paralelo con los electrodos, y una inductancia de $10 \cdot 10^{-5}$ Henry, colocada en serie, mejoran la intensidad y estabilidad de la chispa. La capacidad está formada por una batería de botellas de Leyden (fig. 1).

Entre el espectrógrafo y la fuente luminosa se colocaron dos lentes. La primera de ellas, situada a 11,5 cm. (longitud igual a su distancia focal) de la chispa, tenía por efecto el de hacer paralelos los rayos del haz emitido por la chispa. La segunda, ubicada a 37 cm. de la primera y a 14 cm. de la hendidura del espectrógrafo, servía para unir los rayos y dirigirlos hacia aquélla, obteniéndose una iluminación uni-

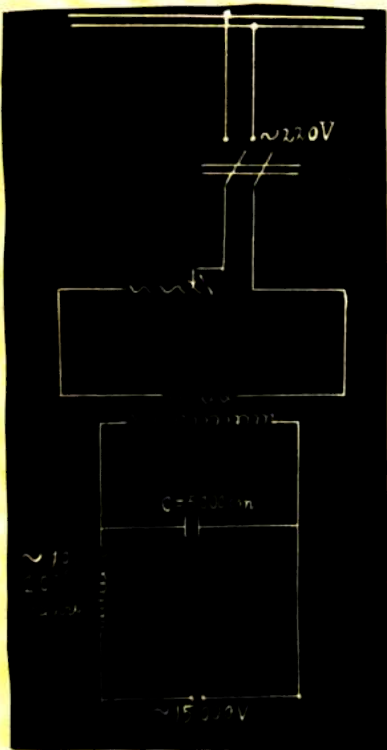


Figura 1

Circuito para la producción de la chispa

forme sobre toda la hendidura. El ancho de la hendidura fué, en casi

todas las experiencias, de 0,005 mm. Entre el prisma y la placa fotográfica se reguló un diafragma interior en forma tal que sólo dejaba pasar 1/15 de la luz que recibía.

Para registrar los espectrogramas se utilizaron películas Ilford process (no pudieron conseguirse placas de vidrio ni tampoco películas panorámicas) Se cortaron las películas para adaptarlas al tamaño del chasis, 6 x 24 cm. Se utilizó el revelador que dió mejores resultados en ensayos, el metol-hidroquinona. La revelación se hizo a 18°, con tiempo de 3 minutos. Para cada película se renovó el baño.

Elección de largos frontales y tiempos de exposición.- Para cada clase de solución se impresionó, antes de realizar la película definitiva, una de ensayo, utilizando soluciones preparadas con escasa cantidad de bilirrubina (pues la cantidad total disponible era exigua), con lo cual no se tenía mucha exactitud en la concentración, pero suficiente para orientar en cuanto a ~~ambos~~ largos frontales y tiempos de exposición.

Para la elección de estos dos factores se tuvo en cuenta, fundamentalmente, obtener espectrogramas en las mejores condiciones posibles para la determinación fotométrica. Esas condiciones no pueden ser uniformes para todo el espectro. Un tiempo y un largo apropiados para una zona de mucha absorción, pueden no serlo para una zona de mucha transmisión. Esto se obviaba en parte tomando para cada solución espectros correspondientes a tiempos y largos distintos, pero las variaciones no podían ser muchas, por dos motivos:

a) No se pudo preparar muchas soluciones, por la poca cantidad de bilirrubina disponible. Tampoco se podían tomar muchos espectros, en distintas condiciones, de una misma solución, pues la experiencia se prolongaba demasiado y la alteración de la solución quitaba validez a las comparaciones.

b) En esta clase de trabajos es fundamental tener iguales condiciones para espectros de absorción y de disolventes; para cada espectro de disolventes absorción debía impresionarse un espectro de disolventes con igual tiempo de exposición y largo frontal.

Los grandes largos frontales tienen la ventaja de producir pocos espectros con emparejamiento similar en toda su extensión. Pero hay varios inconvenientes:

a) El error absoluto en la medición de largo frontal en la cubeta de Ray resulta demasiado grande con respecto al largo utilizado (hasta de un 10% del total para largos del orden de 1 cm.).

b) Los errores en la determinación de $\log. I_0/I$ se multiplican muchas veces al calcular los coeficientes de extinción (que corresponden a largos de 1 cm.).

Grandes largos frontales tienen el inconveniente de que la deflexión de la curva fotométrica del espectro de la solución es muy pequeña, en las zonas de absorción fuerte, y puede confundirse o está a distancia muy pequeña de la que corresponde a la parte transparente ("fondo") de la placa. El inconveniente que con deflexión sea del mismo orden de magnitud que el error del fotómetro.

Por otra parte, tal como recomienda Gibbs (11), la razón entre las intensidades de las dos líneas que se comparan no debe ser mayor que 1 ó 2. Con mayor razón en este trabajo, para que no incidiera demasiado en los resultados los errores debidos a incumplimiento de la ley de reciprocidad (no se aplica en la calibración de los emparejamientos).

Las deflexiones demasiado pequeñas de la curva fotométrica podría evitarse aumentando los tiempos de exposición, pero esto tiene sus límites, porque:

1°: El espectro del disolvente, de mucha mayor transmisión, puede

dar ensanchamientos en la parte de absorción de la curva de calibración.

2°: Los electrodos llegan a puntos insalubres, emitiendo un espectro continuo que se superpone al de líneas, lo cual produce error en el cálculo. Cualquiera fuera la transmisión del disolvente, en nuestra instalación resultaban inconvenientes los tiempos de exposición muy superiores a un minuto.

En resumen el criterio que se adoptó para conseguir espectros en las condiciones fotométricas más favorables, fue el siguiente:

a) Deflexiones, con respecto a la curva del fondo de la placa, no demasiado pequeñas.

b) Extinciones no demasiado pequeñas, con respecto a los coeficientes de extinción.

c) Igualos tiempos para disolvente y muestra.

En consecuencia, se eligieron largas franjas rectas, en general de 4,5 cm., y tiempos de exposición comprendidos entre los que daban absorción en el ensanchamiento del disolvente, y los que resultaban en deflexiones demasiado pequeñas para la curva de la muestra.

Realización de los espectros: La solución o líquidos absortivos se colocaba en una cubeta de Kaly, ubicada entre las dos lentes que describimos y en la misma línea horizontal que ellas. Dada la inestabilidad de las soluciones, se trató de hacer todos los espectros, para cada clase de mezcla, en una sola película, acortándose así el necesario tiempo de operación. Antes de preparar la muestra, se registraban las curvas, los espectros de absorción del disolvente, y un espectro de control (25 segundos, sin cubeta).

Descripción de las películas usadas: Se presentará únicamente las películas utilizadas para calcular los resultados definitivos.

Película 1. Distintos tiempos de exposición, sin cubeta, para

1

15

Felícula N° 1

N°	Pos. t	iluminación
6	1 2	chispero
7	2 3	"
8	3 4	"
3	4 5	lámpara
2	5 '90	escala
9	6 5	chispero
10	7 8	"
11	8 '10	"
4	9 '10	lámpara
2	10 '90	escala
2	11 '20	lámpara
12	12 '15	chispero
13	13 '20	"
14	14 '25	"
15	15 '30	"

Película N° 2
Bilirrubina Hoffmann-Larroche en metanol

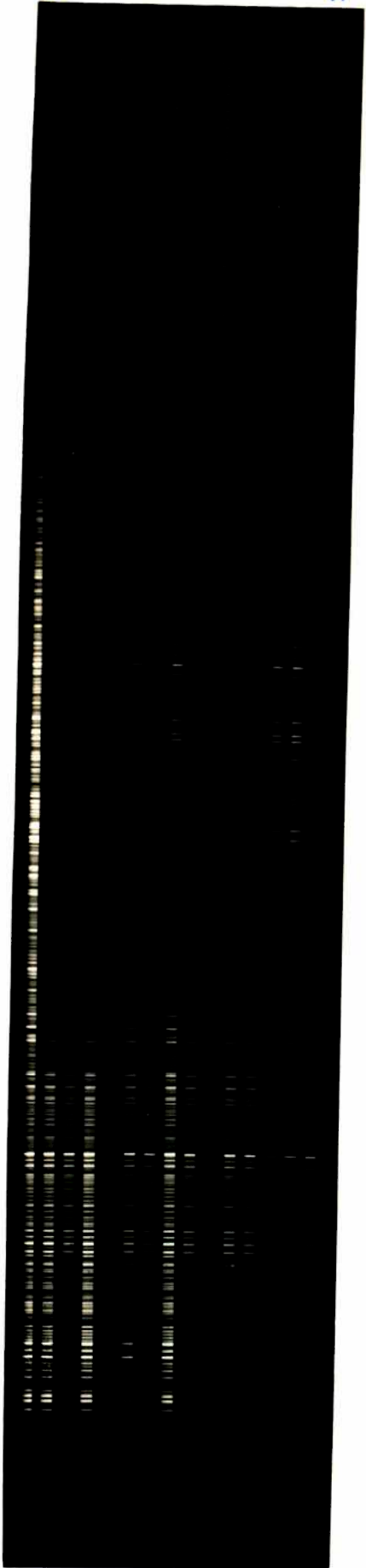
N°	Pos.	t	l	objeto
3	1	25	-2---	sin cubeta
4	2	40	1,0	disolvente
10	3	40	1,0	sol. 20 mg./l.
14	4	40	1,0	sol. 1 mg./l.
1	5	90	-----	escala
8	6	40	0,5	sol. 20 mg./l.
5	7	40	0,5	disolvente
12	8	40	0,5	sol. 10 mg./l.
13	9	40	0,5	sol. 5 mg./l.
2	10	90	-----	escala
9	11	60	0,5	sol. 20 mg./l.
6	12	60	0,5	disolvente
7	13	25	0,1	disolvente
11	14	25	0,1	sol. 20 mg./l.
15	15	40	0,5	sol. 20 mg./l.

Película N° 3

Bilirrubina Schuchard en éter
(10 % de cloroformo)

N°	Pos.	t	l	objeto
3	1	25	---	sin cubeta
4	2	20	0,1	disolvente
10	3	20	0,1	sol. 20 mg./l.
9	4	40	0,5	sol. 20 mg./l.
1	5	90	---	escala
5	6	40	0,5	disolvente
8	7	30	0,5	sol. 20 mg./l.
6	8	30	0,5	disolvente
12	9	30	0,5	sol. 20 mg./l.
2	10	90	---	escala
13	11	30	0,5	sol. 5 mg./l.
11	12	45	1,0	sol. 20 mg./l.
7	13	45	1,0	disolvente
14	14	45	1,0	sol. 1 mg./l.
15	15	30	0,5	sol. 20 mg./l.

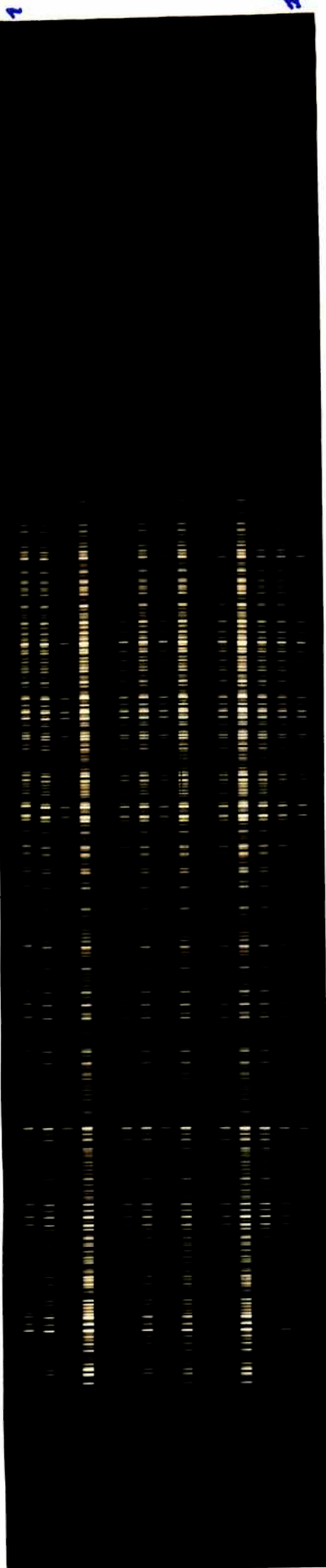
2 15



Película N° 4

Bilirrubina Schuchard en cloroformo

N°	Pos.	t	l	objeto
3	1	25	---	sin cubeta
4	2	50	1.0	disolvente
11	3	50	1.0	sol. 20 mg./l.
14	4	50	1.0	sol. 1 mg./l.
1	5	90	---	escala
5	6	30	0.5	disolvente
8	7	30	0.5	sol. 20 mg./l.
6	8	45	0.5	disolvente
9	9	?	0.5	sol. 20 mg./l.
2	10	90	---	escala
10	11	45	0.5	sol. 20 mg./l.
13	12	30	0.5	sol. 10 mg./l.
7	13	20	0.1	disolvente
12	14	20	0.1	disolvente
15	15	30	0.5	sol. 20 mg./l.



Folículo N° 5

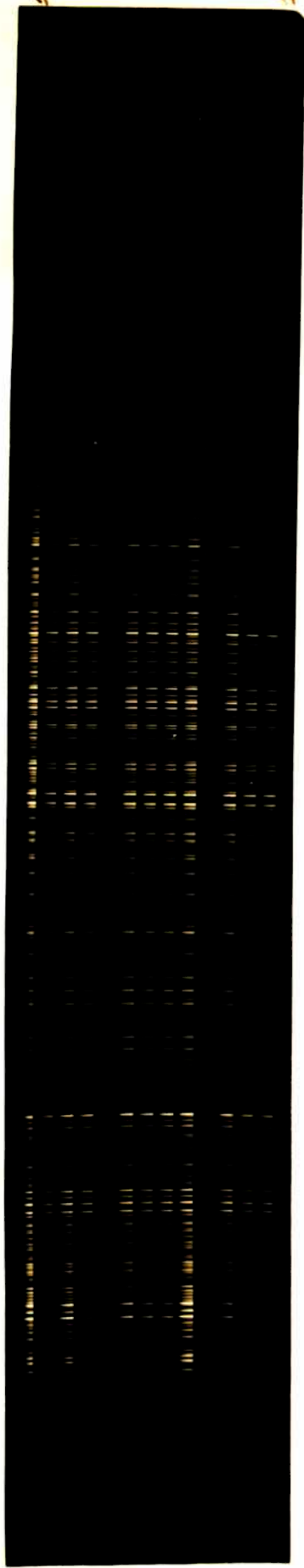
Bilirrubina Schuchard en metanol

N°	Fase	t	λ	objetos
3	1	25	---	sin cubeta
4	2	35	1,0	disolvente
10	3	35	1,0	sol. 20 mg./l.
5	4	50	1,0	disolvente
1	5	90	---	escala
11	6	50	1,0	sol. 20 mg./l.
6	7	30	0,5	disolvente
13	8	30	0,5	sol. 20 mg./l.
7	9	40	0,5	disolvente
2	10	90	---	escala
12	11	40	0,5	sol. 20 mg./l.
8	12	50	0,5	disolvente
14	13	50	0,5	sol. 20 mg./l.
9	14	25	0,1	disolvente
15	15	25	0,1	sol. 20 mg./l.

Película n° 6

Bilirrubina Schuchard en metanol
y en cloroformo

N°	Pos.	t	l	objeto
9	1	25	---	sin cubeta
3	2	40	0.5	metanol
5	3	40	0.5	sol. 50 mg/l (CH ₃ OH)
6	4	40	0.5	sol. 10mg/l (CH ₃ OH)
1	5	90	---	escala
4	6	40	1.0	metanol
7	7	40	1.0	sol. 1 mg/l (CH ₃ OH)
8	8	40	0.5	sol. 20mg/l (CH ₃ OH)
9	9	90	---	escala
10	10	25	0.1	cloroformo
12	11	24	0.1	sol. 20mg/l (CHCl ₃)
11	12	60	1.0	cloroformo
13	13	60	1.0	sol. 1 mg/l (CHCl ₃)



Película N° 7

Bilirrubinas Elmer-Amend y Kodak.
en metanol

N°	Pos.	t	f	Objeto
3	1	25	---	sin cubeta
6	2	40	0,5	sol. E.A. 20 mg./l.
4	3	40	0,5	disolvente
10	4	40	0,5	sol. Kod. 20 mg./l.
1	5	90	---	escala
8	6	40	0,5	sol. E.A. 10 mg./l.
12	7	40	0,5	sol. Kod. 10mg./l.
11	8	50	0,5	sol. Kod. 20 mg./l.
5	9	50	0,5	disolvente
2	10	90	---	escala
7	11	50	0,5	sol. E.A. 20 mg./l.
13	12	40	0,5	sol. Kod. 20 mg./l.
9	13	40	0,5	sol. E.A. 20 mg./l.

Corrección de la escala de longitudes de onda. Se efectúa

ubicando las líneas del espectro de mercurio dentro de la escala del espectrógrafo. Este espectro tiene la ventaja de tener unas pocas líneas en el ultravioleta, fácilmente identificables. Previamente se dibuja la curva de dispersión, que vincula las distancias en mm., en la escala, con las indicaciones de longitud de onda, en Å. Luego se miden las distancias de las líneas del espectro de mercurio a las líneas más próximas de la

escala. Utilizando la curva de dispersión, se calculan las longitudes de onda que indican la escala del espectrógrafo para las líneas de dicho espectro. Finalmente, se comparan las longitudes de onda así determinadas con las que indican las tablas: las de Kayser (22) y las de Brode (22) traen datos con constantes (entre sí) hasta las décimas de Å. La escala del espectrógrafo indica longitudes menores que las tablas, cor-

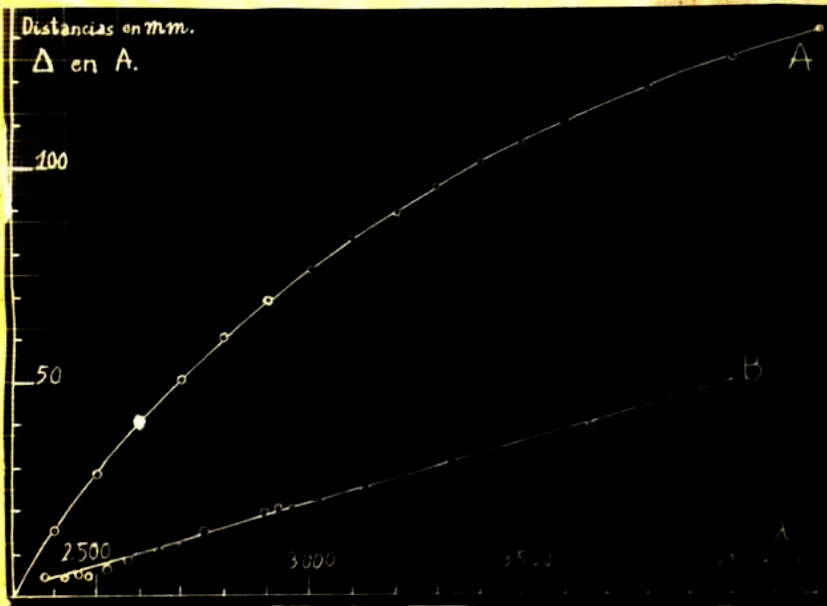


Figura 2

retilizando las diferencias entre 5 Å para la línea de 2.399,40 Å (Kayser), hasta 51 Å para la línea de 4.046,56 Å (Kayser). El error en la determinación de longitud de onda, una vez corregida la escala, es del orden del 1 ó 2 %. En la figura 2 la curva B indica las desviaciones (δ) para cada longitud de onda. La A es la curva de dispersión. Ambas se aplicaron al cálculo de las longitudes de onda de las líneas utilizadas para el fotostreaje.

3. Intensidad.

Principio de la determinación. El objeto del presente trabajo es determinar, como característica de la solución, la absorción relativa de radiación ultravioleta en las diferentes longitudes de onda. El método utilizado es el fotográfico, basado en que a una mayor transmisión de radiación corresponde, en forma generalmente no proporcional, un mayor ennegrecimiento en el espectrograma respectivo. En nuestro caso, el problema general consistía en:

a) Medir los ennegrecimientos, o magnitudes vinculadas a ellos (las deflexiones de un galvanómetro).

b) Hallar las relaciones entre los ennegrecimientos (o deflexiones) y las intensidades transmitidas por las sustancias absorbentes.

c) Establecer la relación I_0/I entre las intensidades transmitidas por el disolvente y la solución, para cada línea del espectro.

Con ese fin se utilizó un fotómetro con célula fotoeléctrica.

El método que se describirá tiene ventajas sobre algunos otros, de uso corriente. Entre ellos, los hay que se fundan en la ley de reciprocidad

$I_0/I = (t/t_0)^n$ (I_0 y t_0 , intensidad y tiempo de exposición del disolvente; I y t , intensidad y tiempo para la solución; n es una constante de la placa, siempre que t y t_0 no sean muy diferentes).

La experiencia ha comprobado que se presentan fuertes desviaciones entre los valores reales de las intensidades y los que resultan de aplicar la ley (errores hasta de un 25 % según Orignari, op. cit., tomo II, pág. 5). Otros métodos se fundan en la comparación de espectros de disolvente con espesor constante, con espectros de solución en distintos espesores; en la utilización de un sector giratorio para disminuir la iluminación del disolvente, etc. En todos ellos, el cálculo se hace en base de igualdad de ennegrecimiento (para densidades diferentes en la

tomos de espectros) y los errores por incumplimiento de la ley de reciprocidad, efecto de intermitencia, etc., pueden ser grandes, si las diferencias entre las condiciones de ambos espectros son extremas. Los errores son mayores si la apreciación de la igualdad de ensangrecimiento se hace visualmente, y se acrecienta si ambos ensangrecimientos son muy débiles o próximos a la saturación: en el primer caso, por que ambas intensidades son pequeñas, y una variación en una de ellas modifica considerablemente el valor de la relación I_1/I_2 ; en el otro caso porque al llegar a ensangrecimientos próximos al máximo característico de la placa, grandes variaciones de intensidad sólo producen variaciones relativamente pequeñas del ensangrecimiento. Las ventajas del método que en seguida se describirá residen en la medición independiente de ambas intensidades y en la utilización de una célula fotoeléctrica para medir los ensangrecimientos.

Aparato.— Se utilizó un microelectroscopio fotoeléctrico autogregio tractor de Leica. El principio de funcionamiento es el siguiente: un haz luminoso, de intensidad constante, atraviesa el espectro y llega a una célula fotoeléctrica (de Ruster y Geitel) en la que se crea una corriente de intensidad variable, según las variaciones en la intensidad del haz luminoso, más o menos disminuida por el ensangrecimiento de la placa. Esa corriente pasa por una resistencia constante, entre cuyos extremos existe una diferencia de potencial de 320 V, suministrada por la red de corriente alterna y modificada por un circuito especial de transformador y válvula de neón que asegura la constancia de la tensión mientras no llegue corriente de la célula. Cualquier corriente que llegue hace variar la tensión existente entre los extremos de la resistencia, a los cuales están conectadas las puntillas de un electrómetro unifilar de sulf., y esas variaciones provocan deflexiones en el hilo del electrómetro. El hilo está iluminado de manera que da

imagen simultánea proyecta sobre una placa fotográfica. La placa espectrográfica y la registradora se desplazan simultáneamente, mediante un mecanismo solidario accionado por un motor a corriente continua, con velocidad aproximadamente constante, excepto a su volante. Puede hacerse que la placa registradora se desplace más rápidamente que las espectras: de esta manera pueden observarse detalles más finos en las curvas de compensamiento.

Para la exactitud de las determinaciones es esencial que sea constante la intensidad del haz, antes de atravesar el espectro. Esto se consigue satisfactoriamente derivando, para alimentar a la lámpara, una tensión de 6 V, del mismo circuito a válvula de modo conectado al electroimán. Las dispositivos auxiliares más importantes son:

a) tornillos que permiten regular las dimensiones de la hendidura por la cual el haz llega a la placa espectrográfica.

b) tornillos para regular las dimensiones del diafragma por el cual el haz, una vez atravesado el espectro, llega a la célula.

c) tornillos para regulación del enfoque del haz luminoso, que atraviesa dos objetivos microscópicos: uno entre lámpara y placa espectrográfica y el otro entre la placa y la célula.

d) tornillos que permiten centrar el haz que llega a la célula, dentro del haz mayor que atraviesa a la placa.

e) Ventana iluminada que permite observar, ampliada, la parte del espectrograma atravesada por el haz. De esta manera se descubren manchas o defectos de la placa.

f) tornillos que regulan, en el electroimán, la distancia entre ocellas, la separación lateral y la tensión del hilo.

g) tornillo que permite ubicar las curvas en lugar conveniente de la placa registradora.

h) espejo con escala para observación del movimiento del hilo, por

mitiendo seguir el curso de formación de la curva fotométrica.

1) manivela para el desplazamiento rápido de ambas placas: tornillos para desplazamientos de la platina en que está unida la placa espectrográfica, a objeto de fotometrar distintos espectros o distintas zonas de un mismo espectro.

Realización del fotómetro: La determinación fotométrica requiere conocer:

a) deflexión del fondo de la placa con respecto a una placa "transparente".

b) deflexión de cada uno de los espectros, el de admisión y el de dispersión, con respecto a la curva correspondiente al fondo de la placa.

c) las longitudes de onda.

En virtud de utilizarse para todas las películas una sola calibración (relación deflexión-intensidad) durante todo el trabajo, fue necesario mantener constante las condiciones del fotómetro, lo cual se realizaba y controlaba mediante los dispositivos a, b y f. Con el dispositivo g se ubicaba la curva correspondiente al fondo de los espectros (parte no impresa de la placa); esa línea no se debía cambiar durante la realización de un papel fotométrico, pues en ella se tomaban los puntos u en la medición de las deflexiones.

Colocada la placa espectrográfica en la platina, se utilizaban los tornillos e y d para conseguir máxima nitidez del haz de la lámpara y correcto contraje del que llegaba a la célula.

Para la obtención de la curva (aproximadamente una recta) del fondo, se tomaba un zona no impresa de la placa, contigua a los espectros a fotometrar. El fotometraje del fondo se realizó a todo lo largo de la zona, e en tres lugares distintos de la misma. Terminado el fotometraje de los espectros, se impresionaba momentáneamente parte de la curva del fondo

si al principio se habían tomado tres sectores, se repetía en uno de los sectores y se impresionaba en otros dos nuevos.

Entre los dos fotometratos del fondo, se hacía pasar el haz luminoso por cada uno de los dos espectros, en iguales zonas.

Finalmente, se registraba la escala, para lo cual, cerrada la entrada de luz a la placa registradora, se desplazaba la platina hasta que el haz luminoso atravesara la escala más próxima (o intermedia) a ambas

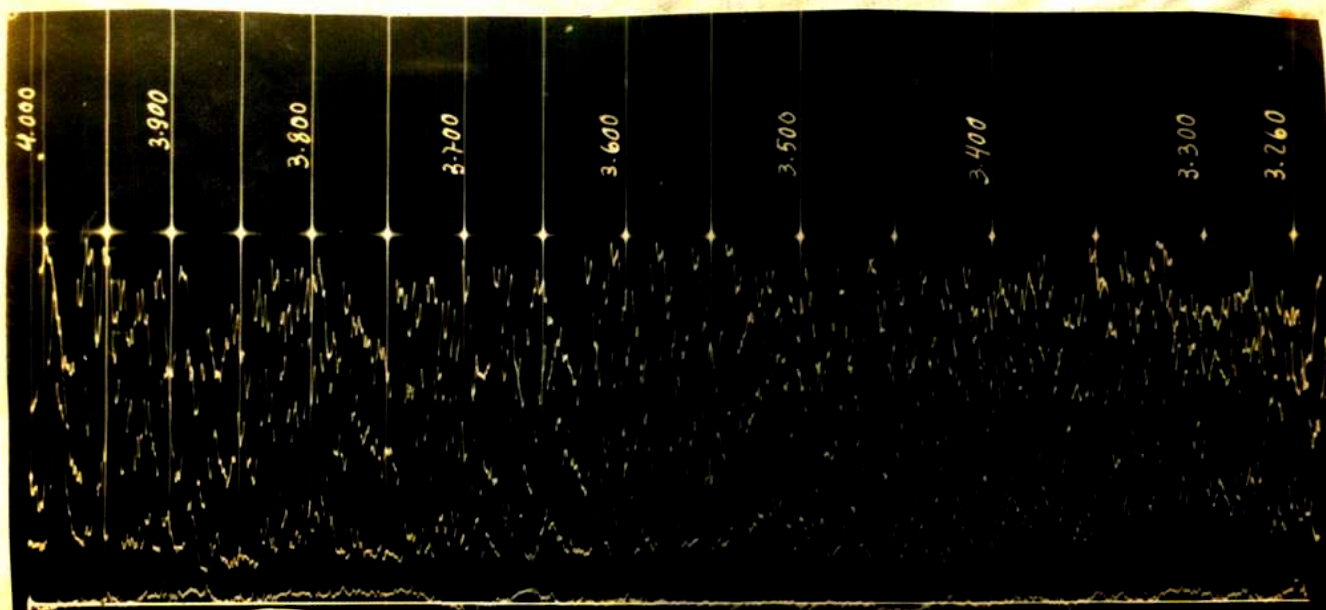


Figura 3. Copia fotográfica (positivo) de un papel fotométrico, en tamaño natural. Corresponde a los espectros de posiciones N^o 7, 12 y 14 en la película L, de calibración. Estos espectros fueron tomados sin cubeta, con tiempos de exposición de 8, 15 y 25 segundos (curva superior), respectivamente. Los números corresponden a la escala del espectrógrafo, sin corregir. Pequeñas flechas y líneas horizontales indican máximos de las curvas correspondientes a líneas espectrográficas utilizadas en los cálculos de absorción.

espectros. Mediante la manivela 1 se movían ambas placas hasta llegar a una de las líneas de la escala. Entonces se hacía llegar luz a la placa registradora / placa, obteniéndose un punto, imagen del hilo, inmóvil, del electrómetro. Se volvía a cerrar la admisión de luz a la placa registradora, desplazando luego ambas placas hasta llegar a la siguiente línea de la escala. Se impresionaban puntos cada 50 ó 25 Å, según la menor o mayor dispersión de la

sona. La impresión de cada punto se realizaba sin liberar las a la célula, de manera que la línea determinada por ellas correspondía a la máxima opacidad o ennegrecimiento.

Durante los fotometrados, la velocidad del motor estaba ajustada al tiempo que el hilo del electrometro tarda en adquirir su posición de reposo. La velocidad del papel registrador era 5 veces mayor que la de la película espectrográfica, obteniéndose así una ampliación suficiente para poder distinguir con claridad los detalles de las curvas. Las deflexiones se midieron, con precisión de 0,1 mm., mediante un microscopio comparador de Zeiss.

Cálculo del resultado: Sin aplicar hipótesis sobre la relación existente entre deflexión y ennegrecimiento, o entre deflexión y absorción relativa de la luz del fotómetro, se utilizó directamente la relación existente entre la intensidad de la radiación llegada a la placa en el espectrógrafo y la deflexión del registro fotométrico (que tiene una amplitud aproximadamente igual al doble de la deflexión del hilo del fotómetro). En lo que sigue, se entenderá por "intensidad" la recibida por la placa en el espectrógrafo, y no la del haz que llega a la célula fotométrica.

Para cada longitud de onda se realizó un calibrado, consistente en establecer una curva que relaciona cada deflexión con la respectiva intensidad. Como operación inicial, se impresionó y fotométró ^{poli-} una película de calibración que debía servir para todo el trabajo, pues las películas utilizadas, siempre de la misma marca y clase, respondían a las mismas características. En cada película se tomó un espectro de 25 segundos sin cubeta, para control de reproducibilidad del calibrado.

En cada la película de calibración (N° 1) se tomaron espectros sin cubeta, en las mismas condiciones que habrían de utilizarse para los espectros de absorción, con tiempos de exposición de 2, 3, 4, 5, 6,

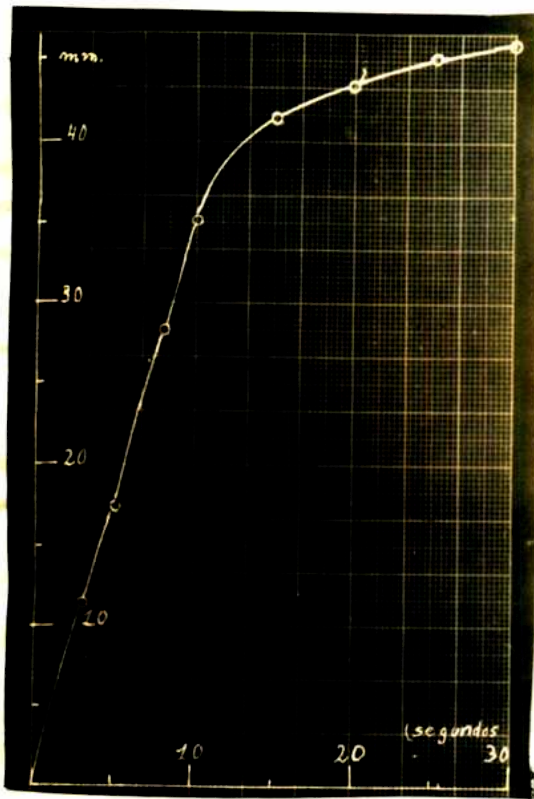


Figura 4

10, 15, 20, 25 y 30 segundos. Luego se fotometrará haciéndose recorrer el haz a lo largo de los distintos espectros. Conociendo las alturas de las curvas con respecto a la del fondo y los tiempos respectivas, se puede dibujar la curva de calibración. Como ejemplo, se reproduce la correspondiente a la línea de longitud de onda 3.361 Å (fig. 4).

Para mayor claridad, prescindiremos por un momento de la corrección por ennegrecimiento del fondo, para exponer el método de cálculo, refiriéndonos a la figura 5, en que se esquematiza un sector de una papel fotométrico. Por ahora considerare-

mos ennegrecimiento 0 al del fondo de la película espectrográfica, cuyo registro fotométrico es la curva A que, como se ve, coincide aproximadamente con una recta. Las ondulaciones corresponden a pequeñas variaciones de ennegrecimiento, por los granes de emulsión o manchas ocasionales.

En la medición, reemplazamos esta curva

por una recta, trazada por los puntos medios de las ondulaciones. No conviene medir las distancias a esa recta, y no a la ondulación, pues lo que deseamos es medir las deflexiones con respecto al promedio general del fondo, y no con respecto a variaciones accidentales del mismo. Las curvas C y D

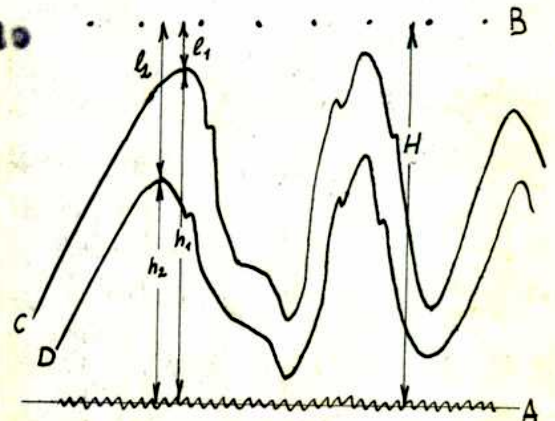


Figura 5

son del mismo. Las curvas C y D

corresponden, respectivamente, a los emparejamientos de las curvas de el solvente y de solución; la primera está más alejada del fondo, por corresponder a un espectro más negro. Las deflexiones son las medidas de las distancias de las curvas C y D a la línea del fondo; se indican con h_1 y h_2 . Siempre las distancias se miden desde un punto máximo de la curva (que corresponde a una línea del espectro).

Hacemos notar que las distancias no se miden siempre sobre una misma vertical, pero en todo caso en dos puntos correspondientes a igual línea del espectro. A veces ocurre que líneas iguales de dos espectros no están sobre una misma recta, pues pueden presentarse pequeñas curvaturas (especialmente en películas, que nos vimos obligados a utilizar). Es necesario reconocer para, de acuerdo a la configuración de las curvas y teniendo en cuenta la ubicación de las líneas en ambos espectros, los máximos correspondientes a una misma línea. Este reconocimiento también debe realizarse comparando con la película de calibración, a fin de que la medición de las deflexiones se realice sobre la misma línea que sirvió para efectuar la calibración.

Dadas las deflexiones h_1 y h_2 , se basan en la curva correspondiente a esa línea espectrográfica las respectivas intensidades relativas (t_1, t_2) cuyo cociente es la relación buscada, I_2/I_1 .

Observaciones. En muchos trabajos las determinaciones se hacen considerando como punto 0 el de máxima opacidad (en nuestro esquema, los puntos C). Es decir que se miden las distancias h_1 y h_2 . Se miden trayectorias, con respecto a opacidad mínima, y no opacidad máxima (emparejamiento). Al comparar las curvas características H y D (log. intensidad en abscisas, deflexión en ordenadas) obtenidas en ambos métodos, la parte que coincide es algo más corta con el tipo de calibración usado en este trabajo (ver en Sawyer, 53).

Con el otro método fotométrico se presentan inconvenientes, pues

en general debe trabajarse en la zona cercana a saturación (parte superior de la curva en fig. 4), en que los errores son mayores, porque pequeñas diferencias de deflexión corresponden a grandes diferencias de intensidad. Si se quisiera llegar a la zona rectilínea de la curva, debería aumentarse la sensibilidad (mayores desplazamientos del hilo del electrómetro), con el inconveniente de que los puntos correspondientes a líneas débiles saldrían fuera de la placa fotométrica. Además, en esta clase de determinaciones, no se toman en cuenta las variaciones del fondo. Si bien se dijo que en este trabajo no se consideran las pequeñas variaciones del fondo, debidas a irregularidades ocasionales, es necesario considerar que de una zona a otra del espectro puede haber variación continua del ennegrecimiento del fondo: la distancia H (fig. 5) puede no ser constante, y en este caso es distinta la corrección por fondo continuo para las distintas zonas.

2) Algunos autores, por ejemplo Cornet y Henry-Cornet (17, 18) realizan el fotometraje haciendo que el desplazamiento de la placa se realice en dirección perpendicular a los espectros, de manera que el haz no corre a lo largo de cada espectro, sino que pasa por zonas de longitudes de onda aproximadamente iguales de los distintos espectros. Para la placa de calibración se tendría una curva del tipo indicado en la fig. 6 A, correspondiendo cada máximo a un espectro de distinta intensidad. La figura 6 B indica un ejemplo de curva que se obtendría al pasar el haz por los espectros de absorción de solución y disolvente.



Figura 6

Este método es de más rápida realización, pero sus resultados son menos exactos. El haz fotométrico, aun limitado lo más posible su

muchos, toma una zona relativamente extensa de cada espectro, y la curva fotométrica no es ya una representación continua de los distintos grados de ensombrecimiento, punto por punto, sino que sus máximos representan el máximo de ensombrecimiento de la zona espectral atendida. El inconveniente es mayor para espectros de líneas, pues el haz puede atravesar varias líneas a la vez (si fuera demasiado angosta, podría no pasar por la parte má. intensa de cada línea) o aun tomar líneas distintas en los espectros a comparar. Esta forma de fotometraje presenta fallas similares a las de los fotómetros tipo Fairrich, en que se utilizan filtros circulares que dejan pasar una estrecha banda de longitudes de onda, pero no son exactamente monocromáticas.

3) Para el calibrado se utilizan espectros de distintos tiempos de exposición. En cambio, en las observaciones, deben medirse intensidades y no tiempos. El método ha sido criticado desde hace tiempo, pues la curva tiempos-deflexión no coincide exactamente con la curva intensidad-deflexión (véase la ley de reciprocidad). Aunque el coeficiente n de la ley de reciprocidad (pág. 40) es aproximadamente igual a la unidad, cuando t y t_0 no son muy distintas, existe el factor de incumplimiento de la ley, comprobado en diversas oportunidades. También afecta a este método de calibración el llamado "efecto de intermitencia", en virtud del cual una iluminación de 5 segundos puede no equivaler a 5 iluminaciones de 1 segundo.

En conclusión, resulta más exacta la calibración obtenida por variación de intensidades, con iguales tiempos. Para ello puede irse modificando la distancia de la fuente luminosa al espectrógrafo, usar distintos anchos en la pantalla o utilizar cellos de absorción.

No pudiendo realizar en condiciones satisfactorias ninguna de las

de a primeros métodos, y no contentado con este instrumental, se prefirió emplear el método descrito, con el cual se obtienen resultados satisfactorios si se cuida de comparar espectros de solución y disolvente con iguales tiempos de exposición y eligiendo las otras condiciones (largos focos, etc) de manera que no resulte muy grande la diferencia entre ambas intensidades. De esta manera, en el caso de protuberancias desviadas de la ley de reciprocidad, puede admitirse que serán de igual sentido y magnitudes aproximadamente iguales para las dos intensidades; en consecuencia, podría haber error en el valor absoluto de las intensidades, pero el error en la relación I_0/I (que es lo que verdaderamente interesa medir) sería pequeño. Comot y Henry Carnot (11, 12) utilizan este mismo método de calibración, con resultados satisfactorios en cuanto a reproducibilidad y exactitud.

En cambio, cuando errores resultan grandes al los tiempos de exposición son distintos para disolvente y solución (lo cual puede hacerse en vista a obtener emparejamiento similar para disolvente y solución). Si esos tiempos fueran t_0 y t_1 (t_0 , t_1), la relación de intensidades I_0 disolvente/ I_1 solución deberá multiplicarse por t_1/t_0 para obtener la relación I_0/I_1 (de acuerdo al método de V. Henry), pero en el valor obtenido aparece como factor el error de la ley de reciprocidad. Es por ello que, al principio del trabajo, operando con tiempos distintos para ambas espectros, se obtuvieron resultados irregulares, no reproducibles.

Corrección por emparejamiento del fondo. A pour de todas las precauciones, siempre el fondo de la placa presenta un cierto emparejamiento, por lo general de distinto valor en cada película. El método de calibración recíproca puede aplicarse a un fondo de emparejamiento 0, si se miden las deflexiones con respecto a un fondo algo opaco, se obtendrá en la curva de calibración una intensidad distinta que la que daría la misma película tomada con origen 0. Esto se debe a que no existe entre

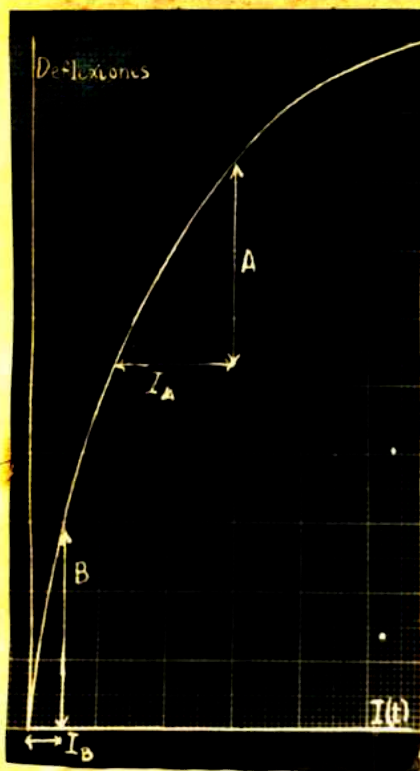


Figura 7

$$A = B \quad I_A \neq I_B$$

-51-

deflexiones e intensidades una relación de proporcionalidad (ver fig. 7). Por otra parte, el ennegrecimiento del fondo, que es aproximadamente el mismo para toda la película, representa un intensidad diferente para cada línea. Para obtener valores correctos, es necesario calcular la intensidad de la línea para una deflexión medida a partir de un fondo de ennegrecimiento 0, y luego restar de esa intensidad la inicial, correspondiente al fondo de la película. Este método coincide con el recomendado por Sawyer (op.cit.,

pág. 272) y con lo que este autor plantea como hipótesis más racional: el fondo de las líneas espectrales es de igual ennegrecimiento que las zonas circundantes no impresas. Concretamente, la corrección se realizó en este trabajo, de la siguiente manera:

a) se consideró como fondo de ennegrecimiento 0 el de una película, de la misma clase que las utilizadas en la espectrografía, y a la cual únicamente se le había dado un baño en fijador.

b) se midió la deflexión del fondo ennegrecido, para cada una de las películas utilizadas en la espectrografía, con respecto al fondo de ennegrecimiento 0.

c) se midió la deflexión de la línea con respecto al fondo adyacente.

d) se sumaron ambas deflexiones y se halló en la curva respectiva la intensidad correspondiente a la deflexión total.

e) A esa intensidad se restó la correspondiente al fondo de la película.

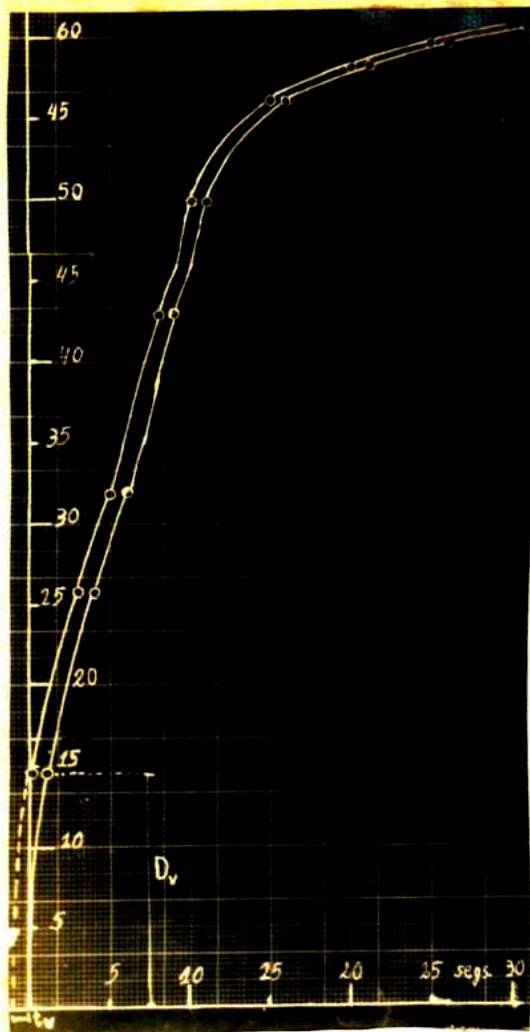


Figura 8

Corrección por ennegrecimiento del fondo en la película de calibración.- Si se den las deflexiones correspondientes a los distintos tiempos y se les suma la deflexión (D_v) del fondo de la película de calibración (con respecto al fondo de ennegrecimiento 0), se obtiene una curva como la A (en su parte llena) de la fig. 8. Para tener una curva completa, con origen en el origen de las ordenadas, habrá que determinar la intensidad (t_v) correspondiente al ennegrecimiento del fondo; en el presente trabajo se ha determinado esa intensidad extrapolando la curva hasta coincidir con el eje de las abscisas (deflexión 0). Esa extrapolación da resultados aproximadamente exactos si t_v no es demasiado grande.

Finalmente, se obtendrá la curva definitiva (curva B, fig. 8) representando en ordenadas las deflexiones totales y en abscisas los tiempos de exposición, aumentados en t_v .

Control de las determinaciones fotométricas.- El fotómetro cuenta con un disco de vidrio gris que se puede interponer entre el haz luminoso y la célula. Obtenido un enfoque nítido del haz y puesto el fotómetro en condiciones de funcionamiento, se hacía pasar el haz por dicho vidrio, observándose en el espejo la deflexión del hilo. La constancia en su altura indicaba que no habían variado las condiciones del fotómetro. La operación se repitió cada vez que hubo que usar el fotómetro.

Otro control se efectuaba en las mediciones de los papeles fotométricos. La deflexión total entre "fondo transparente" y opacidad máxima (célula sin luz) debe ser siempre la misma. Para todos los papeles

fotométricas, la suma de la distancia entre deflexión del fondo de la película y opacidad máxima (altura H en la figura 5), más la deflexión entre fondo transparente y fondo de la película, debe ser una constante. Diferencias pequeñas en el total son tolerables, porque ello determina variaciones aproximadamente proporcionales de las intensidades de ambos espectros, sin afectar significativamente al valor de la relación I_0/I .

Se dijo que al terminar la impresión de un papel se repetía, por lo menos en una zona, la curva del fondo de la película, observándose después si coincidía con la línea impresa al principio, es decir que reproducía la indicación del fotómetro para el mismo emparejamiento.

En cada película se registraba un espectro de 25 segundos, sin cubeta (v. "espectografía"). En él se efectuaba después una determinación fotométrica de algunas líneas, comparando las intensidades resultantes con las de iguales líneas de la película de calibración. Las diferencias, en general, no llegaban al 2%, sirviendo esta prueba como forma práctica de determinar la constancia en la intensidad de la fuente luminosa del espectrógrafo y como prueba de la aplicabilidad de la calibración efectuada en una película, al cálculo de intensidades en las otras películas.

Finalmente, coincidiendo con el criterio empírico de Bosch y Coleman (54), se observaron desviaciones entre pares de determinaciones distintas de relación I_0/I , para igual par de líneas. Estas observaciones se realizaron en número considerable pues, requiriéndose para el fotometraje de un par de espectros la impresión de 5 ó 6 papeles, se comenzaba un papel en la línea en que terminaba el otro, calculándose I_0/I para la misma línea en ambos papeles. Las diferencias en el valor I_0/I por lo general no llegaban al 2%.

III. RESULTADOS Y CONCLUSIONES.

1. GRÁFICAS.

Determinación de las longitudes de onda. En cada caso se indicó la solución sobre la que se hizo la determinación, con indicación de los ejes de los correspondientes y tiempo de preparación. En los ejes de valores se anotaría los de λ/λ_0 y $\log \lambda/\lambda_0$ para las longitudes de onda consideradas. Para las curvas se transformarían todos los valores en los que corresponden a saliencias de 20 mg./l. y a 1 cm. de largo frontal (es decir el "coeficiente de extinción" de Hansen y Roscoe para saliencias de una concentración), para lo cual se dividirían los valores de \log por el largo frontal usado, y se multiplicaría por la relación entre la concentración usada y la de 20 mg./l. Ej.: los valores de los \log para una saliencia de 50 mg./l. y a 0,5 cm. se multiplicaría por $20/50 = 0,4$ y se dividiría por 0,5. De esta forma, resulta más fácil la comparación entre las distintas curvas; esta forma de expresión, con los mismos valores de λ y \log , es la usada en la mayoría de los trabajos espectrográficos sobre saliencias de diluciones.

Determinación de las longitudes de onda. Se realizó en base al promedio de mediciones en tres espectros de la persona L. Se tomaron distancias de las líneas espectrográficas sobre las cuales se calculó la geometría, a las líneas más próximas de la escala y se calcularon, mediante la curva de dispersión (Fig. 2), las longitudes de onda de cada línea con respecto a la escala del espectrógrafo. A esos valores se adicionaron las desviaciones correspondientes a las respectivas longitudes de onda, en relación a los datos de las tablas, de acuerdo con la curva de desviaciones (Fig. 2).

2. Bilirrubina Schuchard en cloroformo

Curva de absorción. Para el espectro se eligió el par de espectros de posiciones 6 y 11 (l = 0,5 cm.; t = 22 45 segundos) de la película 4. Tanto el par 6-7 (l = 0,5 cm.; t = 30 segundos), como el 2-5 (l = 1 cm.; t = 50 segundos) presentan intensidades bastante débiles en la zona 2.600-2900 Å, en el primer caso por insuficiente tiempo de exposición, en el segundo porque la absorción es grande en estos espectros.

TABLA I

Solución de bilirrubina Schuchard en cloroformo. Tiempo de preparación, 22 minutos. l = 0,5 cm., t = 45 segundos. Pel. N° 4, pos. 6 y 11.

λ en Å	I_0/I	100%	λ en Å	I_0/I	100%	λ en Å	I_0/I	100%
2.455	1,92	0,283	2.971	1,37	0,137	3.576	1,21	0,083
2.464	1,38	0,140	3.020	1,35	0,130	3.634	1,26	0,100
2.506	1,50	0,176	3.076	1,27	0,104	3.691	1,27	0,104
2.530	2,12	0,326	3.124	1,21	0,083	3.741	1,24	0,127
2.565	1,33	0,124	3.166	1,19	0,076	3.785	1,38	0,140
2.608	1,36	0,134	3.225	1,18	0,072	3.836	1,66	0,164
2.642	1,40	0,144	3.277	1,16	0,064	3.875	1,62	0,162
2.709	1,36	0,297	3.328	1,15	0,061	3.938	1,53	0,166
2.768	1,78	0,250	3.381	1,14	0,057	4.011	1,66	0,217
2.817	1,54	0,188	3.429	1,11	0,045	4.082	3,44	0,837
2.877	1,52	0,182	3.482	1,09	0,037			
2.920	1,48	0,170	3.533	1,21	0,083			

La curva se caracteriza por la fuerte absorción en la zona límite con el visible (3.900-4.000 Å), débil absorción en la zona roja (hasta 3.000 Å) y nueva elevación hacia las bajas longitudes de onda (ver fig. 9). En estas características generales se asemeja a las obtenidas por otros autores (13, 34) en cloroformo, pero no concuerda

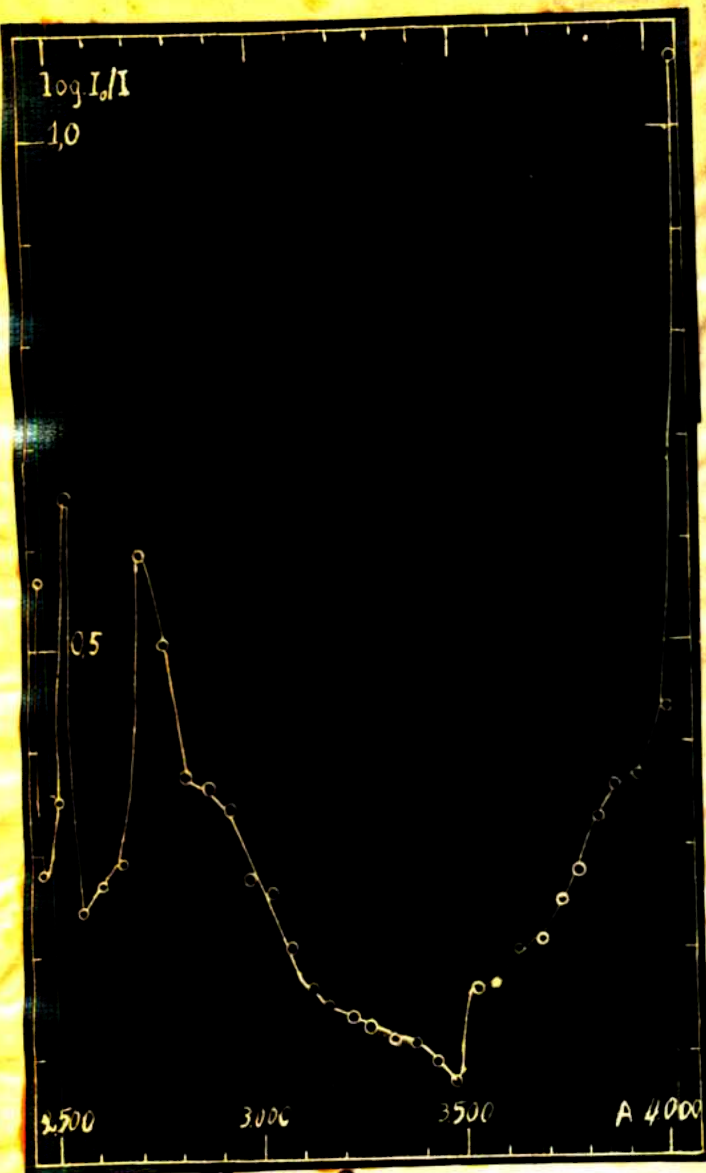


Figura 9

De acuerdo a estos datos, se concluye que la solución en el reformo es inestable, con pérdidas

moderadas de absorción en tiempo relativamente corto. En 3.700-3.800 las pérdidas son relativamente menores, pero no se puede afirmar concluyentemente que ya exista un desplazamiento de la banda de absorción, pues las diferencias entre las pérdidas de absorción para las distintas longitudes de onda son del orden de magnitud del error experimental.

Solución de 10 mg./l. Corresponde al espectro de posición 15 de la película 4, con tiempo de preparación de 53 minutos (diferencia con el anterior, 31 minutos). Para el fotometraje se le comparó con el espectro de disolvente de posición 6, tomado en iguales condiciones (l, 0,5 cm.:

en las dos bandas de absorción encontradas en este trabajo, con mínimos en 2.464 y 2.555 A. La diferencia se discutirá más adelante.

Estabilidad de la solución. Se determinaron valores de extinción para varias líneas del último espectro, posición 15 en la película 4, correspondientes a una solución con tiempo de preparación de 87 minutos (diferencia con el anterior: 65 minutos). Los valores obtenidos se comparan con los del primer espectro.

TABLA II

λ en A	I_0/I	log _e	δ Var.
4.052	3,14	0,497	- 7,26
3.939	1,48	0,170	- 7,57
3.836	1,43	0,155	- 5,46
3.785	1,35	0,130	- 6,47

TABLA III

λ en A	I./I	log.	VAR. %
4.052	1,70	0,230	- 14,3
3.938	1,18	0,072	- 12,2
3.836	1,19	0,075	- 19,8

t. 30 segundos). Se compara con el primer espectro.

Las diferencias con éste son mayores que para el último espectro, a pesar de que la alteración en la solución de 10

mg./l. debe presumirse como menor. El hecho podría atribuirse a un no cumplimiento de la ley de Beer, pero un solo espectro y una sola variación de concentración dan poca base para esta afirmación.

2. Soluciones en éter.

Curva de absorción.- Para el fotometraje se eligió el par de espectros con posiciones 7 y 8 (t. 30 seg.; l. 0,5 cm.), correspondientes a la primera solución, con tiempo de preparación de 19 minutos; e 20 mg/l.

TABLA IV
BILIRRUBINA SCHUCHARD EN ÉTER (CON 10 % DE CLOROFORMO)

λ en A	I./I	log.	λ en A	I./I	log.	λ en A	I./I	log.
2.404	2,32	0,365	2.902	2,08	0,318	3.533	1,90	0,279
2.455	1,55	0,190	2.962	2,36	0,375	3.576	1,58	0,199
2.464	1,79	0,253	2.971	2,23	0,348	3.655	1,74	0,241
2.506	1,35	0,130	3.020	1,72	0,236	3.691	2,16	0,334
2.530	1,26	0,100	3.076	1,70	0,230	3.741	2,21	0,344
2.560	1,36	0,134	3.124	1,66	0,220	3.785	2,52	0,401
2.565	1,61	0,207	3.168	1,68	0,225	3.836	2,15	0,332
2.608	1,60	0,204	3.225	1,52	0,182	3.904	2,71	0,434
2.662	1,58	0,199	3.277	1,78	0,250	3.938	2,80	0,447
2.713	1,53	0,185	3.328	1,86	0,271	3.999	4,67	0,608
2.768	1,27	0,104	3.381	1,91	0,281	4.011	3,79	0,579
2.817	1,56	0,193	3.429	2,03	0,307	4.052	3,24	0,511
2.877	1,83	0,262	3.482	2,07	0,316			

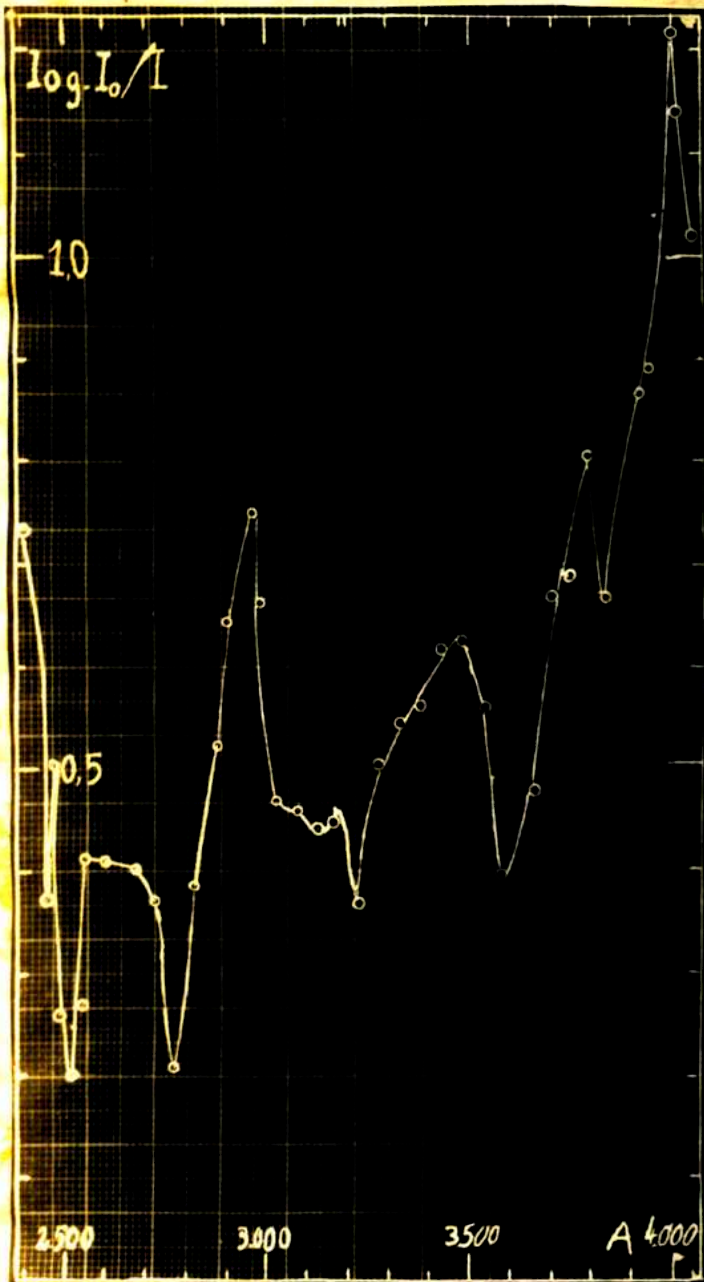


figura 10

con los del primer espectro.

Las pérdidas son menores en la región de 3.900 Å, lo que indica que la banda de absorción, con máximo al principio en 3.999 Å, se ha desplazado hacia esa zona.

Como se ve, la absorción en éter es, en general, considerablemente mayor que la solución clorofórmica, y la curva (O) mucho menos regular. Las diferencias de esta curva con la anterior podrían deberse a una rápida y profunda alteración de la solución, o también a que la dispersión no es del mismo tipo; en mezclas similares de soluciones clorofórmicas con otros disolventes—Mullet y Engels su- haber obtenido soluciones coloidales. Estabilidad de la solución.— La última solución, con tiempo de preparación de minutos, fué espectrografiada en la posición 5; en el fotometraje se la comparó con el espectro de disolvente de posición igual en características (1.0, 5 cm.; 10 segundos). Se determinaron algunos valores de extinción (Tabla V) y se los comparó

TABLA V

λ en Å	I₀/I	log.	% var.
3.691	1.91	0.281	- 15.8
3.741	2.01	0.303	- 13.1
3.785	1.98	0.297	- 25.0
3.904	2.54	0.405	- 6.8
3.938	2.60	0.415	- 7.0
3.999	3.55	0.550	- 9.6
4.052	2.60	0.414	- 19.0

máximo al principio en 3.999 Å, se ha desplazado hacia una zona.

Solución 10 mg/l.- El fotog

TABLA VI

metraje se realizó sobre los espec-
tros 8 y 10: tiempo de preparación,
45 minutos. Tampoco en este caso
puede afirmarse que el coeficiente
de extinción sea independiente de
la concentración.

λ en Å	I_0/I	A_{500}	A_{500}
3.936	1,65	0,161	- 3,0
3.938	1,61	0,179	-19,5
4.052	1,62	0,210	-19,1

4. Bilirrubina Schuchard en alcohol metílico.

Curva de absorción: La fotometría se realizó sobre el par de po-
siciones 2-3, película 5 (1, 1,0 cm; 2, 35 seg.), correspondiente a la
primera solución, con tiempo de preparación de 20 minutos.

TABLA VII

Bilirrubina Schuchard en alcohol metílico

λ en Å	I_0/I	A_{500}	λ en Å	I_0/I	A_{500}	λ en Å	I_0/I	A_{500}
2.302	3,40	0,532	2.768	1,36	0,134	3.381	1,40	0,146
2.355	2,74	0,438	2.817	1,23	0,096	3.429	1,37	0,137
2.404	1,59	0,201	2.872	1,41	0,149	3.482	1,33	0,134
2.455	1,51	0,179	2.877	1,54	0,158	3.533	1,40	0,146
2.464	1,32	0,121	2.902	1,32	0,121	3.576	1,49	0,173
2.506	1,33	0,140	2.920	1,31	0,117	3.634	1,62	0,210
2.521	1,27	0,104	2.962	1,24	0,093	3.691	1,68	0,276
2.530	1,18	0,072	3.020	1,32	0,121	3.741	2,12	0,326
2.560	1,10	0,041	3.076	1,42	0,152	3.785	2,63	0,420
2.565	1,17	0,048	3.124	1,47	0,167	3.836	2,92	0,485
2.608	1,19	0,076	3.163	1,36	0,140	3.875	3,30	0,580
2.662	1,21	0,083	3.217	1,36	0,134	3.938	4,56	0,699
2.709	1,34	0,127	3.277	1,49	0,173			
2.713	1,39	0,143	3.328	1,52	0,182			

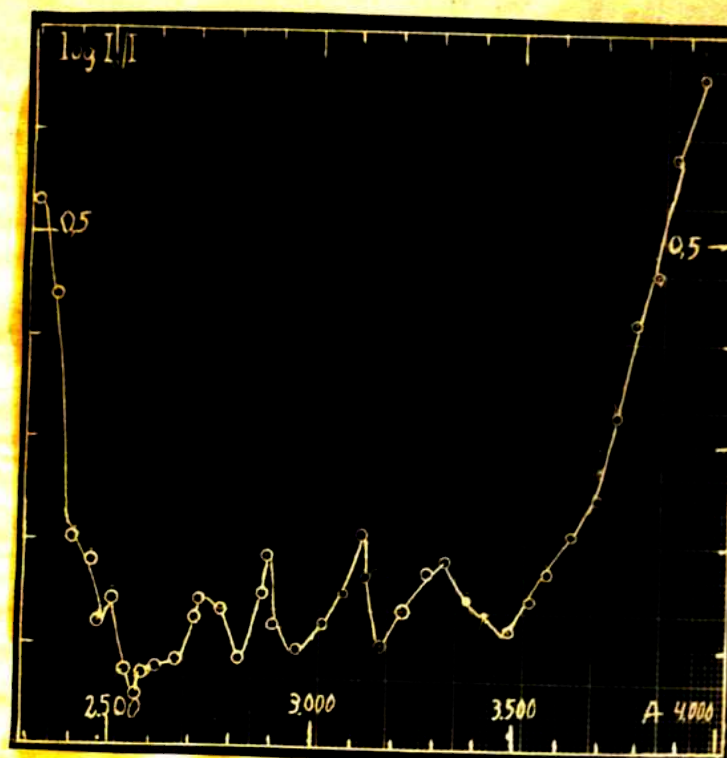


Figura 11
Bilirrubina Schuehard en metanol

parecida, en las zonas extrema...
la curva de la solución clorofo...
rica que a la curva de la solu...
ción en éter. En efecto, coinci...
den o están muy próximos los mí...
nimos en 2.464, 2.560 y 3.482 A...
con los puntos correspondientes...
-2.464, 2.565 y 3.482 A- de la so...
lución clorofo...; los máximos...
en 2.506 y 2.768 A corresponden...
con los de 2.530 y 2.768 A de la...
solución en cloroformo. La curva...
en metanol es más parecida, en la...
zona del ultravioleta medio, a...
la curva en éter, pero existe en ésta un corrimiento de bandas. En efec...
to, al mínimo de 2.464 A (cloroformo y metanol), corresponde un máximo de...
éter. Al máximo de 2.530 A (cloroformo) corresponde un mínimo de éter.

CUADRO A

Wavenumber	chlor.	éter	met.	Wavenumber	chlor.	éter	met.	Wavenumber	chlor.	éter	met.
2.455	-----	mín.	----	2.817	-----	----	mín.	3.328	-----	----	máx.
2.464	mín.	máx.	mín.	2.877	-----	----	máx.	3.482	mín.	máx.	mín.
2.506	-----	----	máx.	2.962	-----	máx.	mín.	3.576	-----	mín.	----
2.530	máx.	mín.	----	3.124	-----	mín.	máx.	3.785	-----	máx.	----
2.560	-----	----	mín.	3.168	-----	máx.	mín.	3.836	-----	mín.	----
2.565	mín.	máx.	----	3.225	-----	mín.	----	3.999	-----	máx.	----
2.768	máx.	mín.	máx.								

A los mínimos de 2.560 (metanol) y 2.565 (cloroformo) corresponde en éter...
un máximo. Al mínimo de 2.768 A en éter corresponde un máximo de...
igual ubicación en cloroformo y metanol. La banda de metanol con

mínimo en 2.817 Å y máximo en 2.877 no tiene correspondiente en las otras curvas. Los mínimos de la curva de metanol en 2.962 y 3.168 corresponden con máximos de igual situación en la curva de las soluciones en éter. Al máximo en metanol de 3.124 Å corresponde un mínimo en éter. Finalmente, al mínimo en 3.482 Å (cloroformo y metanol) corresponde un mínimo en éter.

Debe notarse que en la curva de la solución metílica las bandas de absorción en el ultravioleta medio son poco marcadas, es decir que son pequeñas las diferencias entre los valores máximos y mínimos contiguos de absorción.

Inestabilidad de la solución.- Para estudiarla, se fotometró el par de espectros de posiciones 2-3 (l, 0,5 cm.; t, 40 seg.) de la película 6. Tiempo de preparación: 102 minutos. La variación es algo mayor

TABLA VIII

λ en Å	I ₀ /I	log.	var. %
3.482	1,14	0,057	- 6,6
3.785	1,54	0,183	- 10,5
3.875	1,79	0,253	- 12,7
3.938	1,88	0,274	- 16,4

que en cloroformo y sensiblemente menor que la de las soluciones en éter, si se tiene en cuenta que en las soluciones metílicas el tiempo de preparación es notablemente mayor.

En cuanto a la alteración en sí, puede observarse que es mayor en las

longitudes de onda que inicialmente presentaban mayores absorciones; la pérdida de absorción es relativamente pequeña en la longitud de onda -3.482 Å- que al comienzo presentaba mínimo de absorción: todo ello indicaría un fenómeno de desplazamiento de la banda de absorción, todavía no completado en el momento de tomar el espectrograma final.

Solución de 10 ng./l.- La fotometría se realizó sobre los espectros de posiciones 2 y 4 de la película 6 (l, 0,5 cm.; t, 40 seg.). Tiempo de preparación: 77 minutos, o sea 39 minutos después de la inicial y 25 minutos antes de la final.

TABLA II

λ en A	3.482	3.785	3.875	3.936
I_c/I	2,08	1,29	1,42	1,47
log.	0,035	0,111	0,152	0,167
Var. % con esp. inic.	+13,0	+4,0	+4,1	+2,1
Var. % con esp. final	+20,8	+16,2	+19,5	+22,2

Se observa que los coeficientes de extinción aumentan con respecto a los valores calculados. Las diferencias son menores si se comparan con el espectro inicial, pero en realidad debía esperarse, de acuerdo

al proceso de pérdida de absorción que se deduce de la comparación entre espectro inicial y final, que hubiera pérdida de absorción en este espectro, tomado 39 minutos después del inicial.

También se ve que el aumento de absorción para 3.482 A, con respecto a la solución inicial en que esa longitud de onda señala un mínimo es relativamente mayor que para otras longitudes de onda, de más absorción

Solución de 50 mg./l.- Por ser grande la absorción de esta solución en la zona de 3.900 A, en ella no pueden determinarse exactamente los coeficientes de absorción, pues el ensombrecimiento del espectro de solución es muy débil. La comparación empieza en una longitud de onda algo menor. Para el fotometraje se utilizaron los espectros de posiciones 2 y 3 de la película 6 (l. 0,5 cm.; t. 40 seg.). Tiempo de preparación: 52 minutos (diferencia con la inicial, 24 minutos).

TABLA X

λ en A	I_c/I	log.	Var. %
3.482	1,39	0,145	- 7,2
3.741	2,36	0,372	- 8,9
3.785	2,99	0,476	- 10,0
3.936	3,4	0,511	- 11,8

Las pérdidas de absorción son del orden de magnitud igual a las de la solución final, a pesar de que la diferencia en tiempo de preparación entre solución inicial y la de 50 mg./l. es relativamente pequeña. Esto confirmaría los resultados de Rey y Bontario(14) que hallan

que el coeficiente d/c (d, densidad óptica) aumenta con la concentración y llega a un máximo, para luego disminuir. En nuestro caso, el máximo se alcanza con las relaciones de 10 mg./l., para disminuir en las diluciones de 20 mg./l. y más aún en las de 50 mg./l. En caso de cumplirse la ley de Beer, ese coeficiente se mantiene constante.

4. Las cinco muestras de bilirrubina.

Criterio para la comparación. El problema que nos planteamos a bases de los aspectos: el primero, si las 5 muestras de "bilirrubina" estaban constituidas por la misma sustancia; la segunda, determinar que pureza tienen las distintas muestras, considerando como "standard" a la hematurochrome.

Tomando en cuenta que las diluciones establecidas habían resultado todas ellas inestables y que no había seguridad de que se cumpliera la ley de Beer, lo lógico era comparar las distintas muestras de bilirrubina en diluciones de concentraciones y tiempos de preparación similares.

Para la constatación de identidad de las sustancias se aplicó un criterio de una corriente, o sea comparar las relaciones entre 2 densidades ópticas de una sustancia, con relaciones entre 2 densidades ópticas de la otra sustancia, en iguales longitudes de onda.

Para la determinación del porcentaje de pureza, cuando la curva de absorción de la sustancia impurificada es desconocida, es corriente la utilización de fórmulas derivadas algebraicamente de la ley de Beer (Tyrman y Allcott, 54), sobre la base de determinar curvas de absorción para dos relaciones de distinta concentración. Pero en nuestro caso existen dudas sobre el cumplimiento de la ley de Beer, por lo cual no son aplicables esas fórmulas. En consecuencia, se determinó la impureza de las sustancias en base al porcentaje de absorción (tomando absorción de

Hoffmann-Laroche 100), en longitudes de onda para las cuales, teniendo en cuenta todas las sustancias que pueden acompañar a la bilirrubina, es ésta la única con absorción notable, de acuerdo con datos coincidentes de la literatura consultada. Estas longitudes de onda son las superiores a 3.400 Å; también se hizo la comparación entre Schuchard y Hoffmann-Laroche en bajas longitudes de ondas, en las que la bilirrubina presenta mínimos típicos.

Bilirrubina Hoffmann-Laroche.- La fotometría se efectuó sobre el par de espectros de posiciones 2 y 3 de la película 2 (t. 40 seg.; l. 1,0 cm.); concentración, 20 mg./l.; tiempo de preparación, 26 minutos.

TABLA XI
Bilirrubina H.Laroche en metanol

λ en Å	I/I	log.	λ en Å	I/I	log.
2.404	1.63	0.212	3.576	1.51	0.179
2.455	1.56	0.193	3.634	1.65	0.217
2.464	1.35	0.130	3.691	1.96	0.292
2.506	1.41	0.149	3.741	2.19	0.340
3.381	1.41	0.149	3.785	2.83	0.452
3.429	1.38	0.140	3.836	3.04	0.483
3.482	1.36	0.134	3.875	4.08	0.611
3.576	1.43	0.155	3.938	4.85	0.686

La forma de la curva concuerda perfectamente con la de la bilirrubina Schuchard; los valores de absorción son mayores en la Hoffmann. La identidad de los componentes principales de ambas sustancias queda comprobada por las siguientes relaciones entre densidades ópticas

(log. I./I para c 20 mg./l. e iguales espesores. Se comparan la mayor densidad óptica hallada en la zona estudiada con dos mínimos y estos en

CUADRO B

	^a 3.938/ ^a 3.482	^a 3.938/ ^a 2.464	^a 3.482/ ^a 2.464
Schuchard	5.30	5.44	1.02
H.Laroche	5.20	5.30	1.01

tre sí. Los subíndices indican longitudes de onda.

Bilirrubinas Elmer-Amend y Kodak.- En la película 7 se fotometra con algunas zonas de los espectros de posiciones 2 (Elmer-Amend

TABLA XII

λ en Å	Elmer Amend		Kodak	
	I./I	log.	I./I	log.
3.482	1,16	0,064	1,14	0,057
3.533	1,19	0,076	1,18	0,072
3.634	1,27	0,104	1,24	0,093
3.741	1,46	0,164	1,42	0,152
3.836	1,70	0,230	1,65	0,217
3.938	2,11	0,324	2,05	0,312

Amend) y 4 (Kodak), comparándose-
los, por separado, con el espec-
tro de posición 3 (disolvente).
Tiempo de preparación: Kodak, 30
minutos; Elmer-Amend, 25 minutos.
En ambos espectros el largo fron-
tal es de 0,5 cm. y el tiempo de
exposición de 40 segundos.

Los valores de absorción en general
de la Elmer-Amend en general son

similares a los de la Schuchard; los de la Kodak son bastante inferior-
res. El valor de la relación $d_{3.938}/d_{3.482}$ es de 5,15 para la Elmer
Amend y 5,43 para la Kodak. La diferencia entre este valor y el corres-
pondiente de la Hoffmann es mayor que los respectivos valores Schuchard
y Elmer-Amend; ello se debe a que la Kodak (expedida con la advertencia
"not for drug use") es evidentemente más impura.

Pureza de las muestras. - En el siguiente cuadro podrán compa-
rarse las pérdidas de absorción, en partes por 100 con respecto a

CUADRO C

λ en Å	3.482	3.533	3.634	3.741	3.836	3.938	Prom.
Schuchard	5,4	5,5	4,8	4,0	3,9	4,1	4,8 %
Elmer Am.	4,5	3,2	5,0	3,2	4,5	3,2	4,2 %
Kodak	14,8	8,4	13,3	11,4	9,7	10,2	11,3 %

Valores correspondientes de la Hoffmann-Laroche. De esta comparación
se deduce que la Schuchard y la Elmer-Amend tienen aproximadamente el
mismo grado de pureza, considerablemente mayor que el de la Kodak

6. Comparación con los resultados de otros autores.

En el siguiente cuadro consignaremos las partes notables (máximas y mínimas) obtenidas por otros autores en sus trabajos sobre absorción ultravioleta de la bilirrubina. Pero con la excepción de una parte en el frasco algunos otros se limitan a señalarlos en las gráficas, por lo cual los valores que transcribimos son sólo aproximados: curvas, finalmente, así lo describen sus curvas en términos generales. Las técnicas y condiciones de trabajo son distintas en cada caso, diferenciando en diversos factores: espectrógrafo, fotometría, origen o forma de purificación de la bilirrubina, disolventes, etc. Las diferencias, en especial la distinta calidad de las bilirrubinas o su variable alterabilidad, pueden explicar parcialmente las divergencias en los resultados.

En la columna I se encuentran los datos de Carnot y Henry-Carnot (17, 18), que encuentran iguales posiciones de mínimos de absorción en soluciones alcalinas-ácidas y ácidas-ácidas; en la columna II, los de Adams (9), en mezcla alcohol-acetato ácido (A) y en agua acidificada (B); en la III, los de Cotton, Morton y Hartman (22), en cloroforme; en la IV, los de Williams y Cabellé Ros (12) en cloroforme (A), hidróxido de sodio N/50 (B) y en hidróxido de sodio N/500 (C); en la V, los de Lambrecht y Barac (13), en solución ácida alcalina con ácido acético; en la VI, los de Davis y Beard, en solución de NaOH 0,001; y en la VII los de Verhaller (23), que disolvía bilirrubina "Merck" en solución fisiológica alcalinizada con pequeñas cantidades de hidróxido de sodio.

Comparemos estos datos consignados en el cuadro Dc con los resultados de este trabajo, reunidos en el cuadro A. Los mínimos en nuestra curva de cloroforme coinciden con los hallados en otros de disolventes por Carnot y Henry-Carnot, pero no coinciden con el único mínimo que encuentran Williams y Cabellé Ros y Cotton y colaboradores en cloro-

absorbedas y líneas concéntricas, en soluciones alcalinas, curvas "regulares" (sin bandas diferenciadas) pero los mismos autores señalan que existe interferencia en el ultravioleta medio por absorción del ácido ascórbico.

Davis y Beard afirman que la banda con mínimo en 2.600 Å que encuentran en agua no es propia de la bilirrubina sino de las protéínas. Esto no es aplicable a nuestras curvas pues las bandas de absorción que hallamos en las proximidades de esa longitud de onda no tienen la misma ubicación en los tres disolventes, por lo que resulta más lógico atribuir esas bandas a distintas formas de alteración de la bilirrubina que a protéínas. Davis y Beard tampoco encuentran los mínimos en 2.650 Å y 2.870 Å de Garnet y Henry-Garnet, a pesar de trabajar con soluciones similares (solución-alcalina). Si sobre la curva de Adams en alcohol-solución alcalina y nuestra curva en etanol hay gran similitud en la zona del ultravioleta medio (2.000-3.500 Å, la curva de Adams no va más allá de los 3.000 Å); el parecido de la curva de Adams con nuestra curva en éter, en esa zona, es algo menor (igual cantidad de bandas de similar extensión, pero alguna diferencia en la ubicación de los mínimos); en la zona próxima al visible (3.500-4.000 Å), nuestra curva en éter y la de Adams en alcohol-solución son muy similares. Es interesante advertir que Cotton y colaboradores determinan en alcohol-solución alcalina una curva (no la publican) parecida a la de cloroformo, es decir con un solo mínimo en ultravioleta, mientras que Adams halla 3 mínimos más en la zona entre 3.000 y 4.000 Å. Finalmente, en la curva de Viehhafer encontramos algunos mínimos coincidentes con los de nuestras soluciones; este autor también determina absorción del agua normal, encontrando mínimos de absorción próximos a los de la solución de bilirrubina, y otros más que pueden atribuirse a la influencia de la bilirrubina en la absorción del agua.

Lo que puede explicar en definitiva estas diferencias y similitudes

es el siguiente hecho: tanto en los trabajos de Adams, Carnot y Henry-Carnot y Vierheller como en los nuestros, la determinación de longitudes se hace por medición directa de las intersecciones con microfotómetros fotocalígrafos, en tanto que los otros autores utilizan métodos de comparación y realizan determinaciones de igualdad de empalmamiento en forma visual. Es probable que con estos métodos no permitan descubrir detalles finos, variaciones notables de absorción en zonas próximas, o pequeñas diferencias de empalmamiento que hacen aparecer nuevas bandas.

Carnot y Henry-Carnot encuentran esas variaciones en sus curvas utilizando una fuente ultravioleta (lámpara de hidrógeno) que da espectro continuo, por ello no sería lógico atribuir las "irregularidades" de nuestras curvas al hecho de utilizar espectros de líneas. Debe notarse también que Lambrecht y Dorze también repiten un fotostereaje utilizando microfotómetro fotocalígrafos, sin encontrar tampoco las bandas que señalan Carnot y Henry-Carnot, pero debe volverse a recordar la interferencia del ácido acético, y observar que aplican el microfotómetro a espectros tomados de acuerdo al método de V. Henry (variación de tiempos para uno de los dos espectros), cuya crítica hicimos, repitiendo las de otros autores.

V. CONCLUSIONES GENERALES

1. Se determinaron curvas de absorción de hidrógeno de longitud en alcohol metílico, cloroformo y éter-cloroformo. Los resultados obtenidos son similares a los de otros autores que utilizaron microfotómetros fotocalígrafos, con hidrógenos de otros orígenes y dióxidos diferentes: difieren en mayor o menor grado con curvas obtenidas en hidrógenos de otros orígenes, dióxidos en los mismos o en otros disolventes, obtenidas por autores que no utilizaron ese instrumento.

II/ Se determinó la identidad de los compuestos principales de las bilirrubinas Schuchard, Kilmor-Lewis y Mack, con la Maffman-Larock, considerada "standard".

III. Los valores de absorción determinados en soluciones de bilirrubina Maffman-Larock pueden aplicarse a la determinación cuantitativa de bilirrubina en solución metilica alcalina, de reciente preparación y en concentraciones próximas a los 20 mg./l.

IV. El grado de pureza de las bilirrubinas Schuchard y Kilmor-Lewis es de 94-95 % el de la Mack, de 88-89 %.

V. Las soluciones estudiadas son inestables, siendo más rápida la alteración en las soluciones de Mack (con 10 % de clorofoma).

IV. BIBLIOGRAFIA

1. Peterman, F. A. Patente norteamericana 2.000.034 (cit. en Chemical Abstracts, 30, 6392).
2. F. Haller y L. Engel, La Química Orgánica, 122, 117 (1921): SUR LA ABSORPTION SPECTROSCOPIQUE DES BILIRUBINES EN VERIFICATION DE LA STRUCTURE MIXTE, I.
3. E. Libovitzky, La Química Orgánica, 122, 267 (1920): BILIRUBINE FROM MURINE BILE (cit. en C. A. 25, 4187).
4. Ch. Daró y J. Roche, Annales Chim. Phys., 12, 907 (1921): RECHERCHES SUR LA FLORESCENCE DES PIGMENTS DU GROUPE DE L'UROBILINE. DETERMINATIONS DE LEURS SPECTRES DE FLORESCENCE.
5. M. W. Le Delfere, Annales Chim. Phys., 21, 1121 (1920): ETUDE SUR LES GROUPEMENTS CARBOXYLES ET LES GROUPEMENTS AMINE PRIMAIRE DE LA BILIRUBINE.
6. J. F. Zelazo: BILIRUBINEMIA NORMAL (tesis de doctorado, P. C. M.). Buenos Aires, 1940.
7. E. Fischer, E. Fiesinger y O. Weisbath, La Química Orgánica, 262, 197 (1921): BILE PIGMENTS. XII. ON THE STRUCTURE OF BILIRUBIN AND ON BILIRUBINOIDS PIGMENTS (cit. en C. A., 25, 4111).
8. G. A. Adams, Biophysical J., 20, 2-026 (1926): THE ULTRAVIOLET SPECTRUM OF HEMOGLOBIN AND ITS DERIVATIVES.
9. Ch. Rabier, Comptes Rendus Acad. Sci. Paris, 101, 1172 (1929): LE DOUAGE DE LA BILIRUBINE PAR UNE METHODE SPECTROPHOTOMETRIQUE.
10. Ch. Jourd, F. C. Mann y J. Le Gallouan, Ann. de Chimie, 81, 774 (1927): SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATIONS OF PURIFIED BILIRUBIN.
11. Ch. Jourd, E. J. Nelson, F. C. Mann y J. Le Gallouan, Ann. de Chimie, 74, 577 (1926): SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF BILIRUBIN.

12. A. Lambrechts y G. Barac, Bull. Soc. chim. Belg., 21, 1171 (1939): LE SPECTRE DE LA BILIRUBINE EN MILIEU ALCALEIN.
13. A. T. Williams y J. Cabello Ros, Rev. Soc. Arg. de Biol., 12, 400 (1943): ABSORCIÓN ULTRAVIOLETA DE LA BILIRUBINA Y BILIVERDINA.
14. M. Rey y Angustín Bontario, Compt. Rend., 292, 1021 (1939): THE INHIBITORY EFFECT OF THE SERUM PROTEINS ON THE ALTERATIONS OF BILIRUBIN IN ALKALINE SOLUTIONS (cit. en C. A., 34, 2869).
15. M. Rey y Angustín Bontario, Compt. Rend., 215, 189 (1941): SPECTROPHOTOMETRIC INVESTIGATIONS OF BILIRUBIN SOLUTIONS (cit. en C. A., 37, 3278).
16. M. G. Barac, Bull. Soc. chim. Belg., 21, 1165 (1939): STABILISATION ET DOSAGE DE LA BILIRUBINE DANS LE LIQUIDE DUODENAL.
17. J. Henry-Cornet y L. A. Henry, Bull. Soc. chim. Belg., 22, 553 (1936): ÉTUDE DU SPECTRE D'ABSORPTION DE LA BILIRUBINE.
18. J. Henry-Cornet y L. A. Henry, Bull. Soc. chim. Belg., 23, 697 (1937): DOSAGE DE LA BILIRUBINE DANS LE SÉRUM SANGUIN PAR LA METHODE SPECTROGRAPHIQUE.
19. A. Bontario y M. Rey, Bull. Soc. chim. Belg., 25, 50 (1943): LIGHT ABSORPTION IN THE VISIBLE SPECTRUM BY SOLUTIONS OF BILIRUBIN (cit. en C. A., 38, 1688).
20. R. S. Hubbard y E. Seidman, J. Lab. Clin. Med., 26, 1206 (1941): THE SOLUTION AND DIAZOTATION OF BILIRUBIN IN CHLOROFORM AND OTHER ORGANIC SOLVENTS.
21. V. Dealefeu y A. D. Mariani: CURSO DE QUÍMICA BIOLÓGICA, Doc nos Aires, 1942).
22. M. Raper: LA URUBILINA AL ESTADO NORMAL Y PATOLÓGICO (tesis de doctorado, F. C. M.), Buenos Aires, 1939.

23. A. Raíces, Rev. Méd. Quirúrg. de Pat. Fem., 8, 1 (1936)
LOS PIGMENTOS BILIARES EN LA SANGRE Y EN LA ORINA.
24. MR. Gregory y M. Andersch, J. Lab. Clin. Med., 23, 572
(1937): THE INFLUENCE OF THE QUANTITY OF SERUM BILIRUBIN ON THE TYPE
OF VAN DEN BERGH REACTION.
25. S. J. Griffiths, Biochem. J., 26, 1.155 (1932): THE ISO-
LATION FROM BILE OF PIGMENT HAVING DIRECT VAN DEN BERGH REACTION.
26. F. S. Fowweather, Biochem. J., 26, 165 (1932): BILIRUBIN
AND THE VAN DEN BERGH REACTION.
27. P. Müller y L. Engel, Z. physiol. Chem., 202, 56 (1931):
loc. cit. (2), parte III.
29. L. Heilmeyer y W. Krebs, Biochem. Ztschr., 223, 352 (1930)
SPEKTROPHOTOMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN DAS EBRLICH-PRÖSCHERCHEN BILIRUBIN
AZOFARBSTOFFES UND IHRE PRAKTISCHE ANWENDUNG, BESONDERS ZUR QUANTITATI-
VEN BESTIMMUNG DES BILIRUBIN IN BLUTSERUM.
28. F. B. Magath y Ch. Sheard, Arch. Int. Med., 29, 214 (1927): SPECTRO-
PHOTOMETRIC ANALYSIS OF BLOOD SERUM IN NORMAL AND PATHOLOGIC CONDITIONS
1927
30. G. E. Davis y Ch. Sheard, J. Lab. Clin. Med., 23, 22 (1937): THE ABSOR-
TION SPECTRA OF THE DIRECT AND INDIRECT REACTION TYPES OF SERUM BILIRUBIN
31. H. T. Malley y K. A. Evelin, J. of Biol. Chem., 119, 481 (1937):
THE DETERMINATION OF BILIRUBIN WITH THE PHOTOELECTRIC COLORIMETER.
32. M. K. Castex, A. López García y J. F. Zelasco: ESTUDIO DE LA
BILIRUBINEMIA TOTAL, DIRECTA E INDIRECTA, POR UN MÉTODO ESPECTROFOTO-
MÉTRICO. Buenos Aires, 1940.
33. G. E. Davis y Ch. Sheard, J. Lab. Clin. Med., 19, 593 (1934): THE
SPECTROPHOTOMETRIC INVESTIGATION AND DETERMINATION OF BILIRUBIN.
34. M. Roy y A. Bontario, Compt. Rend., 215, 425 (1942): THE AMOUNT
OF BILIRUBIN IN BLOOD SERUM (cit. en C.A., 38, 3.334).
35. P. Müller y L. Engel, Z. P
hysiol. Chem., 200, 145 (1931):

loc. cit., parte II.

36. L. Heilmeyer: MEDICINA DE ESPECTROFOTOMETRIA, Jena, 1933.

37. L. Heilmeyer y E. Zieg, Z. ges. exp. Med., 60, 603 (1932):
CLINICAL COLOR MEASUREMENT. XII. SPECTROPHOTOMETRIC PIGMENT ANALYSIS
OF BLOOD SERUM WITH RESPECT OF THE BILIRUBIN AND CAROTENE SPECTRA (cit.
en Ca. de 22, 44221; y por Davis y Beard, 22).

38. C. Cotton, E. F. Ruzman y E. Wastner, Arch. Int. Med. 41,
428, (1928): THE INTENSIVE INDEX. SPECTROPHOTOMETRIC AND QUANTITATIVE STUDY

39. F. Viehboller, trabajo próximo a publicarse (Buenos Aires,
1946): ESTUDIO ESPECTROGRÁFICO DEL SUERO HUMANO.

40. V. Orignard: TRAITÉ DE CHIMIE ORGANIQUE, 3, 113.

41. A. S. Giordano y M. Prostros, Ann. de Chim. Phys. Ser. 8
2, 100 (1938): AN IMPROVED METHOD FOR THE PHOTOMETRIC DETERMINATION OF
SERUM BILIRUBIN.

42. V. Orignard, op. cit., 3, 683.

43. V. Orignard, op. cit., 3, 673.

44. V. Orignard, op. cit., 3, 933.

45. FARMACOPA NACIONAL ARGENTINA, 3a. ed., Ba. Aires, 1943.

46. NORMAS ANALAB. 1a. ed. española, Ba. Aires, 1945.

47. Imardi y Colle: FÍSICA, 2° curso, 2° fascículo: ÓPTICA, pág.
411. Buenos Aires, 1936.

48. F. Viehboller, A. F. Giordano y J. C. Scalfarini, La FÍSICA
NACIONAL ARGENTINA, 22, 2111 (1941): CONSIDERACIONES SOBRE EL COEFICIENTE
DE EXTINCION Y SU DETERMINACION POR EL METODO FOTOGRAFICO/

49. L. R. Bragg: CHEMICAL SPECTROSCOPY New York, 1942: págs.
152, 155 y 401.

50. F. Toyama y C. B. Allsopp: THE PRACTICE OF ABSORPTION SPECTRO-
TROPHOMETRY WITH MILLER INSTRUMENTS. London, 1934.

51. S. R. P. Gibbs: OPTICAL METHODS OF CHEMICAL ANALYSIS, pág.

56. Nueva York, 1942.

52. H. Kayser: TABELLE DER HAUPTLINIEN DER LINIENSPEKTRA ALLER ELEMENTE NACH KURZLÄNGEN GEORDNET. Berlin, 1926.

53. G. A. Sawyer: EXPERIMENTAL SPECTROSCOPY, Nueva York, 1944, págs. 143.

54. G. C. Beach y L. D. Coleman, Rev. Phys. Ed. 241 (1940): PRECISION OF A PHOTOELECTRIC SPECTROMETER IN ABSORPTION MEASUREMENT

-0-0-0-0-0-0-0-

INDICE

I. LA BILIRRUBINA.

Propiedades físicas y químicas, 4. Inestabilidad de las soluciones, 6. Procesos de formación y transformación de la bilirrubina en el organismo. Bilirrubina directa e indirecta, 10. Bilirrubinemia normal; algunos valores patológicos, 11. Importancia de las curvas espectrográficas de las emisiones de bilirrubina, 16. Objetivos y características del presente trabajo, 17.

II. MÉTODOS DE TRABAJO.

1. Las Emisiones. Origen, 20. Ensayos de pureza, 20. Los disolventes, 22. Las emisiones, 23.

2. Instrumentación. Fórmulas generales en espectrografía de absorción, 24. El espectrógrafo y los dispositivos auxiliares, 27. Elección de los gases frontales y tiempos de exposición, 28. Realización de los espectrogramas, 30. Descripción de las películas usadas, 30. Corrección de la escala de longitudes de onda, 37.

3. Fotometría. Principio de la determinación, 40. Aparato, 41. Realización del fotometraje, 43. Cálculo del fotometraje, 45. Observaciones, 47. Corrección por ensombrecimiento del fondo, 50. Corrección por ensombrecimiento del fondo en la película de calibración, 52.

III. RESULTADOS Y CONCLUSIONES.

1. Criterio exacto. Forma de presentación de los resultados, 54. Determinación de las longitudes de onda, 54.
2. Bilirrubina Schuchard en cloriformo. Curva de absorción, 55. Estabilidad de la solución, 56. Solución de 10 mg./l., 56.
3. Soluciones en éter. Curva de absorción, 57. Estabilidad de la solución, 58. Solución 10 mg./l., 59.
4. Bilirrubina Schuchard en alcohol metílico. Curva de absorción, 59. Inestabilidad de la solución, 61. Solución de 10 mg./l., 61. Solución de 50 mg./l., 62.
5. Las otras formas de bilirrubina. Gráfico para la comparación, 63. Bilirrubina Hefmann-Laruche, 64. Bilirrubinas Humer-Arnold y Kriak, 64. Puresa de las muestras, 65.
6. Comparación con los resultados de otros autores. 66.
7. Conclusiones generales. 69.

IV. BIBLIOGRAFIA, 71.

-0-0-0-0-0-

J. Grunberg