

Tesis de Posgrado

Determinación de los cationes sodio, potasio, calcio, magnesio, por método polarográfico y fosfatos inorgánicos (por colorimetría), en líquido alantoideo de huevos fértiles de gallina normales e inoculados con virus "A" de influenza

Brieux, Sonia E.

1951

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:

Brieux, Sonia E. (1951). Determinación de los cationes sodio, potasio, calcio, magnesio, por método polarográfico y fosfatos inorgánicos (por colorimetría), en líquido alantoideo de huevos fértiles de gallina normales e inoculados con virus "A" de influenza. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0680_Brieux.pdf

Cita tipo Chicago:

Brieux, Sonia E. "Determinación de los cationes sodio, potasio, calcio, magnesio, por método polarográfico y fosfatos inorgánicos (por colorimetría), en líquido alantoideo de huevos fértiles de gallina normales e inoculados con virus "A" de influenza". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1951.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0680_Brieux.pdf

T

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales

"Determinación de los cationes sodio, potasio, calcio y magnesio, por método polarográfico y fosfatos inorgánicos (por colorimetría) en líquido extraído de huevos fértiles de gallina normales e inoculados con virus "A" de Influenza"

T E S I S

Para optar al título de Doctor en Química

Senia E. Brioué

TESIS: 680

AÑO 2011

SEÑORES PROFESORES:

A vuestra consideración y benevolencia presento este trabajo que dará término a mis estudios universitarios.

El más profundo agradecimiento al Profesor Dr. Jorge Mendive por su gentileza al poner a mi disposición los laboratorios del Instituto Malbrán y sobre todo por sus provechosos consejos y buena voluntad con que me contribuyó a solucionar todas las dificultades.

Al Dr. Armando E. Parodi, quien me ha dispensado el honor de acompañarme en esta tarea, agradezco sinceramente sus indicaciones, que han sido ayuda valiosa para el desarrollo de las investigaciones efectuadas y la feliz terminación de los mismos.

A los Jefes y Técnicos del Instituto Malbrán así como de la Dirección General de Química que de una manera u otra me han facilitado la tarea, toda mi gratitud.

Un sincero reconocimiento hacia los profesores que supieron guiarme a través de toda mi carrera universitaria.

INTRODUCCION

En el presente trabajo nos proponemos analizar el líquido alantoideo de embrión de pollo, con el objeto de determinar fosfatos inorgánicos y de hidrólisis de 7 minutos; sodio, potasio, calcio y magnesio en el líquido normal e infectado con virus de influenza cepa 7 en dilución 10^{-5} , con el objeto de ver si la infección de virus introduce alguna variación en el contenido de estas cationes y anión fosfato. (14) (7)

Trabajos realizados en los últimos años, en el terreno de las enfermedades a virus ⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾ y en el caso particular de la infección experimental del embrión de pollo por el virus de influenza ⁽¹⁸⁾ (Berkeley, 1945; ⁽¹⁹⁾⁽²⁰⁾ Farodi, Lajánovich, Penninpede y Mittelman, 1947; Penninpede, ⁽⁵⁾ 1948; Pappalardo, ⁽⁶⁾ 1949), indicarían la existencia de variaciones consistentes en el pH y volumen de los líquidos alantoideos de embriones normales e infectados, como así también en el peso de los mismos. Se observó un aumento en el pH y volumen de los alantoideos correspondientes a embriones infectados y una disminución en el peso de éstos; aumento en el nitrógeno excretado o acumulado en el líquido alantoideo de los embriones infectados; más nitrógeno proteico, ácido úrico y creatinina (pero estas variaciones no se observan después del 24 días de incubación). Se observa además en los embriones infectados dificultades en el metabolismo gaseoso. Se han tomado estas observaciones como punto de partida; en el tema a tratar no se han encontrado antecedentes bibliográficos.

El plan de trabajo a seguir es el siguiente:

- I) Estudio bibliográfico, previo y antecedentes al respecto.
- II) Método de análisis a seguir.

Primera parte.-

- a) preparación de los huevos a extraer las muestras para análisis.
- b) Obtención de las muestras de líquido alantoideo normales e infectados con virus de influenza, cepa 7.
- c) Análisis de las muestras extraídas.

Segunda parte.-

- A) Método polarográfico: para los cationes, sodio, potasio, calcio y magnesio.
- B) Método colorimétrico: para fosfatos.

III) Aplicación del cálculo estadístico a los datos obtenidos, con el objeto de hallar las diferencias significativas para cada cación y aún entre los lotes de huevos normales e infectados analizados.

IV) Resumen.

La bibliografía respectiva a cada tema será incluida a medida que se desarrolle el plan de trabajo.

Para este tipo de experiencias biológicas en las cuales se requiere un gran número de determinaciones, debido principalmente a los siguientes factores:

- 1) Dificultad en la obtención de una muestra representativa.
- 2) Elevada mortalidad de algunas tandas de huevos.
- 3) Imposibilidad de controlar el origen de los huevos.
- 4) Elevada variación individual de los datos, que obliga a realizar gran número de determinaciones para tener valores representativos.

Es necesario la elección de un método de análisis químico que permita un trabajo en serie con el menor número de manipulaciones por operación. Por ello el método polarográfico que cumple ampliamente estos requisitos: rapidez y exactitud dentro de una técnica sencilla ha sido adoptado. Es un método relativamente moderno y de gran provecho en análisis ⁽²⁸⁾ de tipo biológico y de exactitud equiparable a otros métodos ya clásicos.

PRIMERA PARTE

a) Se utilizaron huevos de gallina ⁽³⁾ Leghorn de criadero. Se incubaron durante doce días a 37°C, conservando el grado de humedad requerido y dándoles vuelta (por movimiento de la bandeja "ad hoc"), dos veces por día. A los doce días de incubación, fueron revisados al ovoscopio y los que estaban vivos, son inyectados, previa demarcación de la cámara de aire y elección del lugar de inyección (por transparencia al ovoscopio) libre de grandes vasos sanguíneos, para evitar hemorragias. Se desinfecta el lugar a inyectar con algodón embebido en solución alcohólica de yodo y se hace un orificio con punzón de modo de gradar únicamente la cáscara del huevo pero no la fáfara, así permanece cerrado el sistema del huevo y se evitan infecciones extrañas que provocarían alteraciones y mortalidad en los embriones. Las jeringas de inyección utilizadas son de 2 ml. de capacidad, estériles por hervido en H₂O a 100°C durante diez minutos. Se inyectan, por cámara de aire, los huevos normales, con disolución de líquido alantoideo normal en solución fisiológica estéril, y los huevos a infectar, con virus cepa 7 dilución 10⁻⁵ en solución fisiológica estéril.

El título del virus inyectado se determina simultáneamente, con otra tanda de huevos, inyectando virus "A" de Influenza cepa 7 aislada en el país (Serdelli, Parodi, Taylor)⁽³⁾, título 1/1024 (aglutinación globules rojos de pollo Técnica de Hirst; en diluciones desde 10⁻⁵ hasta 10⁻⁹ en solución fisiológica estéril. Se cierra el orificio de inyección con parafina y se colocan todos los huevos a incubar a 37°C. A las 24 horas de haber sido inyectados, los huevos a analizar se extraen.

Los huevos para título de virus ⁽¹⁹⁾⁽²⁰⁾ son dejados 48 horas en incubadora a 37°C ⁽¹²⁾ luego de este tiempo se extraen como se indica seguidamente.

b) Con jeringas estériles, utilizando una jeringa (de 1 a 2 ml. capacidad) individual para cada huevo a extraer, se saca el líquido alantoideo en forma estéril. Previamente se desinfecta con alcohol el casquete de cáscara que cubre la cámara de aire, anteriormente demarcada al ovoscopio por transparencia. Con una pequeña tijera curva pasada por llama se descubre la cámara de aire. Por transparencia de la fáfara con vaselina líquida estéril se observa una región sin vasos sanguíneos donde se extrae el líquido alantoideo (1 a 2 ml.) para analizar, el resto de líquido alantoideo se recoge por vuelco en buretas

graduadas (especialmente diseñados a tal efecto) son pipetas a las cuales se ha colocado una base de vidrio que permite su verticalidad y cuya parte superior se ha ensanchado donde puede adaptarse un buchner y con una rama lateral que permite aspirar para facilitar la extracción total del líquido alantóideo; el uso del buchner permite repesar el contenido embrionario sin su rotura provocada por su propio peso al hacer el vuelco del huevo, se preserva así la yema y amnios, además se tiene así la seguridad de que éste último está íntegro y no impurifica el líquido alantóideo extraído). Esta operación de extracción total del líquido alantóideo es en principio delicada pero con la práctica se adquiere seguridad en la validez del volumen total extraído. Se hace al mismo tiempo de extracción, un ensayo de esterilidad de las muestras a analizar, con 0,1 cm³ de líquido alantóideo en tubos de agar que se ponen en estufa, 24 horas a 37°C, se observa si hay ó no desarrollo de colonias bacterianas en caso positivo se desecha la muestra.

El ensayo de infección de virus se hace por aglutinación de glóbulos rojos de pollo al 0,2%, (técnica de Hirst)⁽²⁾. Se plean los embriones normales e infectados previo secado en papel de filtro.

Las muestras así obtenidas son guardadas en heladera en tubitos de vidrio de 4 ml. de capacidad. La determinación de fosfato inorgánico y de hidrólisis de 7 minutos fué hecha en el mismo día de extracción sobre el líquido alantóideo recién extraído a temperatura ambiente para evitar la precipitación de uratos.⁽⁹⁾⁽²⁾ Con el resto de las muestras se obtuvieron las cenizas correspondientes por tratamiento del líquido alantóideo 2 a 3 ml. con CHN aproximadamente normal en capsulas de platino, llevado a sequedad en baño maría y luego en estufa a 400°C hasta obtención de cenizas blancas y constancia de peso.

Las cenizas se disuelven en 2 ml. de H₂O destilada y el resto sin disolver se pesa nuevamente; se tiene así datos de cenizas solubles o insolubles en agua.⁽¹⁰⁾⁽¹³⁾

e) De estos 2 ml. de disolución de cenizas se utilizó 0,1 ml. para determinación polarográfica simultánea de Na⁺ + K⁺, 0,1 ml. para precipitación de Na⁺ y 0,5 ml. para Mg⁺⁺ el resto para análisis de Ca⁺⁺.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- "Embriología química". J. Needham, Cambridge 1931.
- 2.- "The quantitative determination of influenza virus and antibodies by means of red cell agglutination." Hirst, J. Exp. Med., 1942, 75, 49.
- 3.- "Biochemistry and morphogenesis." J. Needham, 1942.
- 4.- "Metabolismo de las membranas corioalantoicas de embrión de pollo infectado con virus "A" de Influenza." Parodi, Lajmanovich. Rev. Soc. Arg. Biol., 1947.
- 5.- "Acción del virus "A" de Influenza sobre el peso de los distintos constituyentes del huevo de gallina en desarrollo." Tesis. Univ. de la Plata, Rev. Inst. Bact. Malbrán.
- 6.- "Modificaciones producidas en el huevo fértil de pollo por la inoculación de virus "A" de Influenza? Fuzsmpeds, Parodi, Lajmanovich y Mittelman. Ciencia e Inv., 1947.
- 7.- "Inhibition of phosphorylation of glucose in some brains by viruses and its prevention by preparation of diphosphopyridine nucleotide." Raeder-Krinsky, J. Exp. Med., 1946, 81, 191.
- 8.- "Estudio de los virus de la epidemia de influenza ocurrida en la Argentina durante el año 1940.", Scordelli, Taylor, Parodi. Rev. Inst. Bact. Malbrán, 1941, 10, 265.
- 9.- "Physical properties of the allantoic and amniotic fluids of the chick." J. Gen. Physiol., 1943, 26, 485.
- 10.- "Los cambios en el contenido de cenizas de huevo de gallina durante su desarrollo." Plimer and John Lowder. Biochem. J., 1924, 18, 1183.
- 11.- Análisis de líquidos extraembrionarios de huevos de gallina normales e inoculados con virus "A" de influenza." Tesis. Rev. Inst. Bact. Malbrán, 1949, 14.
- 12.- "Propiedades físicas y composición química de los fluidos amniótico y alantóico de embrión de pollo." Tokami-Kawai. Z. physiol. Chem., 1927, 15, 171.
- 13.- "Compartimiento de los constituyentes inorgánicos en la incubación de huevos de gallina." Tokami-Isaki. Z. physiol. Chem., 1930, 92, 188.
- 14.- "Intercambio de iones entre células y fluido extracelular. I. Tono de K en la membrana corio-alantoica del huevo de gallina." A. High, Acta physiol. Scand., 1943, 6, 203. (Abstracts).
- 15.- "Adsorption by erythrocytes nuclei of chicken." A.S. Parodi, Lajmanovich, Mittelman. Rev. Inst. Bact. Malbrán, 1944, 13, 312.
- 16.- Annales de L'Institut Pasteur. "Curva de crecimiento del virus vacinal en la membrana corio-alantoica del huevo." P. Lepine, WeelgeoyReivie, 1951, 31, 77.
- 17.- "The growth cycle of influenza virus A". The veterinary Bull., 1950, 2264.
- 18.- "Thermal destruction of influenza A virus infectivity." M. Lauffer Carnoly, Ms Donald. Arch. Biochem., 1948, 16.

19.- "Determinación del fifty per cent end points." L.J. Reed, H. Muench, The Amer. J. Hyg., 1938, 37.

20.- "Título de virus." J. Bickham, J. Biol. Chem., 1950, 46.

SEGUNDA PARTE

A. Método polarográfico.— Aplicación al análisis de sodio, potasio, calcio y magnesio en disolución acuosa de cenizas de líquido alantoides.

- 1) Introducción teórica. ⁽¹⁴⁾ ⁽²⁵⁾ ⁽²⁶⁾ ⁽⁴²⁾
- 2) Elección de los métodos a seguir para cada catión. ⁽²³⁾ ⁽²²⁾
- 3) Aplicación a las cenizas de líquido alantoides.
Parte experimental.

1) El análisis químico por el método polarográfico se basa en la interpretación de la curva "intensidad de corriente-potencial", (el potencial al cual se hace mención toda a lo largo de este trabajo es el definido con respecto al electrodo impolarizable, constituido por un electrodo de calomel saturado); curva que se obtiene en la electrólisis de la solución analizada cuando uno de los electrodos es prácticamente impolarizable, y el otro (un tubo capilar que gotea mercurio) de muy pequeña dimensión es esencialmente polarizable. A la inversa de lo que ocurre en el caso de medidas de conductividad, donde se tiende a hacer mínimo el fenómeno de polarización la célula polarográfica está aquí concebida de tal modo que el fenómeno de polarización sea el único en manifestarse. ¿Qué es la polarización?

El valor del potencial (que depende de la concentración de la solución) entre una barra metálica sumergida en una solución de sus iones, es el potencial reversible del sistema ó hemipila M/M^{n+} , siendo n la valencia del metal. Se encuentra el sistema $M^{n+} + nE \rightleftharpoons M$ en equilibrio y no hay pasaje de corriente. Si por cualquier causa se altera ese equilibrio; (aplicando un potencial al electrodo) prevalecerá una de ambas direcciones: $M^{n+} + nE \rightarrow M$, si el metal es cátodo y $M \rightarrow nE + M^{n+}$ si es ánodo.

Según las leyes de la cinética química en un proceso de varias etapas, la etapa más lenta fija la velocidad de reacción del proceso. Aquí tienen lugar las tres etapas principales: 1) pasaje de iones del cuerpo de la solución a la capa en contacto con el electrodo (difusión u otros procesos) 2) descarga de los iones en el electrodo para formar átomos. 3) pasaje de los átomos a la forma estable de la sustancia que se descarga. Si la etapa más lenta es la de difusión tiene lugar el fenómeno de "polarización de concentración." Esta puede disminuirse por agitación, temperatura; factores que aumentan la velocidad de

difusión.

El examen de los escalones presentados por las curvas polarográfica, permite la identificación y la determinación cuantitativa de los distintos elementos constitutivos de la solución a analizar. ^{Fig(1)} Se demuestra, en efecto, que el potencial al cual se produce el escalón corresponde a un elemento dado, es específico de ese elemento y no depende teóricamente de su concentración (ver en anexo I esta ley).

Ilkovic, ⁽²⁾ estableció la fórmula, mostrando la proporcionalidad de la intensidad de corriente, llamada corriente de difusión debida al elemento considerado (largo del escalón); con la concentración de éste, siempre que se respeten ciertas condiciones de orden experimental. (La corriente de difusión varía en efecto, con la frecuencia y la masa de las gotas de mercurio, con la temperatura, etc.) por otra parte para que esta fórmula sea aplicable, es indispensable que la concentración del elemento a determinar sea siempre muy pequeña, inferior a 0,01 N) (en el anexo I se justifica esta condición).

El esquema típico para obtener las curvas "corriente-voltaje" consiste (Fig. 2) en A: celda electroquímica: contiene la solución a ser analizada. B: Electrodo gotero de mercurio. C: pool estacionario de mercurio sirve de se-

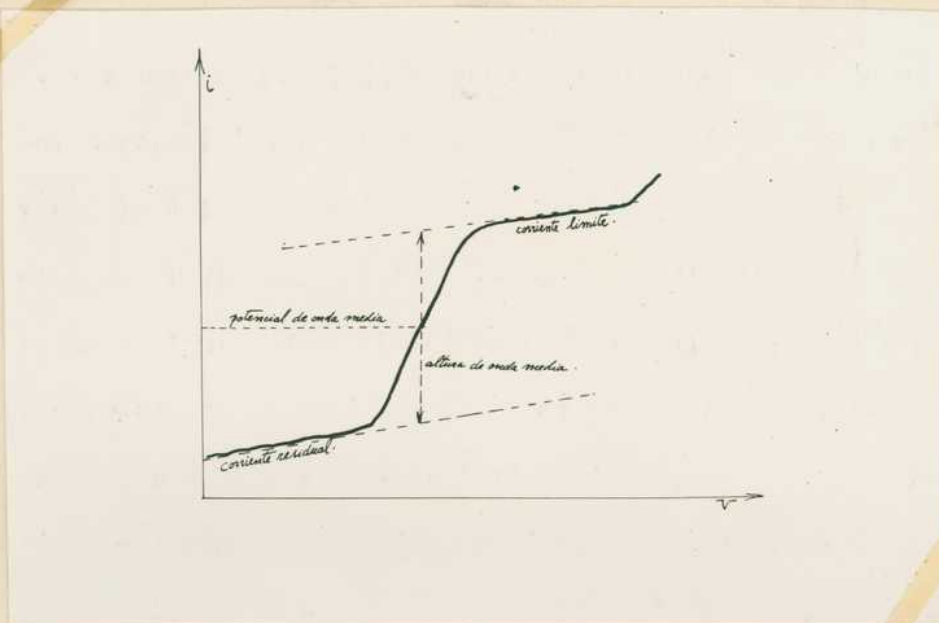


Fig. 4

gundo electrode. El electrodo gotero consiste en un tubo capilar de diámetro interno 0,05 mm, conectado a un reservorio de mercurio. Las gotas salen del capilar a una velocidad de una cada 2 a 4 segundos son muy pequeñas con diámetro máximo en el punto de soltarse de sólo 0,5 mm. La celda está conectada en serie con un galvanómetro calibrado G, a una batería y un reóstato del cual puede aplicarse a la celda desde cero a el máximo de fuerza electromotriz de la batería. Las curvas "corriente-voltaje" se obtienen aumentando gradualmente la

fuerza electromotriz aplicada y anotando la corriente indicada por el galvanómetro, (en los sistemas modernos como el aparato usado en este caso (Modelo Sargent XXI) el registro es automático por una pluma registradora sobre papel gráfico graduado especialmente). La corriente es ordinariamente muy pequeña, del orden 5×10^{-5} amperes. Dentro de las condiciones ordinarias de trabajo la exactitud del método polarográfico es del orden de más o menos 2% en el rango de concentración de 10^{-4} a 10^{-2} molar y cerca de más o menos 5% entre 10^{-5} y 10^{-4} molar. Considerando las concentraciones tan pequeñas este grado de exactitud es satisfactorio y es comparable muy satisfactoriamente con otros métodos microanalíticos.

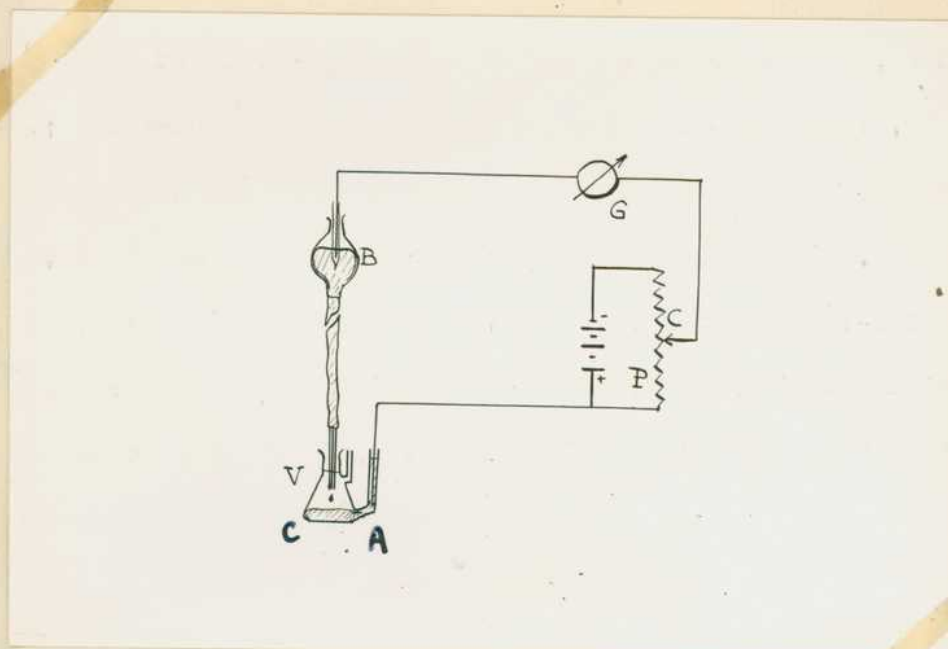


Fig. 2

Definiciones de términos corrientemente empleados en polarografía
así como la relación fundamental conocida por el nombre de "Fórmula de Ilkovic"

Fórmula de Ilkovic.- La ley que establece la proporcionalidad de corriente de difusión a la concentración se expresa por la ecuación:

$$i_d = K_n \cdot D^{1/2} \cdot C \cdot m^2/t^3 \cdot t^{1/6}$$

i_d : La corriente de difusión en micro-ampere.

n : La valencia del ión descargado.

D : Coeficiente de difusión de la sustancia reducible u oxidable.

C : Concentración en micromoles/lit.

m : Masa de mercurio en mgr./seg.

t : Tiempo necesario para la formación de la gota expresado en segundos.

K_n : Un coeficiente de proporcionalidad.

Constante de corriente de difusión.-

J.J. Lingane propuso este nombre a la cantidad $K_n D^{1/2}$ (que puede determinarse experimentalmente por la relación $\frac{i_d}{C m^2/t^3 t^{1/6}}$ a la cual es equivalente).

(J.J. Lingane y B.A. Laveridge demostraron que este coeficiente varía con m y t y notablemente que más allá de un cierto valor $m^2/t^3 t^{1/6}$ correspondiente a tiempos de formación de gotas inferiores a 1 segundo, la relación $\frac{i_d}{C m^2/t^3 t^{1/6}}$ aumenta muy rápidamente. Esto justifica el uso de capilares que den tiempos de goteo cercano a 3 segundos).

Corriente límite.- Corresponde al valor constante alcanzado por la intensidad de corriente luego de un escalón de descarga. En presencia de un exceso de electrolito indiferente, se denomina generalmente "corriente de difusión".

Potencial de media onda.- Es el valor del potencial característico del elemento descargado (no dependiendo de su concentración) que coincide con el punto de inflexión de la curva. En este punto la corriente tiene por valor la mitad de la corriente de difusión.

Corriente residual.- ó corriente de Condensador, la corriente que existe en ausencia del escalón de descarga, aumenta casi linealmente con la tensión aplicada.

Si bien la intensidad de esta corriente es débil, ella es suficiente

(en las altas sensibilidades) para concretarse sobre el registrador, como un trazo de recta muy inclinado sobre la vertical. Si los escalones se confunden con el se hace muy difícil (sino imposible en algunos casos) apreciar el largo de onda. Es por eso, que el aparato registrador lleva un compensador de corriente residual. Kalthoff y Langane admitieron que la corriente residual es el resultado de dos corrientes; una que proviene de la reducción de alguna impureza (O_2 por ejemplo) y de una corriente de condensador que proviene de la doble capa eléctrica que se forma en la superficie de la gota de mercurio; el valor de esta corriente residual puede ser calculado a fin de hacer la corrección necesaria en la determinación exacta del largo de los escalones de los elementos buscados. Sin embargo, se prefiere, generalmente, utilizar uno de los distintos métodos gráficos aconsejados, a menos que el polarógrafo tenga un compensador de corriente residual.

Máximas.- (fig. 3), Ciertos elementos dan al final de un escalón (gota) una anomalía momentánea que se traduce por un máximo. Es posible, usando cier-

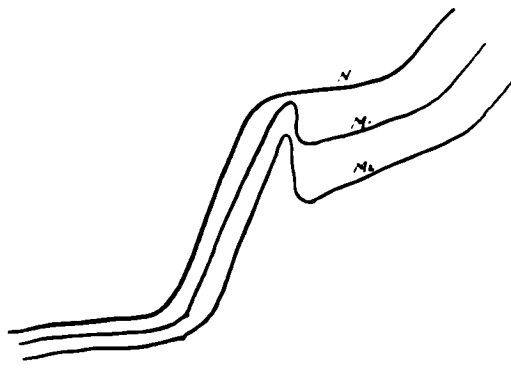


Fig 3

tos compuestos, modificar la tensión superficial, sobre la gota, tales como la gelatina, sacar, algunos colorantes, y suprimirlos.

Interpretación de máximas.- Heyrovsky⁽⁴⁵⁾, J. Actualités Scient. Ind., 1934, 1090 París, Especial para la aparición de un máximo es que la sustancia a reducir en el cátodo sea adsorbida simultáneamente por este, entonces según Heyrovsky, las corrientes de difusión que impelen hacia el cátodo las partículas del cuerpo reducible, están apoyadas por las fuerzas de adsorción del mercurio y obligan a alcanzar el electrodo mayor número de moléculas de las que son necesarias para la reducción dando origen en consecuencia, a un aumento anormal de la corriente. Como al elevarse la tensión, las fuerzas de adsorción

pierden poco a poco su actividad, se llega pronto a un punto en que por cesar las fuerzas de adsorción la intensidad retrocede al valor propio de la corriente de difusión pura. Según otra interpretación, la causa de los máximos se debe al temblor de la superficie del mercurio dentro de un determinado campo de tensiones, debido a ello se mueve la solución en contacto inmediato con el electrodo y no tiene lugar el empobrecimiento de la sustancia que es necesaria para obtener la corriente límite. Cuando cesa este efecto se vuelve a presentar la corriente normal de difusión. En la forma del máximo influye la velocidad de goteo del capilar, observándose en capilares rápidos, formas achatadas con caídas de corriente paulatinas, mientras que en los lentos se observa máximos agudos. La magnitud del máximo crece en general, al aumentar la concentración de la sustancia reducible y al disminuir la de los iones extraños, pues estos saturan en parte las fuerzas de adsorción del mercurio.

Método operativo.-

La sustancia a analizar se pone en solución muy diluida generalmente N/100 a N/10,000 en un electrolito-soporte indiferente, cuya concentración es varios centenares de veces mayor, y que no tenga iones susceptibles de descargarse entre el ámbito de potencial adoptado. La elección de este electrolito soporte constituye un problema individual para cada ión a analizar, así, por ejemplo, las sales de sodio, potasio, litio son generalmente empleadas cuando se trata de poner en evidencia metales muy electro-positivos (hay tablas que dan los valores de los potenciales de descarga de los elementos en diferentes medio). Para la determinación de elementos alcalinos y alcalino-térreos se utiliza como soporte sales de tetra-amonió suonio ó sales de tetra etil-amonió cuyo potencial de descarga es mucho más negativo. No hay que perder de vista el hecho que el electrolito soporte no debe presentar ión común ó ser capaz de formar un ión complejo con los elementos buscados. Cuando algunos elementos, (por ejemplo; sodio, potasio, litio, calcio y magnesio), tienen sus potenciales de descarga muy cercanos su determinación es muy delicada y a veces imposible, sus ondas pueden confundirse. Modificando el medio, haciéndolo neutro ó alcalino, es posible, a menudo, separar los escalones u ondas sucesivas y determinar así correctamente cada elemento. A veces se recurre a un complejo que, impidiendo que se descargue un elemento, hace posible en buenas condiciones la determinación del otro. El polarizador y el dispositivo de desenvolvimiento del diagrama

registrador siendo ambos movidos por motores sinérgicos, se deduce que el eje del tiempo del polarograma registrados, puede ser interpretado directamente en valores de diferencia de potencial aplicado; siguiendo el eje transversal, se puede leer el valor de las corrientes de difusión y deducir por cálculo la concentración del elemento; se prefiere generalmente operar por comparación utilizando por ejemplo uno de los métodos siguientes:

a) Se establece para cada elemento buscado y para un capilar dado la curva de ondas para distintas concentraciones; este método tiene el inconveniente de no ser utilizable sino operando siempre en idénticas condiciones.

b) Luego de una operación sobre la onda a analizar, se agrega a esta una cantidad conocida de elemento buscado, y se vuelve a analizar, del largo de los dos escalones se deduce la concentración del elemento (es evidente que las condiciones de medida no deben cambiar durante las dos operaciones, altura de carga de mercurio, temperatura, etc.)

BIBLIOGRAFIA

Sobre polarografía en general.-

Balthoff, Lingane. "Polarography" 1941. New York, donde se reúnen todos los conocimientos actuales sobre el problema, se recopilan casi todos los trabajos publicados hasta la fecha.

Una buena recopilación de citas bibliográficas puede encontrarse en "Bibliography of the polarized Dropping Mercury Electrode" Leeds and Northrup Co. Philadelphia.

Los trabajos de los primeros químicos que abordaron el problema (Heyrovsky, Ilkovic, etc.) se encuentran casi todos en la "Collection of Czechoslovak Chemical Communications".

La bibliografía en publicaciones argentinas solo cuenta con los trabajos de R. Vanossi en "Anales de la Sociedad Científica Argentina", 1938, 12, 66, y Chemia, 1940, 11, 79.

Otros trabajos tenidos en cuenta han sido: "El polarógrafo" de G. Semerane 1933. "Symposium on polarography" de la "The Soc. Public Analysts and Other Analytical Chemists", 1946.

DESCRIPCION DEL APARATO USADO

I N T R O D U C C I O N

El polarógrafo Sargent, modelo XXI, produce un registro continuo y visible, de la curva corriente-voltaje, la cual es característica de una solución sometida a electrolysis entre un electrodo a gotas de mercurio y un electrodo de referencia. Se halla provisto de controles que permiten la selección del rango de voltaje óptimo en donde se encuentra la porción útil de la curva; y de ajustes de la sensibilidad de la corriente desarrollada. Al efectuar una regulación exacta, es posible controlar la forma y medida de la curva. Así mismo está previsto de modo de:

1) poder establecer una F.E.M. constante a través de la celda electrolítica y registrar la curva de corriente-tiempo, en un análisis de titulación amperométrica, o en estudios de tiempos de reacción; 2) amortiguar las oscilaciones causadas por la separación y crecimiento de las gotas de mercurio y 3) prevenir el registro de pasos innecesarios en la curva a través del "compensador". Una F.E.M. con un cambio de paso constante es desarrollada por medio de un registro y puente rotatorio. La corriente pasa a través de la celda electrolítica bajo la imposición de ésta F.E.M. (a través de la celda), midiendo IR de la gota en una resistencia conocida, colocada en serie con respecto a la celda, por medio de un registrador potenciométrico.

A continuación se detalla una descripción de cada uno de los controles del polarógrafo (Foto copias Figs. 4 y 5).

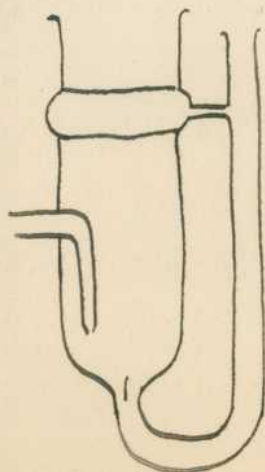


Fig. a.

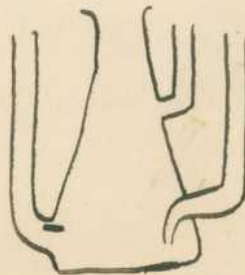


Fig. b.



Fig. 4

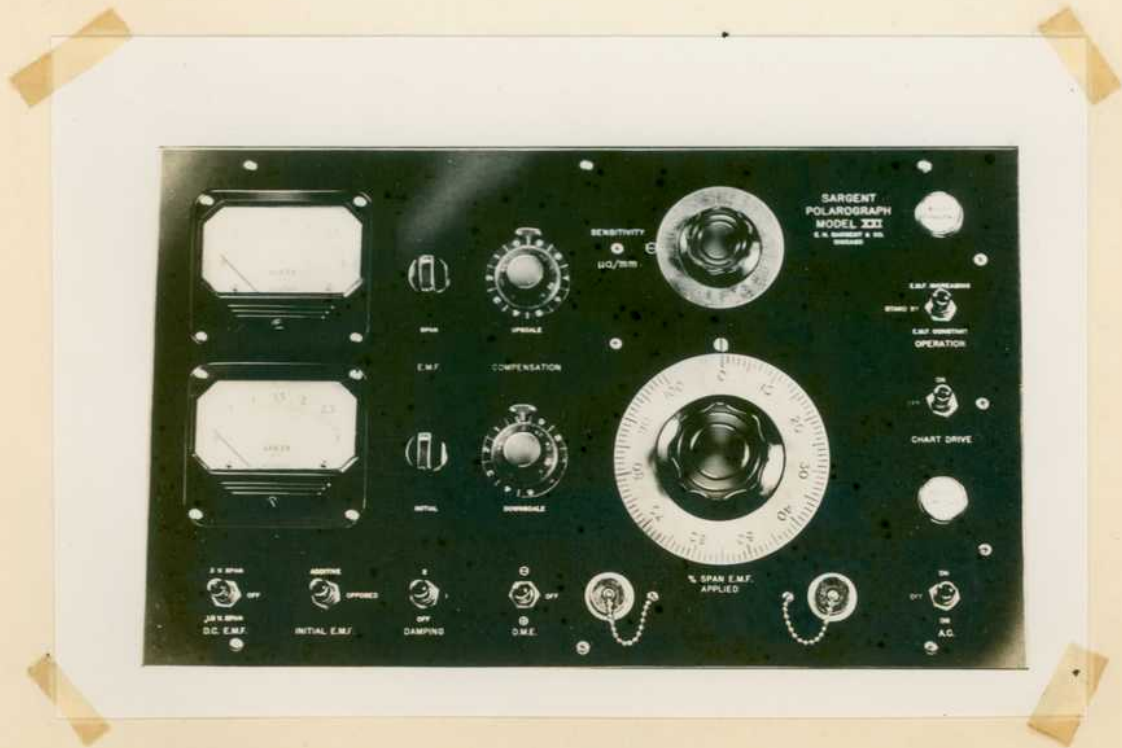


Fig. 5

Controles de operación.-

Los controles que dan potencia al aparato A.C. en línea vertical se encuentran en el lado derecho del panel. Los demás controles están en el circuito de batería D.C.

Chart-Drive-Switch.- Controla el movimiento del papel gráfico.

- a) "E.M.F. Increasing" se mueve la pluma registradora puente de conducción de operación y el papel gráfico, si "Chart Drive Switch" está en posición "on".
- b) "Stand By.- La pluma inscriptora, el conductor del papel gráfico y puente de conducción no funcionan, si el registro amplificador está en "on".
- c) "E.M.F. Constant".- Se mueve la pluma y el papel registrador si "Chart Drive Switch" está en "on". El puente no se mueve. La F.E.M. a que se refiere en los controles es el voltaje impuesto a la célula electrofítica. Así por ejemplo si el control está en la posición "E.M.F. Constant", el puente no opera, y se aplica así un voltaje fijo, seleccionado a mano y puesto en el puente imprimido a la célula para titulaciones amperométricas, estudios de velocidad de reacción.

Controles D.C. E.M.F. (Switch) (Entería) dan poder a los controles Span y Initial E.M.F. y tienen tres posiciones siguientes:

- a) "3 V. Span" un máximo de cerca de 3 volts de D.C. El voltaje mínimo para el Span es de 2,0 volt.
- b) "Off" el poder D.C. está desconectado.
- c) "1,5vV. Span" un máximo cerca de 1,5 y 3 volts de D.C. para los controles Span y Initial respectivamente. El voltaje span mínimo es cerca de 0,5 volt.

Control Span.- Fija el voltaje Span a ser atravesado por el puente. El voltaje Span es indicado en el voltímetro Span a la izquierda del control.

Initial Control.- Indica el voltaje inicial aplicado.

Initial E.M.F..- Switch tiene dos posiciones.

- a) "Additive".- El voltaje span es desplazado en sentido negativo por una cantidad igual al voltaje inicial.
- b) "Opposed".- El voltaje Span es desplazado en sentido positivo por una cantidad igual al voltaje inicial.

Relación entre Span, Initial y Initial E.M.F.-

Initial E.M.F. "Additive".- El span del puente es atravesado desde (voltaje inicial) hasta - (Span voltaje más voltaje inicial).

Initial E.M.F. "Opposed".- El span del puente es atravesado d

taje inicial) hasta (voltaje inicial - Span voltaje).

Control Upscale Compensation.- (Control de escala ascendente). Introduce una F.E.M. de refuerzo, bajo un aumento, cambiando la posición cero de la pluma registradora con respecto al papel registrador. Este control consiste en un potenciómetro helicoidal que gira una decena de veces y un dial adjunto que permite la reproducción exacta del control. El dial tiene una escala inferior graduada en 100 divisiones, que indica la fracción en que ha girado el potenciómetro y una escala exterior indicando cuantos giros ha efectuado.

Control Downscale Compensation.- (Control de compensación de escala descendente). Introducemos F.E.M. que bajo un aumento, desvía la posición del cero de la pluma registradora en forma descendente, con respecto al gráfico. Este control es idéntico en construcción al "Upscale" descrito en la sección precedente.

Damping Switch.- (Interruptor de amortiguación). Reduce la amplitud de las oscilaciones del polarogram, causadas por la separación y crecimiento de las gotas de mercurio. Tiene tres posiciones:

- a) "Off" no amortigua.
- b) "1" Esta posición se usa para amortiguar cuando el grado de sensibilidad es de 0,005 a 0,060 microcampere/mm.
- c) "2" Se usa cuando el grado de sensibilidad se encuentra entre 0,060 a 1,500 microcamp/mm.

Polarity Switch.- Controla la polaridad de los bornes de la célula electrofítica. Las posiciones del interruptor tienen la siguiente significación:

- a) "0": el electrodo a gotas es el cátodo.
- b) "Off" la celda electrofítica está desconectada del circuito.
- c) "0" el electrodo a gotas es el ánodo.

Sensitivity Control.- (Control de sensibilidad).

Ajusta el registro de sensibilidad sobre un rango de 20 valores fijos los cuales pueden leerse directamente, en microcampere/mm, en el eje de corriente del gráfico, usando como referencia el índice de la izquierda del dial.

% Span E.M.F. aplicada.- (Dial del Puente. El cual está conectado al eje del puente conductor e indica el % del Span voltaje que ha sido atravesado por el puente en un momento dado. El dial del puente es usado para colocar en el un valor dado ó para volver el puente a cero al comienzo de un registro. Este puente posee un interruptor límite, que interrumpe el poder al puente con-

ductor, detiene la pluma registradora y el conductor del papel gráfico; al final de una rotación, permitiendo el registro amplificador evitar un cierre manual al terminar un registro.

Conjunto del electrodo gotero de mercurio.-

Está colocado el conjunto de electrodo gotero, fije a una pared de modo de evitar vibraciones que producirían aberraciones considerables en los polarogramas.

Consiste típicamente de un reservorio de mercurio conectado a un tubo de neopreno en cuyo extremo se inserta el capilar.

El mercurio para el uso polarográfico debe ser muy puro; con ese objeto se lavó con H_2O_2 10% en frascos lavadores de Walf, por burbujas de aire para facilitar el renovación del mercurio, luego es secado y filtrado. Se procede a su destilación al vacío, esta operación se repite tres veces.

Medida de corriente de difusión y potencial de onda media.-

Para poder interpretar cuantitativa y cualitativamente un polarograma, es necesario medir la corriente de difusión y el potencial de onda media. En bibliografía se encuentra muchos métodos para efectuar dicha medida; y en particular la determinación de la corriente de difusión ha sido sometida a considerables discusiones. Para buenas interpretaciones teóricas de estas mediciones se pueden consultar:

- 1.- "Polarography" Halthoff-Lingane, publicado por Interscience, 1946, pag. 55. y 144.
- 2.- "Examination of absolute and comparative methods of polarography analysis." J.K. Taylor, Analytical Chemistry, 1947, 19, 366/
- 3.- "The polarographic method of analysis." O.H. Miller, Mack Printing Co. J. Chem Ed., 1941, 93.

El siguiente ejemplo de medición de la corriente de difusión y del potencial de onda media, es un caso simple usado principalmente para ilustrar la aplicación de la corrección de los potenciales de onda media observados. Para efectuar estas mediciones se procede como se indica a continuación: (Fig. 6).

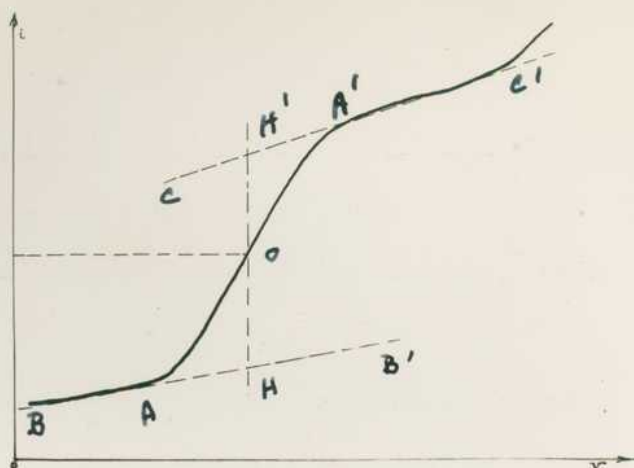


Fig. 6

Se traza las líneas BB' y CC' prolongación de las corriente residual y de difusión respectivamente. Luego se traza AA' ; dividiendo en la mitad, por el punto medio se traza HH' . BH es el potencial de onda medio si en B es V inicial = 0 volt. y HH' es altura de onda media.

La corriente de difusión (microampere) = altura HH' en milímetro multiplicado por G grado de sensibilidad.

La concentración correspondiente a la corriente de difusión puede ser leída en una curva standard de concentración-corriente de difusión, previamente preparado. De igual modo se puede evitar el cálculo de la corriente de difusión usando una curva de calibración de concentración-altura, en mm. El cálculo directo de la concentración por medio de la ecuación de Ilkovic por el método de Lingane requiere la determinación de la corriente de difusión. El potencial onda media observado, es proporcional a la longitud BH sobre la longitud total del eje de los voltios, (esto es cuando se usa el papel original del polarógrafo sino se mide directamente BH en milímetros) 13.500 pulgadas, multiplicado por el voltaje Span y restado por el voltaje inicial, es decir:

Initial E.M.F. "Additive"

$$E(\text{medio observado}) = \frac{-BH (\text{pulg.}) \times \text{voltaje Span} - (\text{voltaje inicial})}{13.500}$$

Initial E.M.F. "Opposed"

$$E(\text{medio observado}) = \frac{-BH (\text{pulg.}) \times \text{voltaje Span} + (\text{voltaje inicial})}{13.500}$$

Para obtener el potencial de onda media verdadero, el potencial de onda observado, debe ser corregido por la IR de las gotas a través de la re-

adicional (en serie) de la posición "2" del Damping Lewitch cuando éste es usado, la I de la IR total de las gotas, puede ser calculada, multiplicando la altura en mm. del punto H hacia arriba del eje cero de corriente, por el grado de control de sensibilidad dado. El valor de R se da en la tabla n° 1 del Catálogo del Polarógrafo. Durante el trabajo en ningún caso fue necesario utilizar el Damping en posición "2" para determinación del potencial de onda media.

El papel gráfico, está dividido, a lo largo del eje de corriente en 280 mm. con una línea gruesa cada 10 m. y líneas más fuertes cada 50 mm. para facilitar el cálculo de la corriente de difusión. El eje de voltaje tiene una longitud de 15.500 pulgadas, correspondiendo a una longitud del gráfico de una pulgada por minuto, por rotación del puente. Este eje se encuentra dividido en 100 intervalos de 0,1550 pulgadas cada uno, con líneas más fuertes cada 10 intervalos. En un mismo gráfico se pueden registrar varios polarogramas, utilizando la perilla que se encuentra a la derecha del eje de alimentación del registrador y la perilla grande del enrollado del gráfico; se giran simultáneamente para evitar que se desprenda el gráfico.

ANEXO DE LA PRIMERA PARTE

Fórmula de Ilkovic, potencial de medid-gota, Corriente límite:

Examinando lo que ocurre en el electrodo de gotas de mercurio al analizar una solución de una sal metálica:

La gota de mercurio está, para esta determinación, polarizada negativamente, los cationes metálicos irán a descargarse fijando n electrones. Pasan entonces al estado de átomos, formándose así una amalgama con el mercurio del cátodo, lo que provocará una polarización:

$\overline{\eta}_a$: potencial del electrodo impolarizable.

$\overline{\eta}_e$: potencial del electrodo a gotas.

E : tensión aplicada.

$$E = \overline{\eta}_a - \overline{\eta}_e.$$

Si el potencial del electrodo impolarizable se toma como origen de potenciales:

$$1) \quad E = - \overline{\eta}_e = \frac{RT}{nF} \log. K. \frac{C_a}{C_0}$$

C_a : concentración del metal en la amalgama.

C_0 : concentración del ión metálico en la capa líquida que rodea la gota.

n : la valencia del ión descargado.

K : una constante característica del metal.

(En rigor se debiera escribir esta fórmula en términos de actividades y no de concentraciones. Como en polarografía se utiliza siempre soluciones diluidas, esta notación es admisible). Las leyes de la electrólisis permiten escribir:

$$2) \quad n^2 C_0 = I.$$

I : valor medio de la intensidad de corriente durante la formación de la gota. Por otra parte esta corriente I , debida a la difusión, es proporcional a la diferencia de concentraciones e en el seno mismo del líquido y C_0 en la capa inmediata vecina a la gota (los iones van a descargarse en el cátodo bajo la acción de dos fuerzas: una de migración, debida al campo eléctrico y función de la caída de tensión a través de la solución; la otra de difusión. Por adición de un exceso de un electrolito indiferente se disminuye considerablemente la caída de tensión, y elimina así la corriente de migración. No subsiste entonces más que la corriente de difusión regida por la ley de Ilkovic).

$$3) \quad I = K'' (C - C_0)$$

De las ecuaciones 1), 2), y 3) se deduce:

$$4) \quad \sqrt{c} = \frac{-RT}{nF} \log K_0 \frac{K''}{K'}$$

Este valor es característico del elemento descargado dependiendo de la afinidad del metal por el mercurio y de los coeficientes de difusión del átomo en la amalgama, y del ión en la solución. Es de notar que este punto de inflexión donde la corriente es mitad de la corriente de difusión coincide con el punto de onda media.

Constante de corriente de difusión.-

Se vió en las definiciones que J.J. Lingane propuso este nombre para representar la relación:

$$\frac{I_d}{C m^{2/3} t^{1/6}} = K_n D^{1/2}$$

Siendo este valor teóricamente constante para un elemento particular, se concibe que sea posible calcular la concentración de la solución en ese elemento, a partir de corriente de difusión, la masa de mercurio que goteo y la frecuencia de las gotas, hacen en una palabra, de la polarografía, un método de determinación no relativo sino absoluto. En efecto J.J. Lingane y B.A. Loveridge precisaron los límites en los cuales este coeficiente podía ser considerado como constante. La curva (Fig. 7), de el valor de este coeficiente en función del término $m^{2/3} t^{1/6}$.

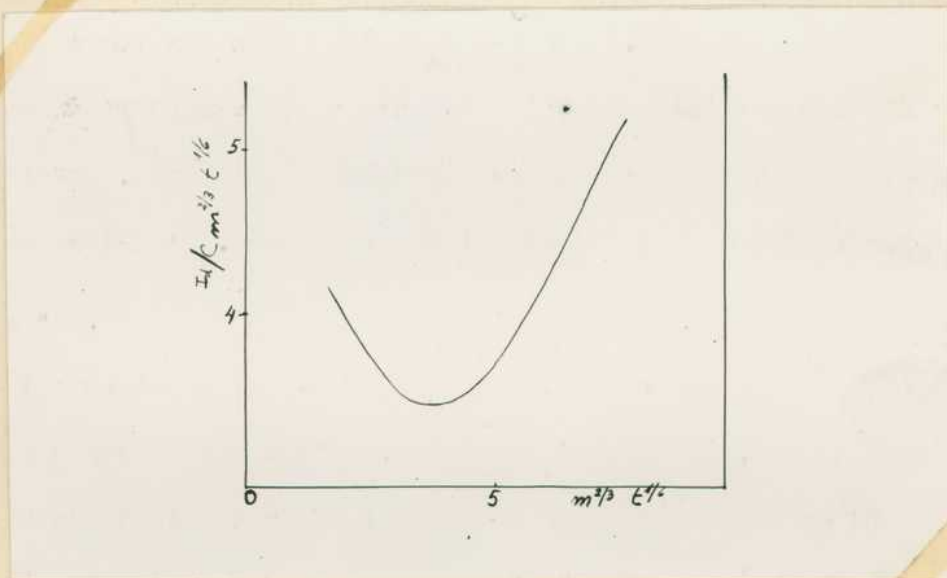


Fig. 7

Se ve muy netamente que alrededor del valor 5 por ejemplo para $m^{2/3} t^{1/6}$, corresponde a un intervalo de tiempo t de 0,8 segundos, más o menos, la relación

$\frac{I_d}{c \sqrt{t}}$ varía muy rápidamente.

Resulta de aquí, que las determinaciones polarográficas precisas y reproducibles no pueden ser hechas con electrodo de gotas, sino teniendo tiempo de formación de gotas superior a dos segundos.

P A R T E E X P E R I M E N T A L

La determinación polarográfica de sodio se basa en la medición final del íon uranilo, del precipitado acetato de uranilo, sodio y sime en medio alcohólico.

Se eligió este método, pues permite el dosage de 10 a 100 de sodio, además permite dosar el sodio en presencia de potasio, ambos tienen potencial de onda media muy cercanos en electrolito soporte de bases tetrametil ó tetraetil amonio (-3,11 para Na^+ ; -3,13 para K^+) y su determinación directa es imposible.

- (31) *Colloids, China, Chem., 1936, 78, 446.*
- (32) *Analyst, 1947, 19, 372.*
- (30) *Z. Anal. Chem., 1935, 92, 321.*
- (32) *J. Am. Chem. Soc., 1938, 60, 1770.*
- (11) *Ind. Eng. Chem. Anal., 1932, 638, 14, 1945, 17, 724.*
- (39) *Rec. Trav. Chim., 1925, 44, 600*
- (38) *Angew. Chem., 1935, 48, 685.*
- J. Biol. Chem., 1931, 95, 171.*
- J. Am. Chem. Soc., 1928, 50, 1625.*

Se tomó como técnica de trabajo, la expuesta en la tesis del B. Gonzales (1946) "Estudio general del método polarográfico-aplicación a la determinación de pequeñas cantidades de sodio." (40)

La escala de trabajo apropiada, para este método es de 50 a 250 γ de Cl_2Ca (ó sea 20 a 100 γ de sodio) puede prolongarse hacia mayores cantidades (500 γ Cl_2Ca) pero hay que trabajar con menor sensibilidad en el registrador ó aumentar el volumen de electrolito soporte. Puede trabajarse con cantidades menores de 20 γ de sodio con un aumento creciente del error que de un valor menor de 10%, llega a un 15-20% para cantidades de 8-10 γ de sodio.

Cantidades hasta 2,5 mgr Cl_2Ca no interfieren, ni tampoco cantidades hasta 1 mgr. de Cl_2Ca . En ambas cantidades se encuentran conjuntamente en la solución, los límites máximos dependen de la cantidad de sodio presente. Si es mayor de 40 γ (100 γ Cl_2Ca) son tolerables las cantidades mencionadas. Es un método especialmente apto para el trabajo en serie y debido a la pequeña cantidad de sodio que puede determinarse, permite trabajar sobre pequeña cantidad de

muestra = . Además con respecto al método común de determinación de sodio, el gasto de reactivo es de 1/10 para cada determinación.

Técnica empleada.- En tubos pequeños (4 ml. capacidad) de característica (Fig. 10) se coloca 0,1 ml. de disolución en agua de cenizas de líquido alantoides y agrega 1,5 ml. de reactivo, filtrado inmediatamente antes de usarse agitando al final; por rotación del tubo, medio minuto. Se deja en reposo durante una hora, al cabo de la cual se centrifuga 5 minutos a 2.000 revoluciones por minuto. Se drena sobre embudo con papel de filtro y lava con 1 ml. de alcohol saturado de acetato triple con ayuda de una varilla de vidrio finamente estirada. Se vuelve a centrifugar cinco minutos a 2.000 r.p.m. y repiten las operaciones anteriores, lavando nuevamente con 1 ml. de alcohol saturado de acetato triple y centrifuga nuevamente.

Se repiten las operaciones anteriores y se lava esta vez con 1 ml. de éter agitando por rotación del tubo sin emplear varilla, pues el precipitado en medio éter se ~~añade~~ ^{añade} fácilmente. Se centrifuga nuevamente y decanta el éter pero sin drenar porque hay peligro de corrimiento del precipitado. Se seca la boca del tubo con papel de filtro y se deja al aire un cuarto de hora ó se coloca cinco minutos en estufa a fin de evaporar todo el éter. Se añade entonces 2 ml. $\text{ClH } 0,5 \text{ N} + 4 \text{ ml. H}_2\text{O}$ que hacen de solución base y disuelve el precipitado completamente, se hace la determinación polarográfica, eliminando previamente el oxígeno por pasaje de H_2 de 2 a 5 minutos.

Reactivos.- Backer-Kalthoff. J. Am. Chem. Soc., 1931, 53, 1626.

A	Uranil acetate $5\text{H}_2\text{O}$	10 gr.
	Acético 30%.....	8 gr.
	H_2O hasta.....	65 gr.
B	Zn. Acetate $5\text{H}_2\text{O}$	30 gr.
	Acético 30%.....	8 gr.
	H_2O hasta.....	65 gr.

A y B se disuelven por calentamiento, se mezclan y deja estar por 24 horas. Se filtra el precipitado y se obtiene una solución saturada con la sal triple debido al contenido de sodio de los reactivos.

Cuando se guardan en Pyrex los reactivos no se enturbian luego de mucho tiempo. $(\text{UO}_2)_3 \text{ Zn } 3\text{H} (\text{CH}_3\text{COO})_9 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, el reactivo no se filtra en el momento de usar.

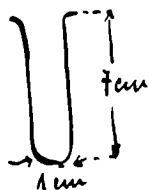


Fig. 10

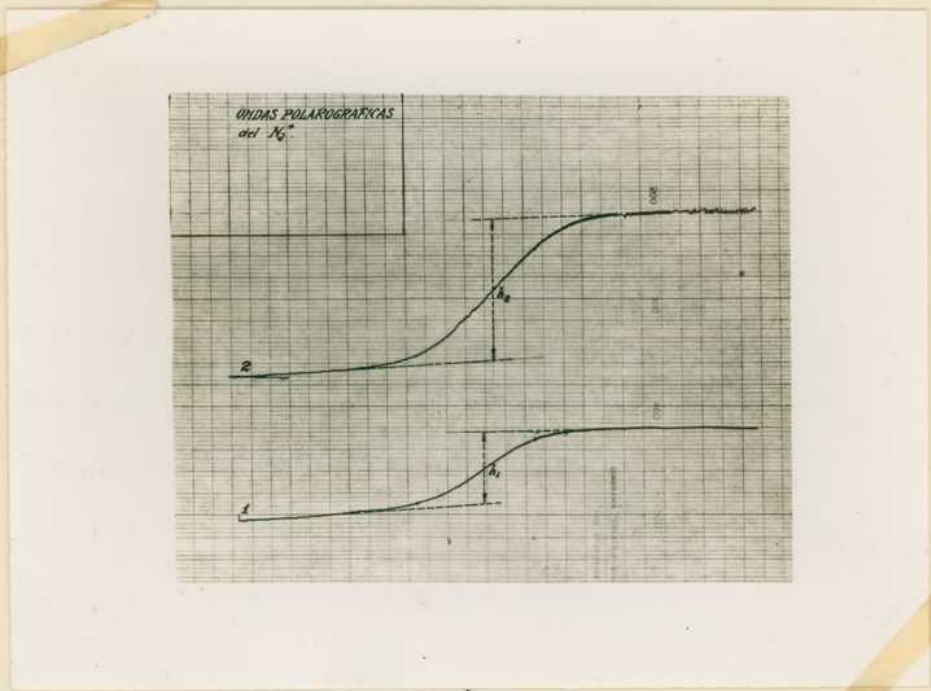


Fig. 9

Las condiciones para obtener el polarograma para sodiosson:

Solución fondo: ClH 0,5 N - 2ml. H₂O - 4 ml.

V₁: 5 volt - Span: 1,2 volt (3 V Span). Adittive.

Sensibilidad: 0,1 D: 2 temperatura: 26°C.

se usó en calibración y determinaciones posteriores idénticas condiciones. El potencial de media onda del sodio en ClH 0,5 N 0,6 volts. Vs. E.C.S. Fig. 9

Verificación de la proporcionalidad entre cantidad de sodio y corriente de difusión del ión uranilo del precipitado.

Se hicieron con este motivo determinaciones con soluciones puras de ClNa precipitando según la técnica propuesta, sobre un volumen de 1 ml. conteniendo cantidades desde 20 γ ClNa a 116 γ ClNa. (Fig. 8).

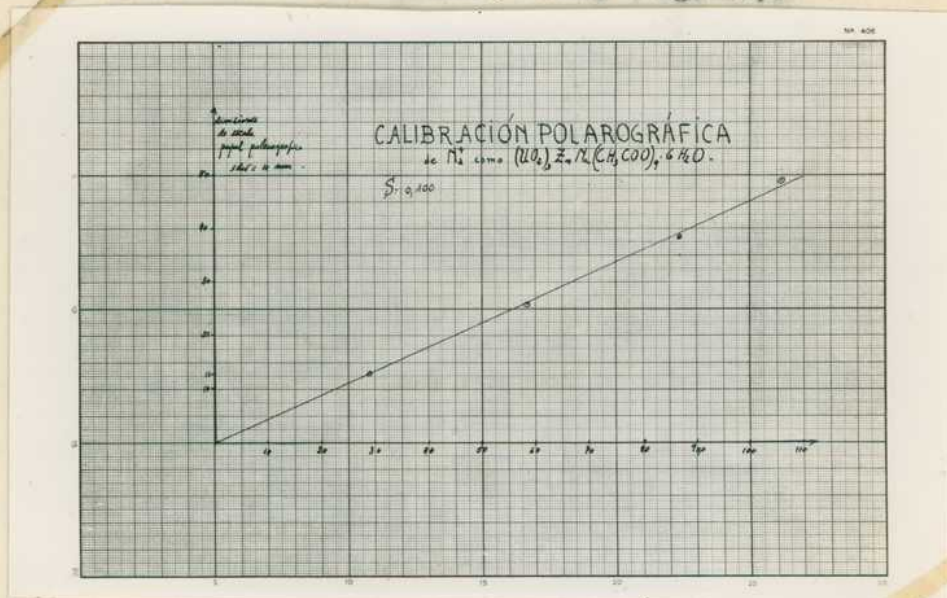


Fig. 8

La determinación de sodio y potasio⁽²⁷⁾ se hizo en solución fondo de Br N (et)₄ 0,1 m (purificado previamente por dos recristalizaciones en alcohol)

(37) Anal. Chem., 1942, 19, 372.

(41) Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 1942, 14, 473; 1945, 17, 724.

(38) Anglev. Chem., 1935, 48, 683.

(32) J. Am. Chem. Soc., 1938, 60, 1770. 64, 1277, 1942.

Condiciones operatorias.-

4 ml. Br N (et)₄ 0,1 m. temperatura del baño termostático: 26°C.

burbujeo de N₂: 3 minutos.

V₁: 1,8 volts. Span 1 volt (3 V Span) Adittive.

Sensibilidad: 1 - D:1.

Para la calibración se procedió de modo de mantener la relación de concentraciones de sodio, potasio en la relación 1/10 que es la del líquido alantoides-normal.

Se agregó, al calibrar 0,1 ml. $CaCl_2$ 0,1 m + 0,01 ml. $ClKOO$, 1 m.

(Figs 11 y 12.)

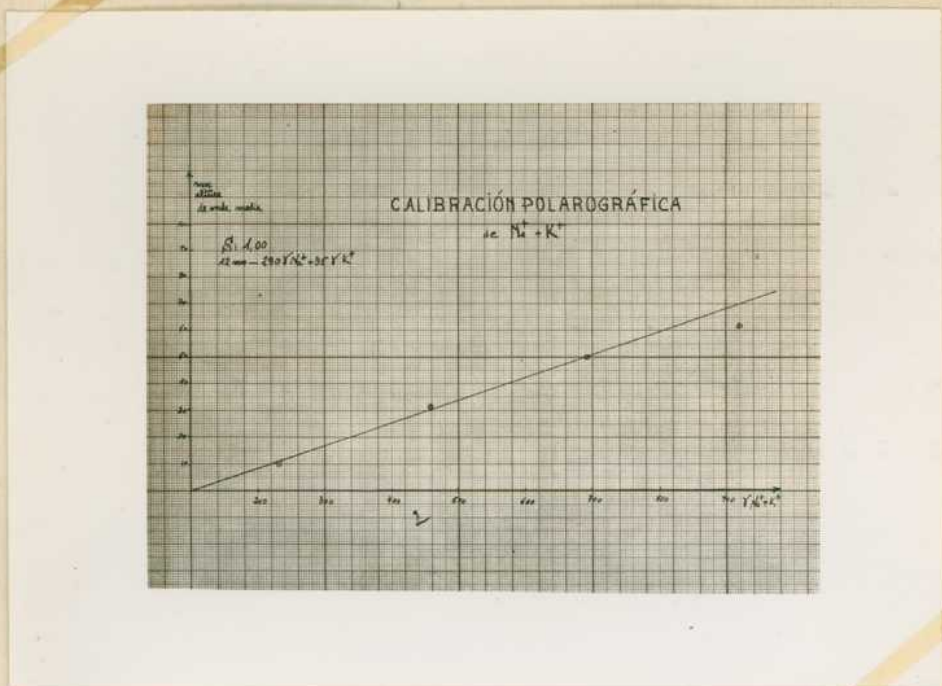


Fig. 11

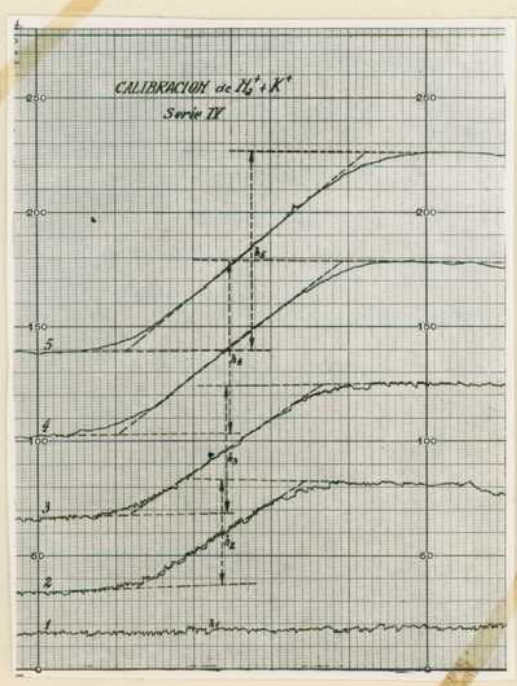


Fig. 12

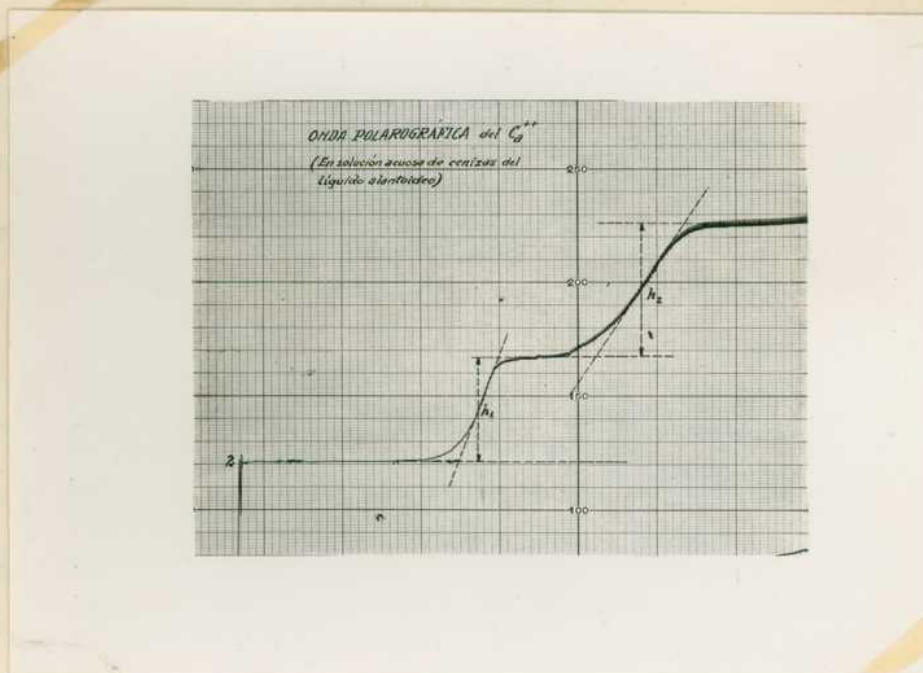
En la determinación de Ca^{2+} se siguió la técnica del J. Biol. Chem., 1943, 147, 706. (34)

Sobre la disolución de las cenizas (0,4 ml ml.) de líquido alantoides en agua, se utilizó la técnica de determinación de Gunther (Cohen- I.M. Kolthoff

El calcio puede precipitar dentro de un rango de concentración 0,001 a 0,01 M. Como picrolonato de calcio el exceso de reactivo se determina polarográficamente sin filtrar la solución. El método es preciso dentro de 1 a 2 %. El método da buenos resultados en presencia de relativamente grandes cantidades de sodio, potasio amonio, magnesio, sulfatos y fosfatos en las soluciones de

10 a 100 veces mayor que la concentración de calcio. Durante todas las determinaciones se hizo el cálculo de la altura de media onda por standard interno, mediante el uso de la misma solución stock guardada en frascos Pyrex.

Acido picrolónico. Comportamiento polarográfico.- (Fig. 13) Es necesario el uso de un supresor de máximo, el canfor es especialmente útil, mientras la gelatina y timcl lo son menos. En presencia de ácidos el canfor no es buen supresor siendo la gelatina mucho más eficiente a este respecto. En buffer de acetato pH 3,6 a 3,8 la presencia de gelatina no es necesario para obtener corrientes de difusión bien definidas. La altura de onda a un potencial de



-1,2 volts es proporcional a la concentración de picrolónico en ausencia de gelatina y no es afectada por cambios en la concentración de acetato buffer ó de electrolito indiferente. Se precipita el calcio en buffer de acetato y en presencia de cloruro alcalino que sirve para definir el potencial anódico. Como el picrolonato de calcio cristaliza lentamente, pueden ocurrir errores considerables cuando la concentración de alcalinos es muy alta.

El picrolonato de litio es el más soluble de las sales alcalinas, se usó la siguiente mezcla buffer: 1 M LiCl, 1 M ácido acético; 0,125 M acetato de litio (pH: 3,6 a 3,8). Esta mezcla se diluyó cerca de diez veces en el medio de reacción a utilizar. Desde el punto de vista analítico es de significado que la solubilidad del picrolonato de calcio se hace despreciable cuando el exceso de ácido picrolónico es igual ó mayor que $1,5 \times 10^{-2}$ M. El exceso de picrolónico usado fué del orden de 1 a 2×10^{-3} M.

Procedimiento.

Conociendo aproximadamente el contenido de calcio de la solución a determinar (tabla de Kanyo-Koedhan⁽¹⁾ "Embriología química" 3, pag. 1285), se añade solución buffer (1 M ácido acético + 0,125 M acetato de litio + 1 M LiCl) de modo que quede el buffer diluido aproximadamente diez veces. Se añade una cantidad de ácido picrolónico standard 0,01 M a 5 ó 10 ml. de la muestra de modo que la concentración de picrolónico, luego de precipitación completa sea, al menos, 0,001 M. La cantidad de picrolónico añadida no debe ser mayor de cuatro veces M con respecto a la del calcio. Se dejan las muestras una noche en hielo cuando la concentración de calcio es igual ó menor de 5×10^{-5} M.

La concentración residual del ácido picrolónico se determina sin filtrar, polarografiando a 25°C a potencial catódico de -1,1 volt. respecto al electrodo de calomel saturado ó cuando se usó pool de mercurio anódico a fuerza electromotriz aplicada de -1,2 volt.

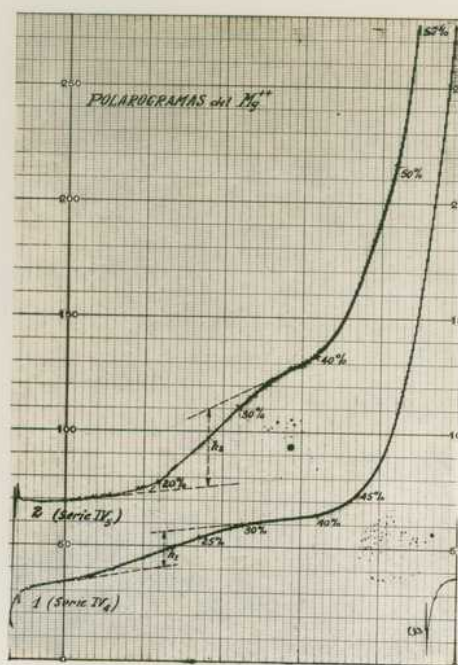
Se utilizó el método de standard interno para determinar la altura de onda media.

El magnesio da curvas muy poco definidas en solución de sales de tetrametil amonio como electrolito soporte.

(21) (Kizura G. Collee. Czech. Chem. Com., 1932, 4, 492, 1929, 1, 19.

(22) Angew. Chem., 1935, 48, 683.

Además siendo su potencial de onda media en solución soporte de $\text{ClN}(\text{CH}_3)_4$ ó $\text{HON}(\text{CH}_3)_4$ 0,1 M muy cercano al del calcio, sodio y potasio no permite su determinación sin previa eliminación de estos cationes. Las ondas polarográficas del magnesio en esa solución base muestra máximos pronunciados y una gran corriente de difusión que se atribuye a la evolución de H_2 , que resulta de la deposición rápida de H_2O en la amalgama Hg/Hg que se forma. Como el 8-hidroxiquinolato ha demostrado ser de gran valor para la determinación de magnesio (Jae. J.A. and Lover. L.A. Org. Anal Reagent[®] New York, Mann Wiley[®] Co., 1941), se adoptó el método basado en la reducción polarográfica de la 8-hidroxiquinolina⁽³³⁾⁽³⁵⁾ este reactivo se reduce en el electrodo gotero de mercurio y la corriente de difusión es proporcional a la concentración. (Fig. 14).



Reactivos.-

Mezcla buffer de fosfatos de pH 7,6; 3,33 M con respecto a ambos, fosfato disódico y fosfato monosódico.

Solución de lavado hecha por saturación de 95% alcohol con magnesioidroxiquinolato y filtrando justo antes de usar.

Solución A.- Preparada por dilución de 2 ml. de 1% gelatina (Eastman's sin cenizas) en solución, y 30 ml. de 0,1 N ClH a llevado: a 100 ml. con la solución de fosfato buffer.

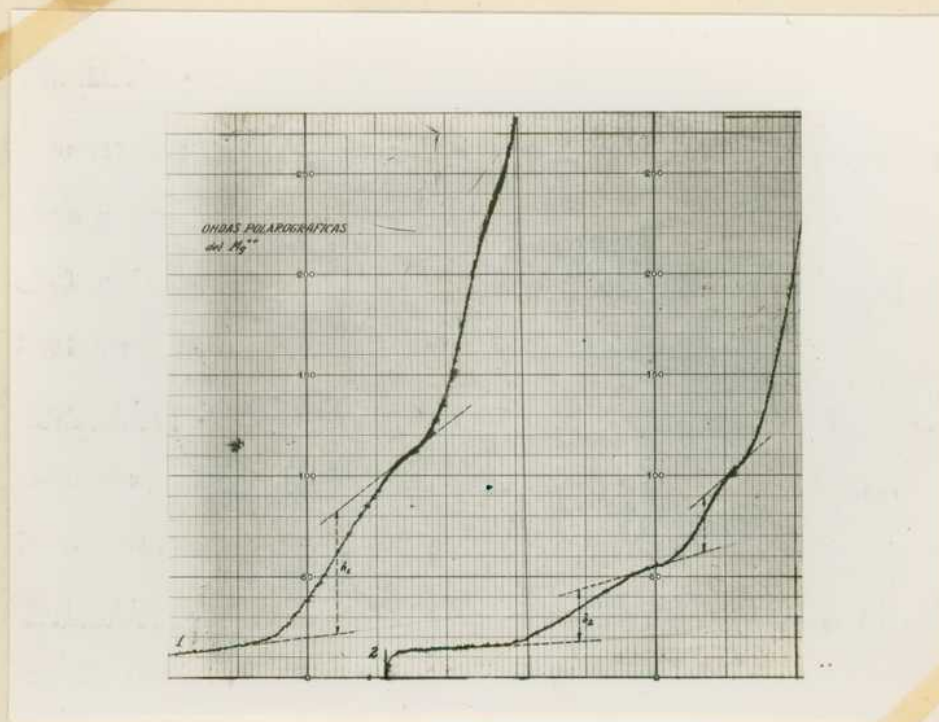
Solución B.- Preparada por dilución de 2,7 ml. de 1% gelatina, a 100 ml. con fosfato buffer.

Las soluciones A y B deben ser hechas antes de usar ó guardadas en un refrigerador, pues la gelatina favorece el crecimiento de microorganismos.

Procedimiento.- A cada una de las muestras a analizar se añadió 1 ml. $ClNH_4$ 2 N y 0,5 ml. $HONH_2$ 6 N (método ³⁵) de ebullición y se añadió por gotas 0,7 ml. de una solución 10% 8hidroxiquinolina en 95% alcohol y se deja enfriar. Se recalienta nuevamente y añade otra porción de 0,7 ml. cerca del punto de ebullición; esto se repitió una tercera vez. Se dejó a temperatura ambiente una hora, luego centrifugó y aspiró el sobrenadante con pipeta Pasteur provista de una perilla de goma. Se lava con dos porciones de alcohol de lavado y nuevamente centrifuga; luego se seca a 105°C durante 15 minutos y enfriado a

temperatura ambiente. Se añaden tres partes de ClH 0,1 N y por agitación suave se disuelve el precipitado. Se añaden 7 parte de solución B, se mezcla, debe añadirse esta solución y ácido de modo que el magnesio-hidroxiquinolato quede en concentración cercana de 1×10^{-3} M. Con este método, es posible determinar cantidades tan pequeñas como 68 a 100 microgramos de Mg con un error de más o menos 2,8%; cantidades de Mg mayores de 0,56 mgr. se determinan igualmente bien añadiendo 8-hidroxiquinolina a una solución caliente ó frío previo añadido del ClNH_4 y HONH_4 .

Como 2,8 microgramos ($0,1148 \times 10^{-3}$ M magnesio-hidroxiquinolina por ml. tiene una corriente de difusión de 0,825 microamperes (corregido de corriente residual); el método puede servir para determinar trazas de magnesio. (En líquido alantóideo normal a los 9 días y 14 días se encuentra 4 mgr % (tabla de Kam⁽¹⁾)).



Colorimetría de fósforo inorgánico en líquido alantoideo.-

(43)

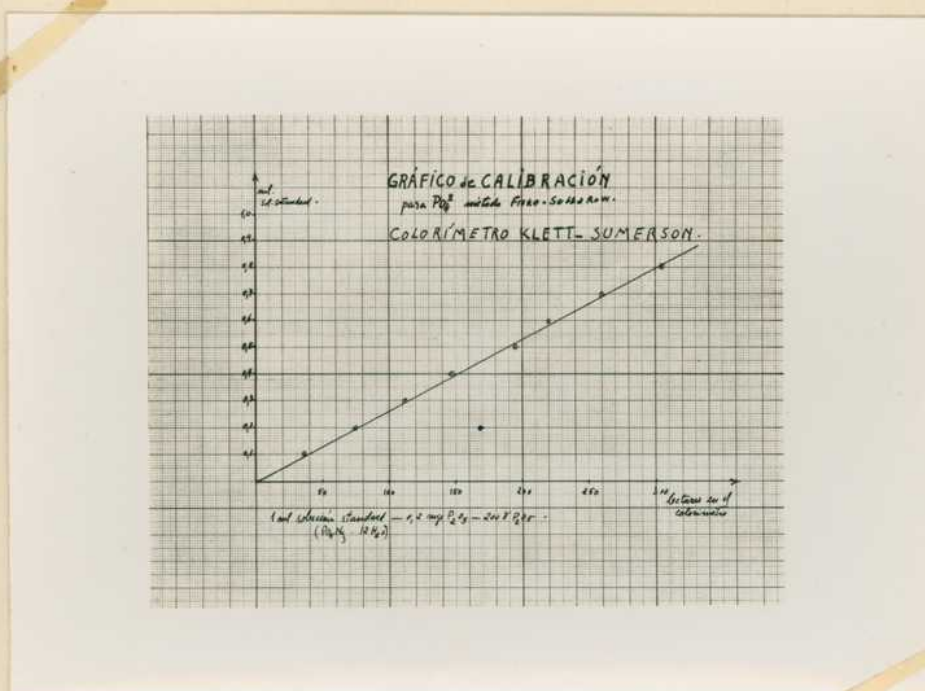
Se utilizó el método de Fiske-Subbarow, J. Biol. Chem., 1925, 66, 375.

Los análisis se hicieron sobre el líquido recién extraído sobre 0,5 ml., desproteinizado con 0,5 ml. $\text{Cl}_3\text{C.COOH}$ al 10%, centrifugado. Se preparó en todos los casos un standard y blanco simultáneos.

Procedimiento.-

Sobre el líquido alantoideo desproteinizado se añadió 1 ml. solución $\text{PO}_4\text{Na}_3 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 0,00053 gr. (0,0002 gr P_2O_5) 0,2 mgr P_2O_5 más 1 ml. SO_2H_2 0,1 N; 1 ml. $\text{M}_2\text{O}_4 (\text{NH}_4)_2$ 2,5% en H_2O ; 0,4 ml. de 1-2-4 amonlo-naftol sulfónico; llevado a volumen de 10 ml. con agua destilada. Se hacen las lecturas en el colorimetro fotoeléctrico Klett-Summerson luego de una hora.

Se hizo también un gráfico de calibración (Fig. 15).



TERCERA PARTE

DATOS EXPERIMENTALES

Tablas de valores

Se calculó la desviación standard según
$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n x_i^2}{n(n-1)}} \quad (44)$$
 donde x_i es la diferencia entre los valores hallados y su promedio; y n el número de determinaciones. Consideramos significativa la diferencia entre dos promedios cuando es mayor del doble de su error standard calculado según
$$\bar{U} = \sqrt{\bar{v}_1^2 + \bar{v}_2^2}$$

Resumen.-

I) Se aplica el método polarográfico a la determinación de Na, K, Ca y Mg en cenizas de líquide alantoides y el colorimétrico sobre líquide alantoides para PO_4 inorgánico.

II) En el análisis comparativo del líquide normal e infectado con virus de influenza cepa 7; de huevos de 12 días de incubación se encontró; un aumento de potasio en los infectados así mismo de fosfatos inorgánicos. No se encontró diferencia significativa en Ca, Mg, y Na.

M. Mendiz

Luis E. Bileff

Huevos de 7-XII-52, de 12 días, 24 horas de infección.

Copa 7, Dilución 10^{-3} , Título de virus 10^{-6} .

I N F E C T A D O S

Huevo n°	V.T. ml.	Peso embrón	P V.T.	STP
1	5,5	5,5	1.750	0,080
2	5	5,5	2.000	0,040
3	5,5	5,5	3.115	0,080
4	7,5	5	6.825	0,091
5	5,4	5,9	2.922	0,088
6	5,7	5,1	5.829	0,067
7	5,4	5,2	2.052	0,059
8	4,5	4,3	2.430	0,054
9	5,5	5	2.790	0,050
10	5,5	5,5	4.970	0,064
11	5,5	5	2.804	0,080
Promedio	5,2	5,2	3.372	0,064.

N O R M A L E S

Huevo n°	V.T. ml.	Peso embrón	P V.T.	STP
N ₃	6,5	5	3.640	0,056
N ₁₁	7	5	2.240	0,032
N ₆	4,4	5,2	2.376	0,054
N ₁₀	7	5,4	2.440	0,044
N ₅	5,4	5,2	2.320	0,072
N ₈	6	5,2	2.670	0,024
N ₁₂	5,7	5,6	2.250	0,032
N ₁₆	4	4,9	2.050	0,073
N ₁₇	5	5	2.240	0,059
N ₁₉	6,4	5,4	3.811	0,053
Promedio	5,7	5,2	2.696	0,043

Serie 8-V-51, Huevos de 12 días, 24 horas de infección.

Copa 7, Dilución 10^{-3} , Título de virus 10^{-8} .

I N F E C T A D O S

Huevo n°	V.T. ml.	ml. extraí- do	mgr. T.	c e n i s a s		Peso embrión gr.	MaK	H- ⁺	K ⁺
				Sol.	Ins.				
I ₁	3,8	1,8	9,4	7,8	1,6	7,10	15,480	4,430	11,030
I ₂	6,7	3	8,9	7,1	1,8	8,40	30,971	8,999	21,972
I ₃	7,6	0,8	8,5	7,3	1,2	6,63	50,767	10,884	40,113
I ₄	5,9	2,5	16,6	15	1,6	8,65	41,184	5,676	35,508
I ₅	8,3	2,8	26,6	15,9	0,7	7	60,530	16,740	33,708
I ₆	2,4	1,3	14,8	13	1,8	6,15	9,679	8,340	7,339
I ₇	5,8	3,2	23,6	20,2	3,4	6,55	40,365	4,738	35,779
I ₈	5,5	1,8	13,6	12,2	1,4	7,30	63,890	10,140	33,220
I ₁₃	4,9	2,7	21,3	17,5	3,8	6,75	48,557	8,758	89,799
I ₁₄	5	1,3	14,8	13	1,8	6	46,959	11,437	35,522
Promedio	5,9	2,17	15,8	12	1,8	6,30	40,805	6,426	31,377

N O R M A L E S

Huevo n°	V.T. ml.	ml. extraí- do	mgr. T.	c e n i s a s		Peso embrión gr.	MaK	H- ⁺	K ⁺
				Sol	Ins.				
N ₁	5,7	3,5	25,4	22,4	3	3,05	22,400	15,830	6,570
N ₂	6,6	3,8	14,1	13,2	0,9	7,45	36,928	26,944	9,984
N ₃	2	3,9	22,7	20,4	2,3	6,80	19,758	13,779	5,979
N ₄	4,7	2,8	22,8	20,4	2,4	7,47	29,989	15,000	6,989
N ₅	5,1	1,9	17,3	15,2	2,1	7,88	27,891	16,913	10,978
N ₆	7,2	3	23,4	20,6	2,8	6,85	53,100	21,575	11,525
N ₇	8,4	3,25	19,9	18,7	1,2	6,65	29,700	18,265	11,415
N ₁₂	2	3,8	16,8	14,9	2	7	20,175	13,596	6,579
N ₈	4,3	3	20,2	19,2	1	7,60	24,982	16,382	8,600
N ₁₃	4	2,9	23,3	18,3	2,9	6,7	24,990	16,090	8,900
Promedio	5	3,2	21,2	18,3	1,6	6,7	27,177	17,439	9,541

Cenizas del 25-VI-61, Huevos de 12 días, 24 horas de infección

Copa 7, Dilución 10^{-8} , Título de virus 10^{-8} .

I N F E C T A D O S

Huevo n°	V.T. ml.	ml. extraí- do	mgr. T.	c e n i z a s		Peso embrión gr.	NaK V.T.	Na ⁺ V.T.	K ⁺ V.T.
				Sol.	Ins.				
I ₁	2,3	1,4	8,2	8,2	1,8	3,35	6,440	5,698	742
I ₂	5,3	1,7	9	8,5	-	3,55	16,940	5,840	11,100
I ₃	4,3	1,7	9,6	8,5	0,6	3,56	18,320	5,670	12,650
I ₄	2	0,9	9,2	7,7	1,5	3,20	4,830	4,035	797
I ₅	4	1,55	6,8	-	-	3,30	18,256	5,550	12,706
I ₇	7	-	12,6	10,8	2	3,31	32,375	6,030	25,345
I ₈	1,1	0,5	6,8	5,3	1,3	3,1	24,510	3,639	20,871
I ₁₀	1,6	0,6	10,7	10,5	0,2	3,37	15,626	7,576	8,050
I ₁₁	2	1,65							
Promed.	3,2	1,2	9,5	8,5	1,0	3,35	19,008	5,754	11,242

N O R M A L E S

Huevo n°	V.T. ml.	ml. extraí- do	mgr. T.	c e n i z a s		Peso embrión gr.	NaK	Na ⁺	K ⁺
				Sol.	Ins.				
N ₂	2,3	1,4	11,6	10,4	1,2	3,70	7,302	-	-
N ₄	4,5	1,7	11,5	10,8	0,7	4,30	15,974	7,941	8,033
N ₅	2,3	1,7	9,4	8,6	0,8	4,34	9,016	7,529	1,487
N ₇	3,5	0,9	6,6	5,4	1,2	2,75	9,072	2,405	6,667
N ₈	2,3	1,55	10,8	9,6	1,2	3,74	16,410	1,968	14,442
N ₁₀	2,2	0,5	4	3,8	0,2	3,80	15,747	2,040	13,707
N ₁₁	3,5	0,6	5,9	5,7	0,2	4,23	12,300	1,425	10,875
N ₁₂	3	1,1	8,3	-	-	3,80	18,030	9,444	8,586
Promedio	2,9	1,2	8,5	7,8	0,7	3,70	13,792	4,678	9,112

Huevos del 30-III-51, 12 días, 24 horas de infección.

Cepa 7, Dilución 10⁻⁵, Título de virus 10⁻⁶.

I N F E C T A D O S

Huevo n°	V.T. ml.	ml. extraído	mgr. T.	cenizas Sol.	Ins.	Peso embrión gr.	Ca	Mg	P
I ₁	2,3	1	9	6	3	7,3	2.156	127	2.879
I ₂	2,8	5	42	30	12	8,9	2.963	257	2.744
I ₃	4,4	1,4	28	21,5	6,7	7,6	3.535	385	4.686
I ₄	2,4	2,8	3	1	2	7,8	2.802	276	2.058
I ₅	2,4	2,2	24	27,5	1,5	6,8	2.850	221	3.575
I ₆	4,7	1,5	5	3	2	7,1	3.026	298	4.607
I ₇	1,4	0,8	7	4,7	2,3	7	1.998	200	2.930
I ₈	1,4	0,5	2	1,4	0,6	6,8	1.764	221	2.610
I ₉	2,5	1,2	18	16,0	2	7,1	1.949	187	1.973
I ₁₀	2,6	1,3	8	6,0	2	7,4	2.017	276	2.846
I ₁₁	2,9	0,7	5	2,1	2,9	7,3	1.894	102	2.641
I ₁₂	2,7	1,6	9	7	2	7	2.599	190	2.531
I ₁₄	2,5	1,5	4	1,1	2,9	6,3	1.495	155	2.009
I ₁₅	3,1	1,5	5	2,1	2,9	7,4	2.011	208	1.989
Promedio	2,56	1,4	1,4	10,8	3,2	7,1	2.347	246	2.977

N O R M A L E S

Huevo n°	V.T. ml.	ml. extraído	mgr. T.	cenizas Sol.	Ins.	Peso embrión gr.	Ca	Mg	P
N ₁	2	1,3	9	8,4	0,6	7,3	2.900	280	1.009
N ₂	4,5	3,2	21,6	20	1,6	7,9	4.996	426	1.402
N ₃	2,9	1,8	13,5	12	1,5	7,7	2.760	173	499
N ₄	2,3	0,4	3,9	3	0,9	7,9	5.044	143	565
N ₇	3,3	1,5	12	10	2	7,6	3.799	363	1.776
N ₈	0,8	0,7	17	15	2	7,6	1.722	59	398
N ₉	3,5	1,9	17	15	2	7,8	3.741	599	1.841
N ₁₁	2,7	1,7	10,3	9,5	0,8	7,9	2.759	267	1.391
N ₁₀	3,8	1,8	10,9	9,3	1,6	7,7	4.482	459	1.203
N ₁₂	2,4	2,9	19,3	10,1	9,2	7,3	2.219	263	1.143
N ₁₄	2	1,5	8,5	8	0,3	7,4	3.767	423	1.846
N ₁₅	3,3	1,8	11,2	9,5	1,7	7,7	2.745	252	805
N ₁₆	2,6	1,7	8,9	7,6	1,5	7,9	2.501	196	676
Promedio	2,7	1,5	10,3	8,9	1,4	7,6	2.951	276,7	1.061

Serie 16-II-51. Huevos de 12 días, 24 horas de infección.

Cepa 7. Dilución 10^{-5} . Título de virus $10^{-4,5}$.

INFECTADOS

Huevo n°	V.T. ml. extraído	ml. extraído	mgr. T.	cenizas		Peso embrión gr.	Ca	Mg	P
				Sol.	Ins.				
I ₁	8	1,8	8	8	-	7,6	1.423	96	3.852
I ₂	5,8	1,5	10	8	2	6,4	1.010	112	2.520
I ₃	10	1,3	10	8	2	7,7	-	252	3.940
I ₄	8,9	0,96	8	8	-	7,7	1.320	100	3.332
I ₅	5,6	1,2	1	1	-	7,6	1.410	300	2.977
I ₆	3,3	2	12	10	2	7,1	820	340	2.400
I ₇	5,8	1,7	9	7	2	7,4	420	124	2.162
I ₈	4,2	1,5	8	7	1	6,8	889	142	1.570
I ₉	9,1	1,2	7	8	1	7,5	1.427	250	4.822
I ₁₀	6,6	1,6	9	7	2	8,1	841	120	1.677
I ₇	7,5	1,1	8	2	1	7,2	1.561	178	3.957
Promedio	6,6	1,3	8,2	7,1	1,1	7,4	1.102	174,8	3.024

NORMALES

Huevo n°	V.T. ml. extraído	ml. extraído	mgr. T.	cenizas		Peso embrión gr.	Ca	Mg	P
				Sol.	Ins.				
N ₁	8,9	2	9,1	9	0,1	7,7	1.513	430	72
N ₂	6	1	6,9	6	0,9	7,5	1.124	350	143
N ₃	6,1	1,1	7,5	7	0,3	8,3	1.619	284	807
N ₄	9,6	1,9	12,2	12	0,2	8	1.212	230	3.044
N ₅	4,5	1,65	14	12	2	7,9	698	400	1.259
N ₆	4,3	1,55	9	9	-	8,7	602	320	2.162
N ₇	4,2	1,7	9,9	8,8	1,1	9,1	1.112	330	2.701
N ₈	8,5	1,6	10,8	9,9	0,9	8,2	1.571	498	1.687
N ₉	7,1	1,5	9,2	9	0,2	8	1.325	484	1.171
N ₁₀	6,2	1,7	8,7	8,7	0,2	6,7	1.149	329	1.031
N ₁₁	4,2	1,2	9,6	9,2	0,4	7,9	507	337	647
Promedio	6,5	1,5	9,7	9,1	0,6	8	1.138	332	1.184

Conizas del 16-II-51. 12 días de incubación, 24 horas de infección

Virus Coxa 7. Dilución 10^{-5} . Título de virus $10^{-6,5}$.

CONIZAS

Huevo n°	V.T. ml.	ml. extraí- do	grm. T.	conizas		Peso embrión gr.	NaK	Na ⁺	K ⁺
				Sol.	Ins.				
H ₁	8,9	2	9,1	9	0,1	7,7	27.297	15.840	11.457
H ₂	8	1	6,9	6	0,9	7,5	20.592	19.404	1.188
H ₃	6,1	1,1	7,5	7	0,5	6,5	5.082	5.049	35
H ₄	9,6	1,9	12,2	12	0,2	8	21.997	20.307	1.690
H ₅	4,5	1,55	14	12	2	7,9	16.176	11.026	6.580
H ₆	4,5	1,55	9	9	-	6,7	9.081	6.048	3.055
Promedio	6,6	1,5	9,7	9,1	0,6	8	17.055	13.179	3.676

INEFECTADOS

Huevo n°	V.T. ml.	ml. extraí- do	grm. T.	conizas		Peso embrión gr.	NaK	Na ⁺	K ⁺
				Sol.	Ins.				
H ₁	8	1,5	8	8	-	7,6	18.480	12.204	6.276
H ₂	5,8	1,5	10	8	2	6,4	16.744	8.823	7.821
H ₃	10	1,5	10	8	2	7,7	30.320	21.008	29.620
H ₄	8,9	0,95	8	8	-	7,7	36.214	20.098	16.136
H ₅	5,6	1,1	1	1	-	7,6	5.530	4.726	961
H ₆	3,3	2	12	10	2	7,1	6.300	5.040	1.560
H ₇	5,3	1,7	9	7	2	7,4	-	-	-
Promedio	6,6	1,5	8,2	7,1	1,1	7,4	20.987	11.980	10.447

Serie 4-VI-51. Huevos de 12 días, 24 horas de infección.

Cepa 7, Dilución 10⁻⁵, Título de virus 10^{-4,5}.

I N F E C T A D O S

Huevo n°	V.T. ml.	ml. extraído	mgr. T.	mgr. Sol.	cenizas Ins.	Peso embrión gr.	NaK	N ⁺	K ⁺
I ₁	6,6	1,4	16,9	14,9	2	4,6	17.985	8.758	9.227
I ₂	7	2	18,2	16,2	2	3,98	19.925	10.140	9.788
I ₃	4,7	1,3	17,2	15,7	1,5	4,52	16.794	8,898	7.795
I ₄	6,3	2	16,8	14,8	2	4,72	18.799	6,790	12.009
I ₅	4,8	2	15,8	14,8	1	5,02	17.970	9.753	8,217
I ₆	5,1	1,1	8,3	8,3	2	4,70	15.750	4.4430	11.350
I ₇	6,1	3	18,3	15,3	3,2	4,68	18.578	6,671	11.907
I ₈	5,8	2,5	18,3	16,8	2,3	3,97	16,790	9.978	6,812
I ₉	5,9	1,5	17,9	12,8	4,1	4,50	17.999	5,430	12.569
I ₁₀	6	2	16,9	16,8	1	4,71	17.430	8,894	8.436
I ₁₁	4,9	2	16,8	14,8	2	4,60	16.530	7.562	958
I ₁₂	5,3	1,5	16,9	15,4	1,5	4,62	15.745	9.978	8.767
I ₁₃	3,8	2	16,4	15,4	1	5,01	10.627	4.786	6,041
I ₁₄	6,2	1,5	14,2	12,2	2	4,98	19.677	10.790	8.887
I ₁₅	5,5	2	15,9	13,7	2,2	5,05	18.482	7.451	11.041
Promedio	5,6	1,8	16,4	14,4	2	4,65	17.436	8,034	9.202

N O R M A L E S

Huevo n°	V.T. ml.	ml. extraído	mgr. T.	mgr. Sol.	cenizas Ins.	Peso embrión gr.	NaK	N ⁺	K ⁺
N ₅	3,7	1,8	18,9	15,3	1,6	5,2	23.682	17.971	5.720
N ₆	1,5	1	18,2	16	2,2	4,98	7.079	5.839	1.240
N ₇	5,7	2	19,2	17,8	1,4	5,30	19.939	16.890	3.049
N ₈	2,9	1,5	16,8	14,8	2	5,42	15.357	13.120	2.237
N ₉	5,9	1,1	17,8	16,3	1,5	5,31	20.744	15.774	4.970
N ₁₀	3,8	1	10,3	10,1	2	5,20	16.572	13.680	2.952
N ₁₁	4,3	3,7	20,7	18,6	3,1	4,97	17.898	14.865	3.831
N ₁₂	1,2	2	21,3	19,7	1,6	5,40	10.211	9.455	756
N ₁₃	4	1,5	19,9	18,4	1,5	5,10	16.959	13.600	3.359
N ₁₄	6	2	18,9	17,5	1,4	5,25	18.503	14.738	3.765
N ₁₅	4,7	2	16,6	17,1	1,7	4,99	17.190	15.960	3.230
N ₁₆	5,8	1,5	18,9	16,8	2,1	5,10	21.169	15.428	5.741
N ₁₇	4,1	1,3	18,4	17,7	0,7	5,25	17.735	14.420	3,315
N ₁₈	2,9	2	17,9	16,1	1,8	5,31	-	10.200	-
N ₁₉	3,1	1,5	16,2	14,3	1,9	5,17	17.125	13.200	3.925
Promedio	4,4	1,7	18	16,3	1,7	5,19	16.746	13.540	3.146

Cenizas del 30-VII-61, Huevos de 12 días, 24 horas de infección.

Cara 7, Dilución 10^{-5} , Título de virus $10^{-4,5}$.

I N F E C T A D O S

Huevo n°	V.T. ml.	ml. extraf- do	Hgr. T.	c e n i z a s		Peso embrón gr.	K	Na ⁺	K ⁺ Na
				Sol.	Ins.				
H ₁	4,8	1,8	4,4	4	0,4	5,78	15.100	6.542	19.442
H ₂	5,7	2,7	6,8	8	0,5	5,20	15.557	6.122	21.679
H ₃	7,3	1,3	3	3	-	5,59	16.701	9.489	24.209
H ₄	3,9	1,7	4	4	-	6,24	17.945	7.008	24.947
H ₅	7,3	1	4,8	4,8	-	4,59	16.779	8.980	27.749
H ₆	5,5	2	5,2	5	1,2	5,78	15.385	6.300	21.75
H ₇	5,5	0,6	5,4	5	0,4	5,96	17.202	7.535	25.045
H ₁₀	4,8	2,2	5,3	5	0,5	4,10	15.941	5.121	19.082
H ₁₄	5,1	2	4,7	4	0,7	4,58	16.429	6.304	22.783
Frmedia	6	1,7	5,4	5	0,6	4,7	15.743	6.231	21.936

N O R M A L E S

Huevo n°	V.T. ml.	ml. extraf- do	Hgr. T.	c e n i z a s		Peso embrón gr.	K	Na ⁺	K ⁺ Na
				Sol.	Ins.				
H ₁	4,1	2	7,1	5,7	0,4	4,55	22.448	15.008	7.449
H ₂	2,2	0,7	3,5	3,1	0,2	4,20	19.202	15.560	6.342
H ₃	4	2,1	7,8	7,4	0,6	4,90	21.379	14.360	7.059
H ₄	7,4	1,5	3,1	2,8	0,3	3,40	17.601	11.201	6.690
H ₅	7,2	2,5	3,7	7,5	1,2	6,90	22.746	14.285	7.762
H ₇	6,1	1,4	5,6	5,3	0,3	5,10	18.101	12.115	6.076
H ₁₀	4,7	1,7	6,1	5,6	0,5	5,20	19.209	12.746	6.585
H ₁₄	3,6	2,8	10,1	9,5	1,4	6,41	24.785	15.778	6.977
H ₁₅	5,3	2	6,1	5,9	0,2	5,12	19.225	12.434	6.799
Frmedia	5	1,8	6	5,6	0,4	5,05	19.778	13.101	6.677

Huevos del 23-IV-51. 12 días de incubación. 24 horas de infección.

Cepa 7. Dilución 10^{-8} . Título de virus $10^{-6,8}$.

EFECTADOS

Huevo n°	V.T. ml.	Peso embrión gr.	P en V.T.	gr. % P	P7° hidrolisis	gr % P 7° hidrolisis
I ₁	4,68	4,6	1.917	0,040	979,5	0,020
I ₂	3,91	4	2.221	0,058	1007,	0,025
I ₃	1,27	5,65	124	0,010	512,8	0,042
I ₄	7,77	4,70	3,724	0,044	1928,8	0,034
I ₅	3,43	4,40	2.589	0,075	1180,9	0,034
I ₆	2,41	4,1	1.444	0,059	1253,6	0,051
I ₇	0,7	7,05	891	0,012	700,4	0,010
I ₈	3,10	5,10	2.876	0,092	1010	0,032
I ₉	2,32	5,72	2.099	0,030	458,9	0,020
I ₁₀	3,2	5,7	1.966	0,061	-	-
I ₁₁	4,4	6,7	1.470	0,029	884	0,017
I ₁₂	6,1	5,80	1.789	0,028	980	0,015
I ₁₄	7,7	7,52	2.640	0,054	1230	0,015
I ₁₅	6,5	7,10	2.120	0,051	1150	0,017
I ₁₆	6,6	5,60	1.666	0,028	1500	0,019
I ₁₇	4	8,20	1.948	0,048	-	-
Promedio	4,49	5,7	1.979	0,043	1037	0,023

INCORMALES

Huevo n°	V.T. ml.	Peso embrión gr.	P en V.T.	gr. % P	P7° hidrolisis	gr. % P 7° hidrolisis
H ₁	5,66	6,58	113,2	0,002	11712	0,029
H ₂	7,25	6	984	0,013	1.916	0,025
H ₃	2,57	6,9	228	0,009	2.495	0,020
H ₄	5,50	6,96	327	0,014	769	0,012
H ₅	7,92	6,35	316	0,004	690	0,008
H ₇	2,8	7,35	277	0,010	-	-
H ₉	4,2	6,9	598	0,014	544	0,012
H ₁₀	5,98	7,15	489	0,008	199	0,003
H ₁₁	3,27	6	578	0,009	-	-
H ₁₂	5,57	6,80	510	0,015	817	0,014
H ₁₃	3,97	7,23	576	0,014	328	0,008
H ₁₈	3,25	6,15	566	0,017	271	0,008
H ₁₉	9,3	5,80	751	0,007	488	0,050
Promedio	4,82	6,62	399	0,008	777	0,015

Bovos del G-III-51, 12 días de incubación, 24 horas de infección.

Cera 7, Dilución 10^{-5} , Título de virus 10^{-4} .

INFECCION

Bovos N°	V.T. ml.	Peso embrión	P V.T.	g/P
1	3,2	4,2	3,780	0,088
2	3,8	3,8	4,808	0,083
3	4,5	4,2	3,000	0,067
4	4,2	3,8	3,498	0,080
5	3,8	2,8	4,250	0,112
6	4	2,8	3,080	0,220
7	3,1	3,1	5,670	0,205
8	4,8	3,2	3,988	0,079
9	3,8	3,2	3,047	0,088
10	4,5	3,8	4,356	0,100
11	3,8	4	3,987	0,099
12	4,5	3,1	4,287	0,088
13	3	2,9	3,888	0,077
14	3,6	3,2	4,058	0,108
15	4,7	3,4	4,182	0,088
Promedio	4,3	3,5	4,226	0,088

NORMALES

Bovos N°	V.T. ml.	Peso embrión	P V.T.	g/P
1	3,9	3,7	2,400	0,061
2	3,4	2,4	3,550	0,058
3	4,2	4,4	2,270	0,047
4	4,1	3,8	3,580	0,070
5	2,4	3	2,800	0,070
6	4,2	5,8	2,441	0,062
7	3	4,8	-	-
8	4	4,5	2,458	0,061
9	3,2	3	3,638	0,058
10	3,5	3,3	3,321	0,080
11	4,6	5,6	2,858	0,058
12	4,2	4,2	2,688	0,061
13	2,8	4	3,448	0,088
14	3,7	4,8	3,100	0,088
15	4,4	4,6	2,029	0,048
Promedio	4,2	4,5	2,391	0,067

BIBLIOGRAFIA

- 1.- J. Needham, "Embriología química" Cambridge, 1931.
- 2.- Hirst, "The quantitative determination of influenza virus with antibodies by means of red cell agglutination". *J. Exp. Med.*, 1942, 75, 43.
- 3.- J. Needham, "Biochemistry and morphogenesis." 1942.
- 4.- Farodi, Lajmanovich, "Metabolismo de las membranas corionales de embrión de pollo infectado con virus "A" de Influenza." *Rev. Soc. Arg. Biol.*, 1947.
- 5.- Tesic, "Acción del virus "A" de Influenza sobre el peso de los distintos constituyentes del huevo de gallina en desarrollo." *Univ. de la Plata, Rev. Inst. Inst. Malvinas*.
- 6.- Ferrer, Farodi, Lajmanovich y Mittelman, "Modificaciones producidas en el huevo fértil de pollo por la inoculación del virus "A" de Influenza". *Ciencia e Investigación* 1947.
- 7.- Fisher-Winsky, "Inhibition of phosphorylation of glucose in some brains by viruses and its prevention by preparation of diphosphopyridine nucleotide." *J. Exp. Med.*, 1948, 84, 181.
- 8.- Scardelli, Taylor, Farodi, "Estudio de los virus de la epidemia de influenza ocurrida en la Argentina durante el año 1948.
- 9.- "Physical properties of the allantoic and amniotic fluids of the chick." *J. Gen. Physiol.*, 1948, 21, 483.
- 10.- Flinn and J. Leuter, "Los cambios en el contenido de calcio de huevo de gallina durante su desarrollo." *Nechem. J.*, 1954, 14, 1293.
- 11.- Tesic, M.H. Papalardo, "Análisis de líquidos extraembrionarios de huevos de gallina normales e inoculados con virus "A" de Influenza." *Rev. Inst. Inst. Malvinas*, 1949, 14.
- 12.- Tokuni-Hashi, "Propiedades físicas y composición química de los fluidos amniótico y alantico de embrión de pollo." *J. Physiol. Chem.*, 1957, 11, 171.
- 13.- Tokuni-Hashi, "Comportamiento de los constituyentes inorgánicos en la incubación de huevos de gallina." *J. Physiol. Chem.*, 1958, 11, 181.
- 14.- A. Nagh, "Intercambio de iones entre células y fluido extracelular. I. Tasa de K en la membrana corionales del huevo de gallina." *Acta Physiol. Scand.*, 1948, 6, 208. (Abstracts).
- 15.- Farodi, Lajmanovich, Mittelman, "Adsorption by erythrocytes nuclei of chicken." *Rev. Inst. Inst. Malvinas*, 1944, 10, 312.
- 16.- P. Lopins, Kozleng, Reifris, "Curso de crecimiento del virus vaccinal en la membrana corionales del huevo." *Ann. de l'Institut Pasteur*, 1951, 31, 77.
- 17.- "The growth cycle of influenza virus A." *The Veterinary Bull.*, 1950, 2261.
- 18.- Max Lauffer, Carolyn McDonald, "Thermal destruction of influenza A virus infectivity." *Arch. Biochem.*, 1948, 14.
- 19.- L.J. Reed, H. Marsh, "Determinación del fifty per cent end points." *The Am. J. Hyg.*, 1938, 31.
- 20.- "Título de virus". *J. Biol. Chem.*, 1930, 92.
- 21.- Kalthoff-Singano, "Polarography". 1941, New York.

22.- "Bibliography of the polarized dropping mercury electrode." Leeds and Northrup, Co., Philadelphia.

23.- "Anales de la Sociedad Científica Argentina", 1939, 127.

24.- "Química" 1940, 11, 70.

25.- G. Sauerbrey "Il polarografo", 1933.

26.- "Symposium on polarography," The Soc. Public Analysts and Other Analytical Chem., 1945.

27.- J. Heyrovsky, "Deposición de metales alcalinos y alcalinotérreos." Phil. Mag., 1933, 45, 303.

28.- J. Prstl, "Aplicación del método polarográfico en biología." Czech. L., 1936, 17, 266.

29.- G. Sauerbrey, "Estudio polarográfico con cátodo gaseoso de mercurio." part. XIII, "La electroreducción de Ca y Mg y la determinación de Ca." L. Anal. Chem., 1933, 11, 521.

30.- V. Mayer, "La determinación polarográfica de metales alcalinos." L. Anal. Chem., 1933, 11, 521.

31.- J. Heyrovsky, M. Bures, "Un aumento de sensibilidad en la determinación de metales alcalinos." Collect. Czech. Chem. Cmp 1934, 9, 646. Part. LXII

32.- I. Klotovský, I. N. Kolthoff, "La validez de la ecuación de Ilk en relación con el análisis polarográfico de metales alcalinos y características de las curvas de metales alcalinos en distintos medios." J. Am. Chem. Soc., 1943, 65, 1197.

33.- C. Carruthers, "Microdeterminación de magnesio en el polarógrafo." I. d. Eng. Chem. Anal. Ed., 1943, 15, 415.

34.- G. Cohn, Kolthoff, I. N., "Determinación de Ca por precipitación con ácido picrólico y medición polarográfica del ácido residual." J. Biol. Chem., 1943, 167, 705.

35.- E. G. Stone, H. N. Furness, "Uso polarográfico de reactivos orgánicos. Determinación de Mg con 8 hidroxiquinolina." Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 1944, 16, 596.

36.- I. Klotovský, I. N. Kolthoff, "Comportamiento polarográfico del Ca solo y en presencia de otros metales alcalino-térreos." J. Phys. Chem., 1943, 47, 366.

37.- Weaver, J. R., "Determinación polarográfica de Ba y Sr en varias sales." Anal. Chem., 1947, 19, 372.

38.- E. A. Ross, "Deposición de metaloides." Angew. Chem., 1933, 45, 642.

39.- W. Paternock, "Alcunquas con el cátodo gaseoso de mercurio." Parte I. Rec. des trav. chim. Pays Bas., 1933, 44.

40.- D. Gammale, Teoria "Estudio general del método polarográfico." Aplicación de a la determinación de pequeñas cantidades de sodio". 1945.

41.- U. Carruthers, "Ultramicrométodo para Na" Polarográfico. Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 1943, 15, 70.

42.- R. F. Fillemon, "Introducción a la teoría y práctica de la polarografía." 1945.

43.- F. J. S. Subbarao, "Determinación de fosfatos inorgánicos en sangre entera plasma e suero." J. Biol. Chem., 1935, 49, 375.

44.- S. Altman, E. Fawcett, "Teoría y cálculo de errores."

45. Kuznetsov, J. Act. Sc. U.S.S.R., 1934, 1050. Paris
 46. Bichler, Z. Phys. Chem., 1934, 171, 105.