

# Dosificación fotométrica y tintométrica de sulfanilamidas de líquidos biológicos

Por

AVELINA ROVIRA DE MIGUEL

## VENTAJAS DEL METODO FOTOMETRICO

El análisis fotométrico consiste en medir la cantidad de luz absorbida por una solución y deducir de los valores obtenidos, la concentración estudiada. Dentro de la fotometría hay varias formas de análisis de los cuales los más corrientes son: la colorimetría y la fotocolorimetría, también llamada fotometría absoluta. En la colorimetría se utiliza luz blanca y se compara el color de la solución a dosificar, con una solución de concentración conocida. En la fotocolorimetría se usan filtros que sólo dejan pasar la luz que corresponde a su color y no se emplean soluciones testigos, sino que se efectúan medidas absolutas, basándose en las leyes de Lambert-Beer.

Las leyes generales de la fotometría, ley de Lambert y ley de Beer combinadas en una única ecuación,  $I_t = I_0 \cdot 10^{-c \cdot l}$  etc. a partir de la cual se deduce esta otra:

$$c = \log \frac{I_0}{I_t} \cdot \frac{1}{e} \cdot \frac{1}{l}$$

nos permiten determinar la concentración de una solución sin compararla con otra, utilizando los aparatos denominados fotómetros o fotocolorímetros.

Con estos aparatos se mide la relación entre las intensidades

de luz incidente y luz transmitida  $\frac{I_0}{I_t}$  — cuyo logaritmo es directamente

proporcional al espesor bajo el cual se observa la solución y a su concentración.

Si bien es cierto que la fotocolorimetría no elimina el error subjetivo, tiene como gran ventaja su gran sensibilidad y la no utilización de soluciones tipos.

## TECNICAS FOTOMETRICAS DE DOSIFICACION DE SULFANILAMIDAS

En 1940, Hug (1) publicó un procedimiento fotométrico basado en la reacción de las sulfanilamidas diazotadas con la etilo  $\alpha$  naf-tilamina y utilizando el Fotómetro de Pulfrich-Zeiss.

Un año después Pimenta (2) publica la adaptación fotométrica del método de Werner, con alguna modificación.

En este trabajo, adaptamos al fotómetro la técnica colorimétrica de dosificación de sulfanilamidas que en colaboración del Prof. E. J. Miguel (3) publicamos recientemente.

### ADAPTACION FOTOMETRICA DE NUESTRA TECNICA

Primeramente es necesario elegir el espesor, vale decir la cuba con la cual se hará la medida. Para ello recordamos que los errores de lectura son prácticamente despreciables cuando el % de transparencia leída se encuentra entre 25 y 50 % y por lo tanto deberá elegirse la cuba que nos permita obtener una transparencia dentro de dichos límites.

En nuestro caso, cuando se trata de concentraciones alrededor de 5 miligramos la cuba a utilizar es de 10 mm.

Elección del filtro: el filtro a utilizar debe ser aquel que acuse un mínimo de transparencia, o sea un máximo de absorción. Para determinar cual era el filtro útil en nuestra reacción, preparamos una solución de sulfanilamida de valor conocido, 5 miligramos % y usando cubas de 10 mms. de espesor, hicimos varias lecturas variando el filtro interpuesto. Los resultados obtenidos y que detallamos en el Cuadro I nos indican que podemos elegir indistintamente el filtro S.43 ó el S.47, con los cuales las lecturas se efectúan en violeta o en azul.

Para la elección definitiva, hicimos una serie de lecturas sucesivas con ambos filtros y comprobamos que los valores eran más coincidentes efectuando las lecturas en violeta, por lo cual se adoptó definitivamente el filtro S.43.

CUADRO I

FILTROS	TRANSPARENCIA %
S.43	46.0
S.47	46.0
S.50	79.0
S.53	90.0
S.57	92.0
S.61	92.0
S.66	95.0
S.72	98.0
S.75	98.0

Determinación de  $e_0$  se denomina coeficiente de extinción, al valor obtenido dividiendo la extinción leída  $e = \log \frac{I_0}{I_t}$  entre el espesor de la cuba, expresado en cms. Y es coeficiente de extinción específico, el valor que se obtiene dividiendo el coeficiente de extinción entre la concentración en gramos o en miligramos de la sustancia que contiene la muestra analizada.

Para hallar  $e_0$  preparamos varias soluciones conteniendo cantidades conocidas de sulfanilamida y efectuamos las lecturas utilizando las cubas convenientes y filtro S.43. Los resultados se detallan en el Cuadro II.

CUADRO II

Tubos	Cubas	Sulf. en T. de E.	Transparencia %	Eh	Eo
I	20 mms.	0mgrs.012	46.2	0.167	13.91
II	10 mms.	0mgrs.023	49.0	0.310	13.48
III	10 mms.	0mgrs.035	35.5	0.450	12.86
IV	5 mms.	0mgrs.052	45.5	0.684	13.10
V	5 mms.	0mgrs.070	35.5	0.900	12.86

Promedio de  $E_0 = 13.24$

Si la coloración utilizada en la dosificación sigue exactamente la ley de Beer, basta con efectuar una sola determinación de Eh y dividirla por la concentración.

Pero aún así, es decir, cuando la ley de Beer es seguida estrictamente, conviene hacer varias concentraciones y hallar un promedio de  $e_0$ . Si no sigue la ley de Beer, debe hacerse una curva con varias concentraciones comprendidas entre los límites corrientes de determinación. En nuestro caso, como se desprende al observar los datos obtenidos en el Cuadro II la coloración amarilla sigue la ley de Beer, y por lo tanto en nuestro cálculos usaremos  $e_0 = 13.24$

## METODO

### Reactivos:

1º Disolver 0grs.200 de p-dimetilaminobenzaldehido en 60 c. c. de ácido acético glacial y enrasar a 100 c. c. con H<sub>2</sub>O destilada.

2º Solución de ácido tricloacético al 5 %.

3º Solución de NaOH 0.25 N.

### Técnica:

Tomar 1 c. c. de sangre oxalatada y desproteinizar con 5 c. c. de la solución de ácido tricloacético, agregando la sangre gota a gota sobre el ácido. En esa forma la sangre queda diluida al 1/6. Esperar como mínimo 30 minutos y centrifugar. Tomar 3.0 c. c. del líquido claro, agregar 1 c. c. de NaOH 0.25N y luego 3.0 c. c. de reactivo de p-dimetilaminobenzaldehido.

Elegir la cuba conveniente, recordando que el volumen de líquido necesario es de 0c.c.35 por cada mm. de espesor. Se hace conjuntamente un blanco utilizando  $H_2O$  en lugar de sangre.

Se lee al fotómetro de Pulfrich y una vez igualadas las intensidades en los dos campos, leer en el tambor el % de transparencia y transformarlo en extinción por medio de las tablas, o leer directamente la extinción en la escala roja del tambor.

Cálculos: de acuerdo a la ley de Lambert-Beer

$$\log \frac{I_0}{I_t} = E = l c e$$

y cuando  $l = 1\text{cm.}$  la fórmula se transforma en:  $E_h = c e_0$ .  
de donde se puede calcular la concentración  $c$

$$E_h = c e_0 \quad c = \frac{E_h}{e_0} = E_h \times \frac{1}{e_0}$$

Esto nos expresa la concentración de la sustancia en la Toma de líquido utilizado. Para hallar el % se relaciona a 100

$$c = E_h \times \frac{1}{e_0} \times \frac{100}{V}$$

donde  $V$  es la Toma de Sangre.

En nuestro caso  $e_0 = 13.24$  y  $V = 0.58$

$$c = E_h \times \frac{1}{13.24} \times \frac{100}{0.58}$$

Como 13.24 y 0.58 son valores constantes si se trabaja en las condiciones precitadas, se tiene

$$\frac{1}{13.24} \times \frac{100}{0.58} = 13$$

y la fórmula final es:  $C = E_h \times 13$

### EMPLEO DEL TINTOMETRO DE LOVIBOND

Hemos adaptado nuestra técnica al Tintómetro de Lovibond. Para ello preparamos una solución de sulfanilamida de valor conocido y trabajamos como si se tratara de algún líquido biológico, en la sig. forma: 2 c. c. de solución de sulfanilamida + 2 c. c. de solución de ácido tricloroacético al 10%; de esa solución tomamos 1 c. c. y le agregamos 1 c. c. de reactivo de p-dimetilaminobenzaldehído. Operando con soluciones de 1 mgr. hasta 10 mgrs. % obtuvimos los sig. datos:

## CUADRO III

Miligramos %	Unidades amarillas
1	2.0
2	4.0
3	6.0
4	8.0
5	9.9 10

En vista de los resultados obtenidos y para mayor comodidad, procedimos a diluir la T. de Ensayo al medio, a fin de que correspondiera 1 unidad por miligramo %. Trabajamos en esta forma:

1 c.c. de solución de sulfanilamida + 1 c.c. de H<sub>2</sub>O destilada + 2 c.c. de ácido tricloroacético. De allí tomamos 1 c.c. y se le adicionó 1 c.c. de reactivo.

Al hacer las lecturas es necesario utilizar como complemento algunas décimas de unidades rojas, dado que la coloración amarilla obtenida en la reacción tiene tintes verdosos que hay que neutralizar.

La sensibilidad de este procedimiento es bastante menor que utilizando el fotómetro y mismo aún el colorímetro; sin embargo, hemos efectuado dosificaciones en una misma sangre con los tres métodos, obteniendo resultados concordantes.

Tintómetro  
5 mgrs. 7 %

Colorímetro  
6 mgrs. 2 %

Fotómetro  
6 mgrs. 1 %

## CONCLUSIONES

- 1º De la adaptación fotométrica de nuestro método, surgen dos ventajas: la rapidez de ejecución y su gran sensibilidad, dado que permite dosificar décimas de miligramo con precisión.
- 2º El método tintométrico, menos sensible que el anterior, es de fácil ejecución, y las unidades amarillas leídas equivalen a los miligramos de sulfanilamida % de solución.

## BIBLIOGRAFIA

- 1º Hug. Sociedad Argentina de Biología, **16** (1940).
- 2º Pimenta. O Hospital, **19** (1941).
- 3º Miguel E. y R. de Miguel A. Rev. de la A. de Est. de Química Ph, Nº 1-2, (1943).