

# FOTOCOLORIMETRIA

Q. Farmacéutica MARIA I. ARDAO

Hagamos una revisión de los principios fundamentales y leyes que la rigen.

Es sabido que cuando la luz visible incide sobre un medio (sólido, líquido, gas) es en parte absorbido, de tal modo que el haz emergente de energía radiante tiene intensidad menor que el incidente. Esto se expresa por la igualdad:

$$I_0 = I_a + I_t + I_r \quad (1)$$

en la cual  $I_0$  representa la intensidad de la luz incidente,  $I_a$  la intensidad de la luz absorbida,  $I_t$  la intensidad de la luz transmitida e  $I_r$  la intensidad de la luz reflejada.  $I_r$ , no tratándose de un sólido brillante, es despreciable.

Si (1) se divide por  $I_0$  resulta:

$$\frac{I_0}{I_0} = \frac{I_a}{I_0} + \frac{I_t}{I_0}$$

La relación  $I_a/I_0$  representa la absorción,  $A$  y el cociente  $I_t/I_0$  la transparencia,  $T$ .

$$\text{Luego} \quad 1 = A + T \quad (2)$$

Las distintas radiaciones del espectro no son absorbidas con igual intensidad por una sustancia dada. Es precisamente en este fenómeno que se origina el color que presenta una sustancia, puesto que el color del haz emergente, complementario de las radiaciones absorbidas, es el color del cuerpo. Así una disolución de cromato de potasio atravesada por la luz blanca, dejará pasar, casi sin modificar su intensidad, las radiaciones de longitud de onda correspondientes al amarillo. Las otras sufrirán una disminución de intensidad que será máxima para las radiaciones complementarias del amarillo, es decir, las de longitud de onda correspondiente al violeta.

En general toda sustancia coloreada presenta una zona de máxima y otra de mínima absorción en el espectro, caracterizadas ambas por las correspondientes longitudes de onda.

Para las radiaciones intermedias la absorción tiene valores progresivos comprendidos entre el mínimo y el máximo.

De (2) se deduce que al máximo de absorción le corresponde el mínimo de transparencia y a la inversa.

En los casos extremos, todas las radiaciones pueden ser absorbidas (cuerpo negro) o ninguna de las del espectro visible y en este caso los haces incidente y emergente son de igual color. Las sustancias incoloras, agua, disolventes orgánicos, presentan una absorción despreciable en la práctica colorimétrica

corriente.

De acuerdo a lo que antecede, cuando se habla de absorción, es preciso indicar la longitud de onda a que se refiere.

## LEYES

Lambert fué el primero en estudiar las relaciones entre la luz incidente y la transmitida. En 1760 (1) enunció sus leyes para los cuerpos absorbentes en general (salvo en estado disuelto).

1.a Ley. La cantidad de luz monocromática transmitida es proporcional a la intensidad de la luz incidente.

$$I_t = a \cdot I_0$$

$$I_t/I_0 = a$$

$a$  es una constante menor que la unidad según la ecuación (2) y se llama coeficiente de trasmisión cuando se determina para una capa de sustancia de un cm. de espesor.

2.a Ley. La intensidad de la luz monocromática transmitida decrece en progresión geométrica mientras el espesor de la capa absorbente aumenta en progresión aritmética.

La expresión matemática de esta ley es:

$$I_t = I_0 \cdot 10^{-\Sigma \cdot l} \quad (3)$$

$l$  representa el espesor y  $\Sigma$  una constante que Bunsen y Roscoe (2) llamaron coeficiente de extinción. Su valor deducido de la expresión (3) es:

$$\Sigma = \frac{1}{l} \log \frac{I_0}{I_t} \quad (4) \quad (.)$$

Indica que la extinción producida por una sustancia es igual a la inversa del espesor por el logaritmo de la relación de la intensidad de la luz incidente a la transmitida. Cuando en (4)  $l$  es igual a 1 cm.  $\Sigma$  representa el coeficiente de extinción de la sustancia que se define como el logaritmo de la relación  $I_t/I_0$  para un espesor igual a 1 cm. Más tarde Beer (2) y Bernard (3) estudiaron la absorción y la trasmisión de la luz en las disoluciones de sustancias coloreadas en disolventes inactivos, donde a más del espesor, interviene otra variable, la concentración. Encontraron que manteniendo el espesor constante, la concentración influye en la intensidad de la luz transmitida de la (.) Omitimos aquí la deducción de las expresiones (3) y (4) para hacerlo cuando nos refiéramos a la ley de Lambert-Beer.

misma manera que lo establece la ley de Lambert para el espesor.

La ley de Beer dice: A espesor constante, la intensidad de la luz transmitida disminuye en progresión geométrica cuando la concentración de la sustancia aumenta en progresión aritmética.

Su expresión, semejante a la de Lambert, es:

$$I_t = I_0 \cdot 10^{-\Sigma c} \quad (5)$$

De la combinación de ambas (3) y (5) surge la expresión de la ley de Lambert-Beer:

$$I_t = I_0 \cdot 10^{-\Sigma l c} \quad (6)$$

Vamos a deducir esta ecuación que es la que nos interesa desde el punto de vista analítico.

Sea un haz de rayos paralelos monocromáticos de intensidad  $I_0$  que atraviesa una solución de una sustancia capaz de absorberlos, bajo un espesor  $l$  y a una concentración  $c$ . La energía de esas radiaciones de determinada longitud de onda, ha disminuído y la disminución es proporcional a  $I_0$ , a  $l$ , a  $C$  y a una constante de proporcionalidad  $K$ , característica de cada sustancia, llamada coeficiente de absorción.

Consideremos  $l$  constante y  $C$  variable dándole incrementos negativos. Para una variación de  $C$  igual a  $-dC$ , la variación de intensidad será:

$$dI = -I_0 \cdot K \cdot l \cdot dC$$

$$dI/I_0 = -K \cdot l \cdot dC$$

Integrando esta diferencial entre los valores  $O$  y  $C$  de la concentración e  $I_0$   $I_t$  de la intensidad, se obtiene el valor de la intensidad en función de estos elementos.

$$\int_{I_0}^{I_t} \frac{dI}{I} = -Kl \int_0^c dC$$

$$\ln \frac{I_t}{I_0} = -Klc$$

Pasando de logaritmos neperianos a logaritmos de Briggs (base 10):

$$I_t/I_0 = 10^{-0.4343Klc}$$

Si el producto constante  $0.4343K$  se representa por  $\Sigma$  y si se pasa  $I_0$  al segundo miembro se llega a la expresión de la ley Lambert-Beer.

$$I_t = I_0 \cdot 10^{-\Sigma l c} \quad (6)$$

La (6) es la expresión fundamental de todos los métodos que comprende el Análisis Fotométrico y es válida para una dada longitud de onda de la energía radiante. Por tanto es rigurosamente exacta cuando se trabaja con luz monocromática (espectrofotómetros,

fotocolorímetros, colorímetros fotoeléctricos). Sin embargo en las técnicas colorimétricas corrientes esta ley se generaliza a cualquier luz sin mayor error.

## COEFICIENTE DE EXTINCION

Hallemos el valor de  $\Sigma$  en la expresión (6)

### FORMULAS

$$I_t/I_0 = 10^{-\Sigma l c}$$

$$\log \frac{I_t}{I_0} = -\Sigma l c$$

$$\log \frac{I_0}{I_t} = \Sigma l c$$

$$\Sigma = \frac{1}{lc} \log \frac{I_0}{I_t} \quad (7)$$

Se deduce que la extinción es igual a la recíproca del producto del espesor y la concentración multiplicada por el logaritmo de la relación  $I_0/I_t$ . Cuando  $l$  y  $c$  son iguales a la unidad

$$\Sigma = \log. I_0/I_t \quad (8)$$

$\Sigma$  representa el coeficiente de extinción, es decir, la extinción producida por la disolución de una sustancia bajo la unidad de espesor y de concentración.

En general se define el coeficiente de extinción como la inversa del espesor de una solución en la unidad de concentración, capaz de reducir a un décimo la intensidad de la luz incidente.

Esta definición se aclara despejando  $\Sigma$  en (6) cuando  $I_t = 0,1 \cdot I_0$  y  $c = 1$   
Reemplazando  $I_t$  por su valor:

$$0,1 \cdot I_0 = I_0 \cdot 10^{-\Sigma l c}$$

$$0,1 \frac{I_0}{I_0} = 10^{-\Sigma l c}$$

$$0,1 = 10^{-\Sigma l c}$$

$$\log 0.1 = -\Sigma l c \log 10$$

$$-1 = -\Sigma l c$$

$$1 = \Sigma l c$$

$$\Sigma = 1/cl$$

$$\text{Siendo } c = 1 \quad \Sigma = 1/l \quad (9)$$

Las ecuaciones (8) y (9) dan el valor de  $\Sigma$  a partir de la misma expresión fundamental.

El espesor se expresa siempre en centímetros mientras que la concentración puede expresarse en distintas unidades, lo que da lugar a coeficientes de extinción de diferente significado.

Si  $c$  se expresa en moléculas gramo por litro, se tiene el coeficiente de extinción molecular que se representa por  $\Sigma^{\text{mol}}$  y se define como la recíproca

del espesor de una solución molar capaz de reducir a un décimo la intensidad de la luz incidente.

Si  $c$  se expresa en gramos por 100 mililitros de solución  $\Sigma$  representa el coeficiente de extinción específico para la solución al 1 por ciento y se define como la inversa del espesor de una solución al 1 por ciento de la sustancia capaz de reducir a 0.1 la intensidad de la luz incidente.

Se representa por  $\Sigma$   $\frac{1\%}{1 \text{ cm.}}$

Todavía existe un tercer símbolo  $\Sigma_0$  que representa también un coeficiente de extinción específico, pero su significado es distinto del anterior. Corresponde a la extinción de una solución que tiene la unidad de peso (1 gramo o 1 milígramo) en el volumen líquido en que se desarrolla la reacción

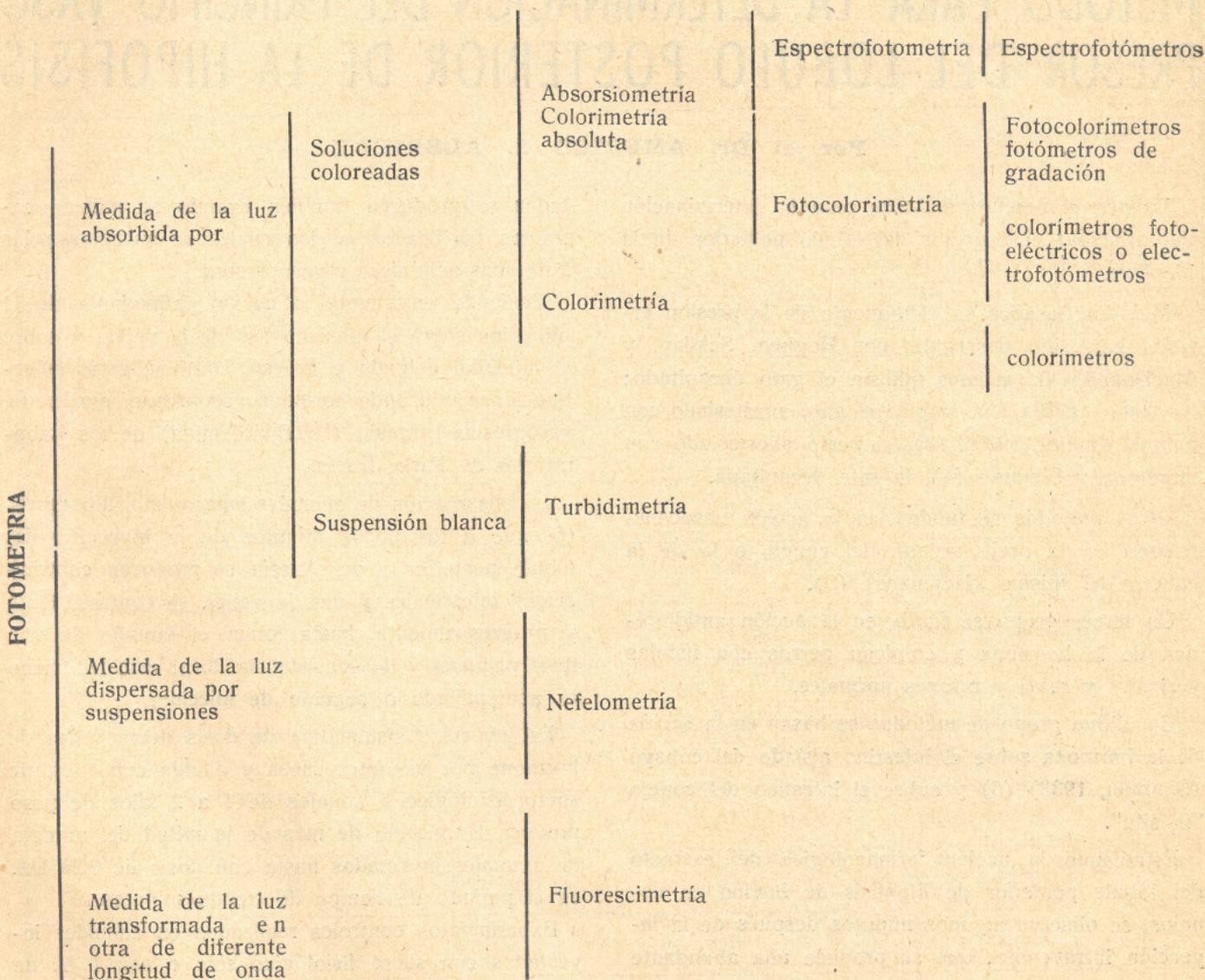
Cuando se establece el coeficiente de extinción de una sustancia es preciso indicar la longitud de onda para la cual es válido el disolvente empleado, etc.

FOTOMETRIA

Se designa por fotometría la parte de la física que trata de la medida de la intensidad luminosa de una fuente de luz, mediante el empleo de dispositivos llamados fotómetros.

En química analítica el término fotometría tiene un significado especial. Designa el conjunto de técnicas que permiten determinar la concentración de una sustancia en solución por la medida de la cantidad de luz que es capaz de absorber, dispersar o transformar dicha solución. (véase esquema)

Es corriente dar a la fotometría un significado



coloreada, cuando se observa bajo el espesor de 1 cm.

Para transformar  $\Sigma_0$  en  $\Sigma$  habría que efectuar la reacción en 100 ml.  $\frac{1\%}{1 \text{ cm.}}$

El  $\Sigma_0$  es una convención destinada a simplificar las operaciones en análisis fotométrico. Su valor no puede generalizarse; es aplicable sólo al método para el cual se determinó.

más restringido refiriendo a ella, únicamente, las técnicas espectrofotométrica y fotocolorimétrica.

La determinación cuantitativa por fotometría, de una sustancia coloreada en solución (sustancias naturalmente coloreadas o incoloras capaces de originar compuestos coloreados) se basa en que la intensidad de la coloración es proporcional a la con-

centración, es decir, en el cumplimiento de la ley de Beer. Esta determinación puede efectuarse de dos maneras:

a) Comparando el color de la solución ensayo con el de otra de la misma sustancia y de concentración conocida. Se emplean colorímetros u otros dispositivos a luz blanca. Esto constituye la colorimetría.

b) Determinando la cantidad de luz absorbida por la solución coloreada en una región del espectro definida por su longitud de onda, en aparatos llamados en conjunto absorsiómetros (espectrofotómetros, fotocolorímetros, colorímetros fotoeléctricos)

que exigen luz monocromática. En colorimetría se compara la intensidad de color del haz emergente de la solución ensayo, con la del haz emergente de la solución tipo. Se busca igualdad de coloración.

En espectrofotometría se mide la intensidad luminosa del haz emergente de la solución ensayo en relación a la intensidad luminosa del haz incidente. Se busca igualdad de iluminación.

No trataremos aquí la colorimetría ni las otras técnicas fotométricas turbidimetría, nefelometría, fluorescimetría, para ocuparnos de las generalidades de la fotocolorimetría y del fotómetro de gradación de Puldrich. (Continuará en el próx. número)

## METODO PARA LA DETERMINACION DEL PRINCIPIO VASO PRESOR DEL LOBULO POSTERIOR DE LA HIPOFISIS

Por el Dr. AMERICO S. ALBRIEUX

Existen numerosos métodos para la determinación del principio vaso-presor del lóbulo posterior de la hipófisis.

Métodos basados en el aumento de la presión arterial han sido descriptos por Hoghen, Schilap, y MacDonall (1), quienes utilizan el gato decapitado; Swanson (1922) (2), emplea el gato anestesiado con amital, Kamm (1923) (3), el perro anestesiado con cloretona y Simmon (4), la rata decapitada.

Otros métodos se fundan en la acción vasoconstrictora en la oreja aislada del conejo o la de la cabeza del mismo (Heymans) (5).

Un tercer grupo se funda en la acción antidiurética de la hormona y emplean perros con fistulas vesicales y ratas y ratones normales.

Un último grupo de métodos se basan en la acción de la hormona sobre el intestino aislado del cobayo (Simmon, 1933) (6) y sobre el intestino del conejo "in situ".

Estudiando la acción farmacológica del extracto del lóbulo posterior de hipófisis de bovino en conejos, se observa algunos minutos después de la inyección intravenosa, que se produce una abundante micción en la mayoría de los animales. Estos resul-

tados se producen también cuando se utilizan extractos purificados en los cuales se encuentran las hormonas ocitóxicas y vasopresora.

Teniendo en cuenta la acción estimulante de la pituitrina sobre el músculo liso de la vejiga y sobre el intestino delgado y grueso, continué estas investigaciones utilizando hormona vasopresora purificada, vasopresina, pitresín (Betahipofamina) de los Laboratorios de Parke Davis.

La observación de animales laparotomizados muestra que a los pocos minutos de la inyección del lóbulo posterior o de pitresín se producen contracciones intestinales y que la vejiga se contrae, lenta y progresivamente, hasta tomar el tamaño de una nuez pequeña y de consistencia dura: este fenómeno es acompañado o seguido de micción.

La inyección sistemática de dosis decrecientes de hormona por vía intravenosa y diluida con 1 cc. de suero fisiológico a conejos de 1 a 2 kilos de peso provoca la micción de más de la mitad del número de animales inyectados hasta con dosis de 0,25 U.I. en el período de tiempo de treinta minutos.

Experimentos controles realizados en animales inyectados con suero fisiológico solo o con 1 U. de hormona disuelta en suero fisiológico y tratada por alcalis dieron resultados negativos. (cuadro N° 1, experimentos N.os 10 y 11)

Teniendo en cuenta que previamente a la iniciación del experimento, algunos conejos podrían tener la vejiga vacía, hecho que conduciría a resultados negativos, a pesar de recibir una dosis efectiva,

(1) El autor agradece al Prof. J. C. Chiarino y al personal del Laboratorio de Química del M.S.P. por su valiosa colaboración en la realización de este trabajo, así como al Sr. E. Marquez Castro y Cía., representante de los Laboratorios Parke Davis.