

UN METODO DE TRABAJO
CON LOS NUEVOS COLORÍMETROS
A CELULA FOTOELECTRICA

DR. EDUARDO ARROYO SEYLLA
Consejero del Institute de Estudios Giennenses

El entusiasmo con que se ha acogido la Electro-foto-colorimetría en los Laboratorios Clínicos y el apresuramiento de los analistas para abandonar la clásica colorimetría visual, se acostumbra a justificar por dos razones: una, la innegable ventaja de emplear para la apreciación cromática, en vez de la visión humana, nunca perfecta y segura, la del *ojo* fotoeléctrico, de automática precisión, y la otra, la posibilidad de calibrar los aparatos previamente para las diferentes técnicas, con objeto de ahorrarse en lo sucesivo la elaboración de un testigo, con el que la solución problema deba compararse, lo que es condición básica en la colorimetría visual. El auge actual de la colorimetría con los aparatos de célula fotoeléctrica parece, pues, bien afirmado y no es de esperar que sea efecto de un capricho, más o menos pasajero, de la moda, que también en lo científico la hay y pocos con criterio propio resisten a la sugestión de su espejuelo. Recuérdese, si no, aquella *época microanalítica*, en la que ningún analista, que se estimara en algo, dejó de adquirir la balanza de torsión, los diversos accesorios, la copiosa vidriería calibrada y, tras muchas dificultades y malos ratos, también la triste experiencia suficiente para convencerse de lo poco o nada práctico del engorroso procedimiento, para abandonarlo seguidamente por completo, y ¿quién se acuerda ya de los microanálisis? No, a los nuevos aparatos colorimétricos no les ocurrirá igual, porque les basta con la primera de las dos ventajas que hemos indicado, o sea, la del automatismo y precisión del ajuste cromático, para imponerse en el porvenir, pero, en buena ciencia, ¿es igualmente intachable la segunda cualidad enumerada, o sea, la de poder prescindir de un testigo simultáneamente operante? De esto es de lo que, con algún detenimiento, vamos a tratar.

Empecemos por recordar los dos métodos de precalibración utilizados en la práctica, el llamado del «factor fijo» y el de las «tablas o curvas», hablando de sus relativas ventajas e inconvenientes, para pasar, después, a la crítica global de todo el sistema de precalibrado.

Método del «factor fijo».—Para calibrar cada técnica se opera con una solución testigo de concentración conocida, que se procura sea aproximadamente la media normal y se anota el número que señala en la escala logarítmica del aparato. Dividiendo la concentración del testigo por este número, se obtiene un cociente, que es el llamado «factor». En lo sucesivo, bastará multiplicar la señalación logarítmica de la solución problema por el «factor» en cuestión, para obtener la concentración que se busca.

Este método adolece del grave defecto de que no es aplicable más que a las soluciones que sigan la ley de BEER y solo en la zona, a veces no muy extensa, en que la sigan.

Método de las «curvas».—Se actúa para la calibración con una serie de testigos (mientras más numerosa, mejor) de concentraciones sucesivas, en escala gradual, que abarque, en lo posible, la zona patológica corriente. Se practica con ellos simultáneamente la técnica y se toma nota de las señalizaciones que den en la escala centesimal (1). Se prepara a continuación un papel milimetrado, como sistema de coordenadas, en el cual las abscisas se numeran con los grados de la escala del colorímetro y las ordenadas con las concentraciones del producto (o viceversa). Se pasan después a este papel las anotaciones obtenidas, señalando cada una de ellas con un punto, en la intersección de las líneas correspondientes, y se unen con un trazo continuo todos estos puntos, obteniéndose así la llamada «curva de calibración», que, si se quiere, puede trasladarse, traducida en números, a una «tabla», de más fácil lectura. Una vez obtenida la curva o tabla de calibración, no hace falta el testigo, sino mirar la señalación del líquido problema y leer su concentración en aquellas.

De los dos sistemas, el de las curvas es decididamente el más científico y lógico, porque prescinde por completo de la circunstancia de que el líquido problema siga o no la ley de BEER, a condición, naturalmente, de que la calibración se haya hecho con una nutrida serie de testigos. Entre uno y otro de ambos sistemas, éste debe ser el preferido y en efecto, es el que emplea la mayoría de los analistas, aunque haya otros (KOLMER, BOERNER, etc.) que utilizan el del «factor fijo».

Universalmente admitido y en práctica diaria el sistema de precalibración, en sus dos modalidades, parecerá, sin duda, manifiesta osadía el intento de señalarle defectos. La apariencia científica de exactitud y la realidad de su aceptación general son valedores muy poderosos y sin embargo...

(1) Es sabido que los aparatos acostumbran a traer dos escalas, una centesimal y otra logarítmica.

El hecho fundamental que creemos hiere gravemente todo el sistema de precalibrado, es el de *que éste se efectúa en un determinado momento y el análisis en otro posterior, más o menos distante del primero.*

En realidad, el método de precalibración es el mismo ordinario comparativo de testigo y problema, de la colorimetría visual, pero, así como en ésta se cumple rigurosamente la exigencia científica y lógica de que los dos productos que han de compararse se encuentren *en las mismas exactas circunstancias*, en las precalibraciones estas circunstancias pueden haber variado, induciendo a error notorio, como vamos a ver. Las causas de estas variaciones pueden depender del aparato, del técnico y de los reactivos.

El aparato.—Aún el colorímetro más perfecto puede sufrir variaciones de un tiempo a otro, por influencias ambientales, por debilitamiento de la lámpara excitadora, que cambie algo la *temperatura de color* de la misma, por cansancio de la célula, que altere su proporcionalidad de respuesta, o por otros sutiles imponderables, lo que obliga a una revisión periódica del mismo, controlando si responde igual a testigos estables, para, en caso negativo, repetir las calibraciones. Obvio decir que éstas tendrán también que repetirse, cuando, por haberse fundido la lámpara excitadora, haya que sustituirla y hasta cuando, por cualquier motivo, haya que desmontarla o simplemente moverla, ya que el más ligero cambio de posición puede modificar todo el mecanismo de respuesta.

El técnico.—Ni el analista más hábil y entrenado puede practicar una técnica en distintos momentos con la igualdad que lo haría si la simultaneara. Si el trabajo no es de una sencillez extrema, los diferentes periodos de ejecución (tiempos de calefacción, agitación, centrifugación, etc.) no pueden tener la igualdad que hechos a la vez en dos o más productos.

Los reactivos.—Es, sobre todo, la alteración de los reactivos la causa de error de más consideración en la fotocolorimetría precalibrada. A no ser que se trate de un solo producto químico inalterable o de un reactivo de gran sencillez y estabilidad, todos o casi todos sufren cambios, que pueden influir en los resultados. De ahí que coincidan todos los prácticos en aconsejar —mejor diría, *ordenar*— que se repitan las calibraciones con mucha frecuencia, nunca excesiva, y, desde luego, siempre que se renueven los reactivos, aunque se elaboren con los mismos productos de origen.

Como se acaba de ver, las posibilidades de error con el sistema de las calibraciones no son ilusorias. Aparte de los motivos expuestos, el hecho de que todos los autores, con unanimidad absoluta, exijan la repetición frecuente de los calibrados, evidencia su seca realidad. Tan cierto es ello, que pudiera darse como axiomática la conclusión de que «la veracidad de un resultado colorimétrico dependerá de la frecuencia en el control del calibrado».

No se crea, por lo dicho, que el sistema sea malo. Al contrario,

es excelente y puede considerarse como una adquisición valiosísima en la moderna práctica analista, pero a *condición inexcusable* de ese frecuente control. En defensa del método está la consideración de que, a pesar de la influencia de sus defectos y aunque coincidieran todos en un mismo sentido de desviación falseadora, casi siempre quedará el resultado dentro de una zona prácticamente aprovechable. Sin exigirle, pues, al método la infalibilidad, que la teoría parecía otorgarle, debe declararse que su utilidad real es cierta y considerable y su aceptación general, justificadísima. A esto contribuye también *un poco* el sugestionador atractivo de la rapidez y la comodidad. Poner el tubo con el líquido resultante en el aparato, mirar la aguja y ver, en el acto, en la tabla, la concentración, es cosa encantadora. Tan atrayente es, que se corre el peligro de olvidarse (o no querer ver) que esa comodidad *hay que ganarla* con la *incomodidad*, que, como compensación, impone la necesidad de la repetición del calibrado con la frecuencia que, en muy primer lugar, pueda exigir la conciencia severa o... elástica del analista.

* * *

Admitida y elogiada en el terreno práctico la gran utilidad de la fotocolorimetría precalibrada, surge después esta cuestión: puesto que una precalibración no recientemente controlada presenta una inseguridad, que intranquiliza al analista, ¿por qué en los casos de duda y cuando no hay tiempo para el control debido, no se practica como la visual, o sea, con un testigo, que garantice un resultado correcto? Lo ideal sería trabajar siempre con él, puesto que con él se eliminarían todas las causas de error antes enumeradas. Ejecución técnica, *situación funcional* del aparato y reactivos actuarían con exactísima igualdad en problema y testigo, con la ventaja sobre la visual del más perfecto ajuste cromático. Supongamos que decidiéramos proceder así. ¿Qué método de trabajo emplearíamos? ¿El de un testigo actuando como «factor» según el procedimiento de calibrado por el «factor fijo» que ya explicamos? Parece lo más lógico, pero no sería aplicable, ya lo dijimos, más que a las soluciones que se ajusten a la ley de BEER. En las que no obedezcan a esa ley o no se sepa si están o no regidas por ella el método sería recusable en absoluto.

En nuestro trabajo diario particular utilizamos el procedimiento general de precalibración con tablas, pero en aquellos casos, a veces urgentes, cuya técnica no tenemos calibrada o dudamos de su estabilidad, hemos puesto en práctica un método, en el que se trabaja con un solo testigo y que se nos ha mostrado muy útil, fácil y seguro. Su fundamento no es nada nuevo, puesto que se emplea en colorimetría visual corriente. Es el llamado «de dilución». La originalidad del nuestro está en utilizar el fotocolorímetro eléctrico para el ajuste de la igualdad de colores y *SOLO PARA ESO, pero no para medir nada*, porque la valoración de los resultados se obtiene des-

pués e *independientemente del aparato*, deduciéndola de la relatividad entre los volúmenes del problema y testigo. Su sencillez, la ausencia práctica de todo motivo cotizante de error y sus buenos resultados, junto con el hecho de no tener, hasta ahora, noticias, ni orales, ni de lectura (tratados y revistas de la especialidad) de que se haya publicado, nos deciden a airearlo en esta excelente y simpática revista, por si los colegas especializados lo juzgan interesante y quisieran ensayarlo. No pensamos, claro, dada la modestia de nuestro nombre, en reclamar derecho alguno de original paternidad, ni mucho menos en que se erija en método general, sino solo en que pueda servir de procedimiento auxiliar para aquellos casos, repetimos, en que no tengamos calibrado previo o en el que, por falta de control reciente, no se deba confiar.

TÉCNICA

Hacen falta; Tubos colorimétricos especiales, una pipeta aforada) otra corriente, (ambas con pera de goma), un minúsculo agitador y una reglita milimetrada. Estos utensilios deben tener cualidades determinadas, que pasamos a detallar:

Los tubos colorimétricos.—Se utilizan tubitos de buen vidrio incoloro, de paredes delgadas y fondo plano (condición precisa), de unos 8 a 9 cm. de largo y 8 a 9 milímetros de luz (1). Requieren exacta igualdad, por parejas, en calibre y en transmisión fotoeléctrica. Lo mejor y más barato es encargar unas docenas de ellos a una fábrica de vidriería fina, insistiendo en su igualdad, sobre todo, en el *calibre* (la longitud no tiene tanto interés). Para comprobación, póngase a todos una misma cantidad de agua, exactamente medida, que venga a ocupar, aproximadamente, las $\frac{4}{5}$ partes de su cabida. Colóquense verticalmente sobre un plano horizontal y sepárense, por grupos, los del mismo nivel. A continuación se vierte en los tubos de cada grupo un mismo líquido coloreado y se van examinando en el colorímetro sus transmisiones, seleccionando en subgrupos los que den la misma, sin olvidar señalarles la marca de la incidencia en que deban colocarse en el aparato. Guárdense separados estos subgrupos, para tomar de cualquiera de ellos, en lo sucesivo, la pareja necesaria para cada investigación.

La pipeta aforada.—La medida del aforo se averigua del modo siguiente: Colóquese uno de los tubos, vacío, en el aparato, enciéndase éste y, con el botón de mando, póngase la aguja entre el 70 y el 80 de la escala centesimal. Con cualquier pipeta, cargada de un líquido fuertemente teñido u opaco vayan vertiéndose gotas de éste dentro del tubo, muy poco a poco, mientras se observa la aguja, que se irá des-

(1) Dimensiones que pueden modificarse para adaptarlas al aparato que se use.

viendo paulatinamente, hasta que se detenga y una gota más no la mueva. Después de esa gota, viértanse *dos más*. Sáquese el tubo y midase el volumen del líquido contenido. Este volumen es el del aforo conveniente. Téngase cuidado de marcarlo exactamente, procurando, sobre todo, que no sea menor. (Un ligerísimo aumento no perjudica).

La pipeta corriente.—No se necesita calibrada. Sirve una cualquiera de extremidad afilada y pera de goma.

El agitador.—Debe ser de varilla muy delgada, de longitud unos centímetros mayor que la de los tubos. Uno de los extremos debe aplastarse (previo reblandecimiento en la llama) para formarle una pequeña expansión o paletita.

La regla milimetrada.—Puede utilizarse un doble decímetro de madera o pasta al que se corta su extremo inicial un milímetro exactamente antes del cero, con objeto de que, al medir el nivel de un líquido en los tubos, se elimine el grosor del fondo de éstos.

Operación.—Terminada la técnica, ejecutada simultáneamente en problema y testigo, tómesese una pareja de tubos iguales y después de marcar uno de ellos P (problema) y el otro T (testigo), viértase, con la pipeta aforada, el volumen exacto del aforo de cada uno de los líquidos en los tubos correspondientes y llévase al colorímetro el del líquido más pálido, anotando la señalación que dé en cualquiera de las dos escalas (es indiferente, aunque la centesimal es preferible, porque se lee mejor). Cámbiese rápidamente el tubo por el otro más oscuro y, con la pipeta corriente, cargada del solvente, váyase añadiendo éste, mientras se mezcla el líquido con el agitador y se observa la desviación de la aguja, hasta que llegue a situarse en el número que señaló el tubo primero. Vuélvase este tubo primero otra vez al colorímetro para ver si su señalación sigue siendo la misma, en cuyo caso se dá por terminada la operación. Si, por el contrario, se notara algún cambio, se hace un *retoque* final de la igualación, añadiendo el solvente que precise al tubo que lo necesite. En los fotocolorímetros que tienen «deslizadera» (como el «Unicam», con el que trabajamos), se colocan en ella los dos tubos y el cambio del uno al otro es instantáneo y la comparación y ajuste se hacen con extraordinaria rapidez.

Toda la maniobra es sencillísima y se domina bien desde los primeros ensayos. Para su más fácil manejo conviene ejecutarla con arreglo a los siguientes detalles:

Los brazos deben apoyarse en la mesa que sostiene el aparato o en éste mismo, para obtener una buena estabilidad. Con una mano se sostiene la pipeta con el solvente y con la otra el agitador. La punta de la pipeta debe estar apoyada sobre la pared interior del tubo, cerca de su borde y permanecer así, sin sacarla durante toda la operación, para que, a una suave presión de la pera de goma, el líquido fluya, *sin dar gotas*, deslizándose babeante por la pared del tubo. Simultáneamente y con la mano que sostiene el agitador, cuya paletita está sumergida en el líquido, se imprime a aquél un movimiento combinado de rotación y de ascenso y descenso y, de vez en cuando *sin*

sacarlo del tubo, se eleva por encima del nivel del líquido (pegado a la pared para que escurra) y se observa el movimiento de la aguja, hasta que llegue al número de la igualación. Procediendo así se consigue muy pronto una especie de virtuosismo de maniobra que hace que la aguja se desvíe con la rapidez o lentitud que se desee y de modo *suavemente* continuo, con solo la presión de la pera y no con brusquedades o saltos, si la adición del solvente fuera a gotas.

Lectura de los resultados.— Terminada la técnica se retira el agitador escurriéndole bien en el tubo en que se halle y se mide con la reglita milimetrada el nivel del líquido resultante en ambos tubos. Para ello, se colocan éstos, junto con ella, verticalmente, sobre un plano horizontal (1). El resultado, o sea, la concentración del líquido problema, se obtiene deduciéndolo de la siguiente fórmula, en la que AP es la altura del líquido problema, AT, la del testigo, CP, la concentración del líquido problema, o sea, la incógnita que se busca, y CT, la concentración del testigo:

$$CP = \frac{AP \times CT}{AT}$$

Nota.— Pudieran hacerse al método dos reparos. El primero, solo aparente, sería el que, desarrollándose la intensidad del color, en algunos casos, en un tiempo determinado, a veces corto, que hay que aprovechar para la colorimetría, la medida de ésta puede haber variado en el primer tubo (más pálido) mientras se hace la dilución necesaria en el otro más oscuro. Se podría responder que la maniobra del ajuste cromático, procediendo como hemos indicado, es tan rápida, que apenas habría que pensar en esta posibilidad, pero ésta se ha tenido también en cuenta en la técnica y queda completamente eliminada con el *retoque* final, que iguala la coloración en ambos tubos.

Otro reparo sería el que la dilución con el solvente no parece estrictamente científica. Lo sería, en cambio, con un *blanco*, o sea, con el solvente que haya pasado por todos los tiempos de la técnica. Teóricamente, el reparo es válido, pero en la práctica, los resultados con el solvente *crudo* o con el *blanco*, son idénticos.

RESUMEN

Se presenta un método de trabajo con los fotocolorímetros eléctricos, operándose con un testigo, como en la colorimetría visual, en su modalidad llamada «de dilución», pero utilizando la automática

(1) La medida del nivel debe tomarse en el punto equidistante entre el centro cóncavo, del menisco y su periferia más alta.

precisión de la célula fotoeléctrica, para el ajuste de la igualdad de colores, todo lo que da a los resultados una exactitud y garantía máximas. Este método se propone como auxiliar del de las precalibraciones, para aquellos casos en que éstas no se tengan hechas o en que, por no ser recientes, hayan perdido validez.