

R. Esp. Fisiol.
Tom. I, núm. 1, páginas 77 a 87. 1945.

Cátedra de Fisiología de la Facultad de Medicina de Barcelona
(Prof. Juan Jiménez Vargas)

Nuevas aplicaciones biológicas de la fotometría fotoeléctrica

J. JIMÉNEZ VARGAS y J. MONCHE ESCUBÓS

Parte teórica

Desde hace tiempo, vienen empleándose con notorio progreso los métodos de la fotometría fotoeléctrica, para el estudio de toda clase de fenómenos caracterizables por variaciones de propiedades ópticas de la materia, capaces de transformación en corrientes fotoeléctricas, mediante células de sensibilidad adecuada a la longitud de onda de la luz incidente.

Ya P. P. Koch (1), en el año 1912, registraba sobre papel sensible al bromuro, las variaciones de intensidad de corrientes procedentes de un fotómetro fotoeléctrico, mediante un galvanómetro de cuerda, para obtener así las gráficas del proceso estudiado.

Con el tiempo se han ido perfeccionando tanto estos métodos que en la actualidad constituyen sin duda uno de los recursos poderosos de la investigación (2), habiendo sido incluso aplicados recientemente por J. M^a. G. Barredo y S. Senent (3), al estudio de velocidades de reacción. Precisamente, la labor desarrollada por ambos investigadores en tal sentido, nos sugirió la idea de extender dichas técnicas a las investigaciones biológicas, a cuyo fin obedece el aparato que se describirá más adelante, debido a nuestra propia iniciativa.

Dejando, pues, aparte, otras aplicaciones especiales de la

fotometría fotoeléctrica, nosotros trabajamos con luz procedente de una lámpara eléctrica corriente, empleando al efecto las clásicas células de selenio, suficientemente sensibles para nuestro objeto. La corriente fotoeléctrica resultante se envía a un galvanómetro de espejo (tipo balístico), para registro automático de las indicaciones del mismo sobre papel fotográfico mediante un quimógrafo.

Constituido así, esencialmente, el aparato empleado por nosotros, es evidente que las causas de error derivadas, por ejemplo, de la inercia del galvanómetro, además de otras propias sobre todo de los métodos colorimétricos (4) y debidas a la naturaleza del medio estudiado (fenómenos de disolvatocromia (5), de cromisomería (6), de termotropía (7) y de fototropía (Marckwald, 1899)), obligarían en general a un detenido examen de cada proceso, para poder llegar en nuestro concepto, a resultados absolutos aceptables, mayormente dada la frecuente complejidad de los medios orgánicos de interés biológico.

Teniendo, pues, en cuenta estos hechos, nosotros no aplicamos los métodos de la fotometría fotoeléctrica a determinaciones cuantitativas absolutas, sino relativas (método diferencial), operando, naturalmente, dentro de la máxima identidad de condiciones experimentales, por tratarse, además, de una norma de carácter general en toda clase de investigaciones biológicas, para la interpretación de cuyos procesos suelen ser siempre de mayor interés los valores relativos que los absolutos, dado el número de factores que influyen sobre los mismos, con frecuencia tan difíciles de reproducir experimentalmente.

Sirve, pues, cumplidamente, para nuestro objeto, un dispositivo tan sencillo como el reproducido más adelante esquemáticamente en este trabajo, con el que nos proponemos incluso estudiar variaciones de poderes rotatorios, intercalando al efecto en el aparato un filtro para luz monocromática, con polarizador y analizador sencillos, o incluso *dos turmalinas*, situados a ambos extremos de la cubeta tubular que contiene el sistema a investigar.

Previamente hemos realizado ensayos encaminados a adaptar al efecto un polarímetro corriente, substituyendo el ojo del observador por una célula fotoeléctrica de las utilizadas en los equipos de cine sonoro. La extraordinaria sensibilidad de las mismas, unida a la considerable absorción de la luz por los

sistemas ópticos de dichos aparatos y por la substancia a investigar, así como a la circunstancia de funcionar con luz monocromática, hace difícil o, cuando menos, bastante delicada, la puesta a punto de un método semejante, no siendo, pues, preciso, por otra parte, recurrir a tales complicaciones, dada la posible sencillez, ya mencionada, de nuestros aparatos.

La aplicación de los métodos fotoeléctricos a la polarimetría ha sido ya efectuada por LANGE (8), mediante su fotopolarímetro. Se trata, en tal caso, de determinaciones polarimétricas corrientes, mas no, en cambio, de registro gráfico de poderes rotatorios variables, en sistemas caracterizados, precisamente, por dicha variación del plano de polarización de la luz durante cada experiencia, cual ocurre, por ejemplo, en fenómenos como el de la inversión de la sacarosa y en infinidad de procesos biológicos del mayor interés, que han de ser objeto de atención especial por nuestra parte en otros trabajos en curso.

Tenemos también en estudio la aplicación de nuestros aparatos a la investigación de variaciones de índice de refracción, previas las modificaciones correspondientes, cuyas variaciones son de importancia extraordinaria para el esclarecimiento de muchos procesos bioquímicos, dada la aditividad del índice de refracción como propiedad característica de la estructura molecular, susceptible de permitir, por lo tanto, en determinados casos muy interesantes, registrar fotográficamente variaciones semejantes provocadas por cambios de estructura molecular de substancias lábiles — labilidad característica en las de mayor trascendencia biológica —, durante un proceso experimental. Tales cambios ofrecen verdadero interés cuando se realizan en medios biológicos, como es sabido, ya que gracias a los mismos, provocados por ligeras variaciones físico-químicas de dichos medios, puede después sufrir la materia transformaciones tan considerables como las que experimenta bajo la suave acción de las enzimas.

No sería, pues, suficiente para la aplicación de estos métodos a la deducción de valores absolutos, que un sistema en equilibrio siguiera, por ejemplo, la ley de BEER-LAMBERT, en determinadas condiciones, sino que precisaría también que ello ocurriera durante el desplazamiento de ese equilibrio e incluso una vez alcanzado el estado final, ya que el registro automático de gráficas correspondientes a tales fenómenos constituye

una de las finalidades esenciales de dichos métodos, del mismo modo que el posible registro de las desviaciones de la indicada ley durante un proceso experimental, para el conocimiento del mismo.

Aparte de la aplicación del método al registro directo de gráficas del contenido en anhídrido carbónico del aire expirado por un organismo animal a intervalos regulares de tiempo, de tan extraordinario interés para el estudio de los problemas de metabolismo, tenemos en curso investigaciones sobre la marcha del crecimiento de colonias de microorganismos en diversos medios de cultivo, así como de la acción inhibidora o activadora de varios agentes químicos y biológicos sobre dichas colonias, todo ello, por simple registro automático de enturbiamiento (9).

En la parte experimental reproducimos parcialmente una gráfica de anhídrido carbónico expulsado con el aire expirado después de una inspiración profunda, que ha de ser objeto de otras publicaciones, al igual que nuestros trabajos sobre crecimiento de colonias de microorganismos, ya en cierto modo iniciados hace unos meses al estudiar la acción inhibidora de la penicilina sobre la ureasa, aisladamente y en presencia de otras combinaciones de función amídica o diamídica (10).

Conforme exponemos más adelante, dichas gráficas no suelen representar, según los ensayos, un solo proceso, sino la resultante de todos los procesos que ocurren conjuntamente en el interior del recipiente del aparato durante cada experiencia. La interpretación de las mismas no ha de ser, pues, sencilla, en determinados casos.

Parte experimental

Descripción del aparato:

Conforme se observará en el esquema del fotómetro empleado, que se incluye a continuación, consta el aparato de una linterna especial L, interiormente de paredes pulimentadas y con una gran superficie exterior de refrigeración por aire, que contiene una lámpara de 6 voltios, de las utilizadas para faros de automóviles. Dicha lámpara puede alimentarse indistintamente con acumuladores o mediante la corriente procedente de un transformador-reductor con circuito de regulación automática de tensión, cuyo primario comunica con la red de corriente in-

dustrial de 125 voltios, sin observarse, en tal caso, variaciones prácticamente apreciables para nuestro objeto sobre las indicaciones del galvanómetro, según confirmación experimental en la corriente fotoeléctrica correspondiente.

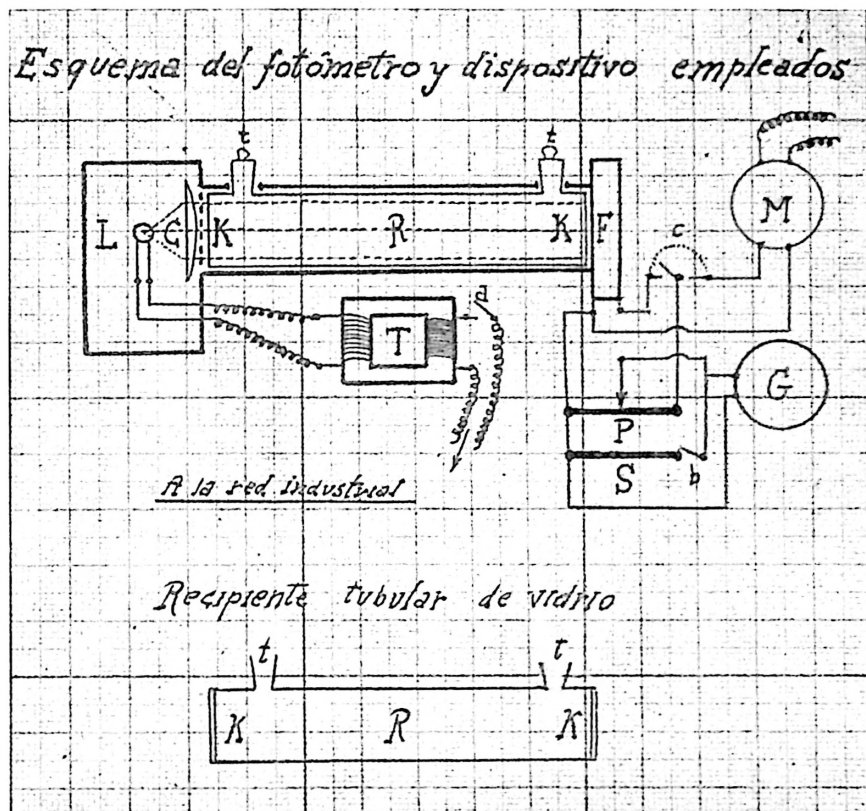


Fig. 1.

La luz de la lámpara pasa a través de un condensador C , constituido a base de una lente acromática plano-convexa, que lanza un haz de rayos paralelos sobre la célula fotoeléctrica F , a través del medio contenido en el recipiente R de vidrio y forma tubular, perfectamente cilíndrica, cuyas dos caras planas K , opuestas, son de vidrio óptico completamente uniforme.

La célula fotoeléctrica F , de selenio, procede de un fotómetro «Electro-Bewi», de los empleados en cinematografía y fotografía. Desmontado este aparato y separada la célula, se adapta la misma a un tubo semejante al porta-tubos de un polarímetro, unido a su vez por el extremo opuesto a la linterna L ,

y formando el conjunto un mismo cuerpo desmontable que descansa sobre el transformador T .

El porta-tubos sólo forma dicho cuerpo con el resto del aparato en su mitad longitudinal, de modo que la mitad superior, totalmente separable del mismo, sirve de tapadera, mediante las correspondientes muescas de ajuste, a fin de permitir cómodamente el paso de las dos bocas t del recipiente R de vidrio a través de los dos orificios de que va provista al efecto la indicada tapadera, pudiéndose, por lo tanto, cambiar sin dificultad y con gran rapidez un recipiente por otro.

Cada recipiente está constituido por un tubo de vidrio, cuyas dos caras planas externas K , se hallan sólidamente adheridas mediante los correspondientes aros. En su parte superior lleva dos bocas t , de vidrio esmerilado y tronco-cónicas para perfecto ajuste de los tapones de vidrio respectivos, bien de cierre hermético o bien tubulados, a fin de poder hacer circular líquidos o inyectar gases a través del recipiente R durante las experiencias.

Dichos recipientes son, pues, muy semejantes a los tubos polarimétricos, salvo en lo concerniente a las bocas t . Por lo demás, todo el aparato en sí se halla constituido, en líneas generales, de modo que recuerda bastante los detalles constructivos de un polarímetro. Tanto la mitad longitudinal del porta-tubos del aparato como la tapadera correspondiente, se hallan interiormente *pavonadas en negro*.

Con tal dispositivo, es evidente la regularidad de iluminación del medio a examinar y se asegura, por lo tanto, una perfecta recepción del haz de rayos por la célula fotoeléctrica.

Debido a las dificultades *de perfecta calorifugación del aparato* para trabajar a temperatura constante, mediante sistemas de calefacción adecuados, hemos logrado evitar tales inconvenientes introduciéndolo en una estufa similar a las de cultivo, dispuesta al efecto, en la que se realizan las experiencias correspondientes, operando, pues, a la temperatura constante que más convenga en cada caso.

La estufa lleva unos bornes con salida al exterior, que permiten conectar dos fotómetros desde el interior de la estufa con la red industrial y con el galvanómetro y poder así operar cómodamente en tales condiciones.

Dado el interés — ya expuesto en este trabajo — de efectuar experiencias de tipo comparativo, disponemos a tal fin de dos

fotómetros idénticos para operar con ambos desde el interior de la estufa en iguales condiciones experimentales.

Las dos reproducciones fotográficas que se incluyen a continuación, ilustrarán al lector sobre nuestro fotómetro, cuya

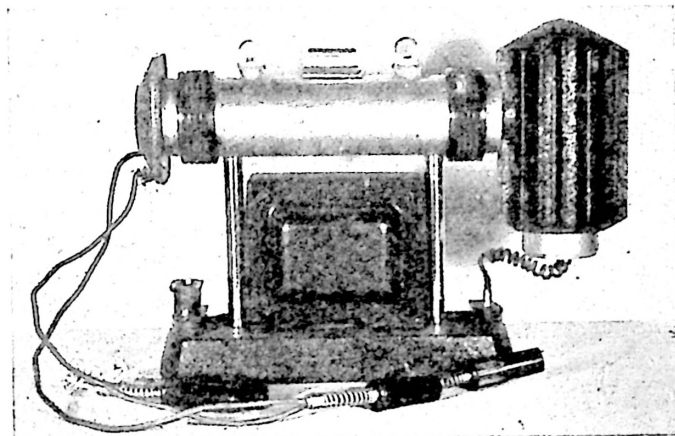


Fig. 2.

Fotómetro cerrado, con su cubeta tubular en el interior y en disposición de funcionar.

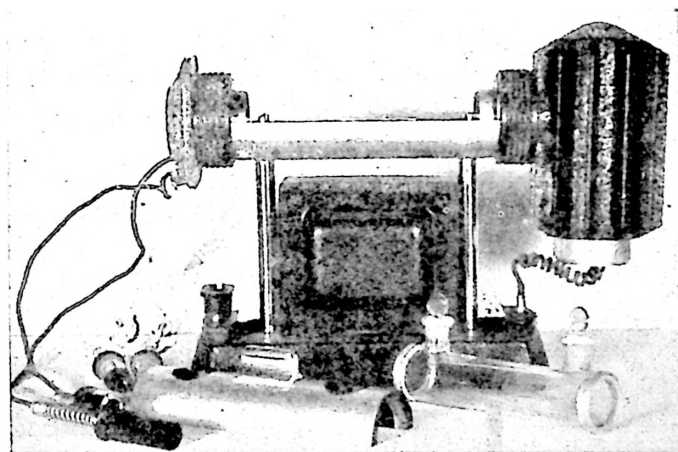


Fig. 3.

Fotómetro destapado, con sus correspondientes cubeta tubular y tapaderas al lado.

construcción, esmeradísima, ha sido efectuada por los talleres de óptica y aparatos científicos de la casa J. Ganzer de esta plaza.

Las dimensiones interiores de los recipientes (cubetas) tubulares que empleamos son de 25 mm. de diámetro por 115 mm.

de longitud. No las hemos construido mayores porque ello requeriría disponer de dos fotómetros de tamaño superior, no necesarios, por ahora, para nuestros trabajos en curso.

Práctica experimental

Dispuestos los dos fotómetros en el interior de la estufa con el recipiente que contiene el medio a investigar y efectuadas ya todas las conexiones, se ponen en comunicación las salidas de la respectiva célula fotoeléctrica del fotómetro detallado en el esquema y del fotómetro idéntico *M*, así como la entrada del galvanómetro *G*, con un cuadro de mando que consta de un shunt *S*, de una resistencia regulable de las empleadas en radiotecnica *P*, montada en forma de potenciómetro; de un interruptor *b* y de un conmutador *c*, cuyo conmutador permite hacer funcionar alternativamente, a voluntad, el galvanómetro *G*, con cualquiera de los dos fotómetros en marcha (el que se detalla en el esquema y el fotómetro *M*), o incluso interrumpir el paso de cualquiera de las dos corrientes fotoeléctricas, al galvanómetro.

De los demás detalles operatorios referentes al manejo de nuestro dispositivo, ilustrará al lector convenientemente el referido esquema.

Gracias, pues, a dicho dispositivo, es muy rápida y sencilla la regulación del galvanómetro y la coincidencia del espejo del mismo con la posición que más convenga, todo ello mediante el indicado cuadro de mando.

Tan sólo a título puramente demostrativo, incluimos por fin dos gráficas (Figs. 4 y 5), obtenidas llenando los correspondientes recipientes *R* de una disolución transparente de hidróxido cálcico y adaptando a las dos bocas *t* de cada uno, más próxima y más distante de la linterna *L*, un tapón con tubo acodado introducido dentro del líquido y otro tapón con tubo de salida, para hacer circular, respectivamente, a través de cada disolución, una corriente de gas carbónico de aire espirado y otra de oxígeno.

Al inyectar a través del líquido por el primer tubo del anhídrido carbónico mezclado con aire espirado (Fig. 4), las variaciones debidas al burbujeo del gas y al enturbiamiento progresivo que se va formando, se acusan claramente en la gráfica, con-

forme podrá observarse, sobre todo, por comparación con la otra gráfica que reproducimos (Fig. 5), y que ha sido obtenida, conforme se ha expuesto, inyectando oxígeno en idénticas condiciones. Por lo tanto, la misma no corresponde más que a un proceso de agitación del medio, debido al burbujeo del gas.

El proceso de enturbiamiento se aprecia claramente en la primera gráfica por el desplazamiento progresivo de la misma hacia uno de los extremos del papel, mientras que en la segunda la línea resultante no sufre desplazamiento alguno. Ambas gráficas figuran reproducidas en este trabajo a tamaño aproximadamente $\frac{1}{4}$ cuarta parte del original.

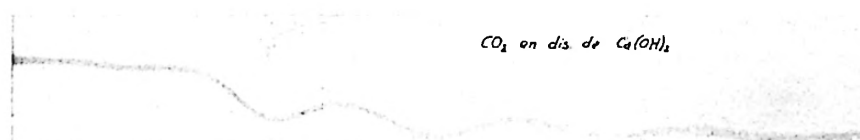


Fig. 4.

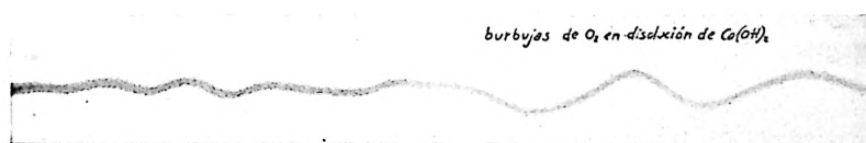


Fig. 5.

Evidentemente, representan, pues, dichas gráficas, en casos semejantes (Fig. 4), la resultante de todos los fenómenos que ocurren en el interior de la cubeta tubular durante cada experiencia y para poder comparar por lo tanto unos resultados con otros, bastaría disponer, por ejemplo, los dos fotómetros, el primero con agua de cal y el segundo con agua destilada como tipo, y hacer burbujear alternativamente el aire espirado por el mismo animal a través de ambos líquidos. Conviene, pues, a tal fin, graduar previamente la intensidad respectiva de ambas corrientes fotoeléctricas para que produzcan el mismo efecto inicial sobre el galvanómetro, cosa que se consigue fácilmente, por ejemplo, intercalando una resistencia regulable en el circuito.

Deseamos hacer constar, como consideración final, que la lámpara del fotómetro sólo debe funcionar durante los interva-

los de tiempo estrictamente indispensables para cada ensayo, en todos aquellos casos en que, como es lógico, precise operar a determinadas temperaturas. A tal fin, se dispone en cada aparato de un interruptor *a* que permite dejar todo el dispositivo en reposo siempre que así convenga.

Obtenidas las gráficas expuestas, de trazo excesivamente grueso por carecer todavía de lámparas de filamento adecuado o de una linterna supletoria, para la conveniente iluminación del espejo del galvanómetro al proyectar sobre un kimógrafo el haz de rayos reflejado por el indicado espejo, el examen de las mismas ilustrará suficientemente sobre las amplias posibilidades de aplicación práctica en biología de la fotometría fotoeléctrica, habida cuenta, además de la perfecta adaptabilidad de nuestro fotómetro al estudio de la variación de las constantes ópticas mencionadas en este trabajo, por haber sido todo ello ya previsto en el aparato desde su concepción.

Debemos hacer constar nuestro profundo agradecimiento a los profesores GONZÁLEZ BARREDO, de la Facultad de Ciencias de Zaragoza, y PÓLIT BUXAREU, de la de esta Universidad, por el apoyo que nos prestaron al iniciar el presente trabajo.

Resumen

Se describe un nuevo tipo de fotómetro fotoeléctrico previsto especialmente para el estudio de procsos biológicos, por cambios de coloración, transparencia o de poder rotatorio del medio en que los mismos se efectúen, y que permite, además, obtener las gráficas correspondientes sobre papel fotográfico móvil. Se halla, en un primer ensayo, la gráfica del enturbiamiento producido por aire espirado sobre una disolución de hidróxido cálcico, comparativamente con otro patrón.

Summary

It is described a new photoelectric photometer specially made for the study of biological processes whith which it is posible to register automatically, on mouving photographic paper, the corresponding processes. We obtain, in a first experment, the grafic representation of the trouble produced by CO_2 in a solution of $\text{Ca}(\text{OH})_2$, comparatively with a test.

Zusammenfassung

Man besch reibt einen neuen Typ eines photoelektrischen Photometers der besonders für das Studium biologischer Vorgänge vorgesehen ist. Er besitzt Farbenwechsel, Transparenz und Drehfähig-

keit des Mittels, in de sie sich vollziehen, und erlaubt ausserdem, die entsprechendn Graphikken auf beweglichen photographischen Papier zu erreichen. Man findet die Graphik der Trübung, die durch die ausgratmete Luft auf eine Lösung Ca (OH) 2 hervorgerufen wird, schon beim ersten Versuch, indem man sie mit einer andern Vorlage vergleicht.

Bibliografía

- (1). Ann. d. Physik, 39, 705 (1912).
- (2). P. WULFF (Grund. u. neuere Anwend. d. anal. Kolorimetrie u. Photometrie, 42-49, Verlag Chemie (1944)).
- (3). J. C. BARREDO y S. SENENT (Anales de Física y Química, 40, 21-41 (1944)).
- (4). R. HAVEMANN (ibid., 23-30, Verlag Chemie (1944)).
- (5). E. FISCHER (J. prakt. Chem., 113, 192 (1926)).
- (6). A. HANTZSCH (Ber., 42, 966 (1909)).
- (7). A. SENIER y F. G. SHEPHEARD (J. Chem. Soc. London, 95, 1943 (1919)).
- (8). BRUNO LANGE (Kolorimetrische Analyse-Verlag Chemie (Berlín, 1942)).
- (9). J. COVALEDA ORTEGA y J. JIMÉNEZ VARGAS: *Sobre acción de las toxinas del coli* (Medicina Clínica, en prensa); J. COVALEDA ORTEGA: *Cultivos del coli y disentericos*. — Estudio de factores inhibidores y aceleradores» (en preparación).
- (10). J. JIMÉNEZ VARGAS y J. MONCHE ESCUBÓS. (Trabajos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas correspondientes al año en curso y Revista Española de Fisiología, ambos en prensa).