

SOCIEDAD DE BIOLOGIA DE CORDOBA

Trabajos presentados en la reunión del 20 de Noviembre de 1934
(Presidencia del Prof. Ferdinando Strada)

- 1°.) Prof. Dr. Guillermo V. Stuckert: Los precipitados de sales de calcio en geles de gelatina y sus relaciones ósteo- y odontogénicas.
- 2°.) Sr. Raúl Velo de Ipola: Saliva y jugo gástrico. (*)
- 3°.) Dr. Sabino Di Rienzo: Fotocolorímetro eléctrico.

(*) Ver página 150 a 156 de esta Revista.

EXPERIENCIAS DEL ESTADO COLOIDAL

(Quinta, sexta y séptima contribución) (1)

LOS PRECIPITADOS DE SALES DE CALCIO EN GELES DE GELATINA Y SUS RELACIONES OSTEO- Y ODONTOGENETICAS

POR EL

Dr. Guillermo V. Stuckert

Hace ya siete años que fuera publicado nuestro trabajo sobre "*Los factores fisico-químicos de los ósteo- y odontogénesis*".

- (1) Las anteriores experiencias sobre el estado coloidal han sido publicadas en forma de artículos aislados en las revistas que citamos a continuación:

Primera contribución. Algunos nuevos fenómenos fisico-químicos en los geles. Guillermo V. Stuckert y Alberto Marsal. — Rev. de la Univ. de Córdoba. Año XI N° 7, 8 y 9. 1924.

Segunda contribución. Ueber rhythmische Reaktionen in U-Form. Guillermo V. Stuckert — Kolloidzeitschrift. Band XXXVII. Heft 4. 1925.

Tercera contribución. Acción de las sales sobre los geles. Guillermo V. Stuckert. Anal. de la Asociación Química Argent. Tomo XI. pág. 352. 1926.

Cuarta contribución. Algunas modificaciones de los precipitados periódicos del tipo Liesegang. Guillermo V. Stuckert. En "Investiga-

Era una monografía del conjunto de los conocimientos que hasta entonces se tenía de este asunto, ampliado con muchas experimentaciones propias (1).

Es muy difícil compenetrarse de todos los aspectos de la combinación ósea, orgánica e inorgánica, de tan alta diferenciación morfológica en los organismos de los vertebrados. En efecto, muchos de los fenómenos formativos de los huesos y de los dientes aún escapan a una imitación en condiciones biológicas aceptables, y su explicación fenomenológica es a veces precisa llenar con teorías o hipótesis de sus causas provocadoras.

En estos años, no hemos cejado en seguir el camino de tanto interés biológico, emprendido entonces y algunas de nuestras publicaciones, en especial sobre la forma de precipitados cálcicos, han merecido nuestra preferente atención. También, han contribuido algunos autores extranjeros a aclarar ciertos problemas de la misma índole, así citaremos los trabajos de Klinke (2), Guillaumin (3), Kay (4), Giuffré (5), y Antoniani y Usuelli (6).

Pienso, que en la futura reedición de la monografía sobre osteogénesis, se han de tomar en cuenta estas nuevas investigaciones junto con las nuestras.

En la forma, como se separa el tejido de nueva formación pétreo de sus circunvecinos, entresacamos los hechos sobresalientes siguientes: la precipitación concéntrica sistematizada alrededor de

ciones del Laboratorio de Química Biológica". 1er. tomo. pág. 208. Año 1932.

Quinta contribución. La obtención de los precipitados de sales de calcio en geles de gelatina. Guillermo V. Stuckert. Sesiones de Química de Buenos Aires. Agosto de 1934.

Sexta contribución. Los precipitados sistematizados de las sales de calcio y sus relaciones ósteo- y odontogénicas. Guillermo V. Stuckert. Comunicación a la Sociedad de Biología de Córdoba, 20 de Noviembre de 1934.

En esta publicación se encuentra reunido lo tratado anteriormente en la quinta y sexta comunicación, junto con nuevos datos que consideramos como séptima contribución.

- (1) G. V. Stuckert. *Contribución al estudio de los factores físico-químicos de la osteogénesis y odontogénesis.* Actas del Congreso Interno de la Facultad de Medicina. Año 1927. Córdoba.
- (2) Klinke. *Ergebnisse der Physiologie de Asher Spiro. Band XXVI. 235. 1929.*
- (3) Ch. O. Guillaumin. *Bul. Soc. Chim. Biol. XIV/1/85, 1932.*
- (4) Kay. en Luck. *An. Rev. of. Bioch. 1/187, 1932.*
- (5) Giuffré. *Biochem. Zeitsch. Band. 229/296.*
- (6) Antoniani y Usuelli. *XIV Cong. Inter. di Fisiol. Roma. 1932. pág. 9.*

los canales de Havers; la transformación del precipitado a gran dureza; y una consecuencia de mayor petrificación, que es la opalescencia o irisación, sobre todo del tejido esmáltico del diente con cierta analogía a las perlas o al nácar.

¿Cómo imitar *in vitro* estas transformaciones que se observan en la osteogénesis? Los fenómenos son tan complejos, que solo podemos obtener en los ensayos uno u otro cambio aislado y deducir así sus causas; naturalmente que lo más interesante es la forma de la separación cálcica insoluble.

Si hacemos difundir en un gel de gelatina de concentración entre 2 y 25 % a dos sales solubles, que actuando una sobre otra, provocan la precipitación de otra sal insoluble, por ej. entre el fosfato de sodio y el cloruro de calcio, con la obtención de cloruro de sodio soluble y del fosfato de calcio muy poco o nada soluble, entonces estos precipitados tienen apariencias distintas; por ej. es posible encontrar: 1°. precipitados difusos sin morfología o sistema alguno; 2°. precipitados cristalinos de diferente tamaño; 3°. precipitados periódicos en capas superpuestas (obtenidos en tubos), o en capas concéntricas, (obtenidos en placas), estas últimas a veces en relieve o en escritura (ver más atrás); 4°. precipitados parcialmente sistematizados en forma de un anillo difuso, espeso en sal precipitante y de aspecto irisante.

Es probable, que la primera forma no tenga interés biológico normal, pero si patológico, resultando de una inconveniente concentración salina, que podría encontrarse ya en el suero sanguíneo. Así sabemos que las relaciones cálcicas en forma iónica, y de complejo soluble y adsorbido y de fosfatos varía en ciertos estados patológicos, como puede observarse en el cuadro adjunto en lo que se refiere a la sangre normal, a la sangre en el raquitismo y en la osteomalacia (ver fig. 1). En la gelatina es fácil obtener esta forma difusa de muchas sales de calcio insolubles.

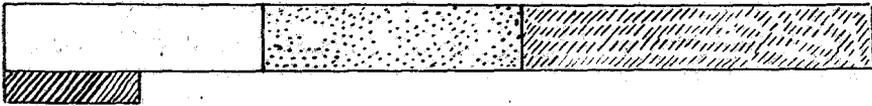
En cuanto a la segunda forma de separación cristalina de una sal cálcica, no es comúnmente biológica; la hemos obtenido de diversas formas en los experimentos. Algunas de estas cristalizaciones ya han sido mencionadas en publicaciones anteriores y pueden observarse nuevamente en las fotografías adjuntas (Fig. 4 y 5).

Sin duda que la tercera distribución de los precipitados en forma sistematizada o periódica, es la que biológicamente tiene

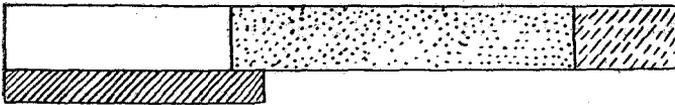
Las fracciones de calcio y fosfato inorgánico
en el suero sanguíneo (según Hunte)



suero sanguíneo normal



Suero sanguíneo en el raquitismo

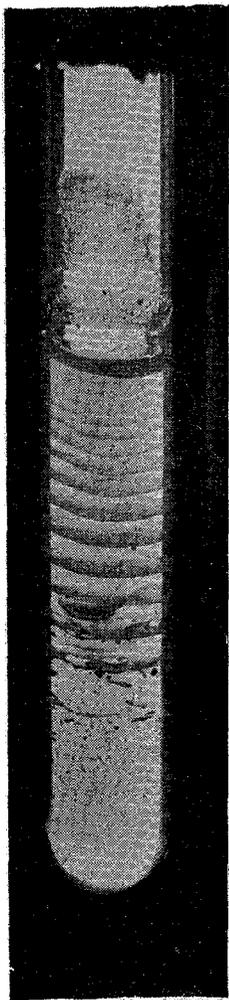


Suero sanguíneo en la osteomalacia

□ calcio ionizado ▒ calcio complejo en solución ▤ calcio complejo adsorbido ▧ fosforo inorgánico

Fig 1

más interés y la que en el experimento puede sorprenderse mejor. Los precipitados rítmicos del tipo Liesegang, obtenidos en muchos anteriores ensayos y la repetición de estas formas no son ninguna novedad (ver Fig. 2 y 3).



← Fig. 2

Ensayo 1 a)—Con gel de gelatina al 5 %, aunque esta es la forma más común de la precipitación rítmica de fosfato tricálcico de cualquier concentración

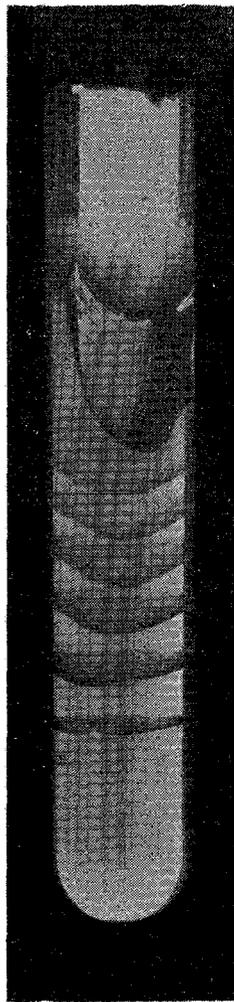


Fig. 3 →

Ensayo 1 b) — Concentración del gel al 3 %

En cuanto a la cuarta forma de precipitado irisado, hemos podido imitarla y se consignan en las siguiente páginas.

Estudiando los precipitados sistematizados, especialmente los rítmicos, hemos hecho y haremos resaltar la influencia de los si-

güentes factores, que obran modificando los fenómenos : concentración de la gelatina, concentración de las sales reaccionantes, diferencia de composición en las mismas sales, concentración de hidrogeniones; quedando aun muchos puntos que aclarar.

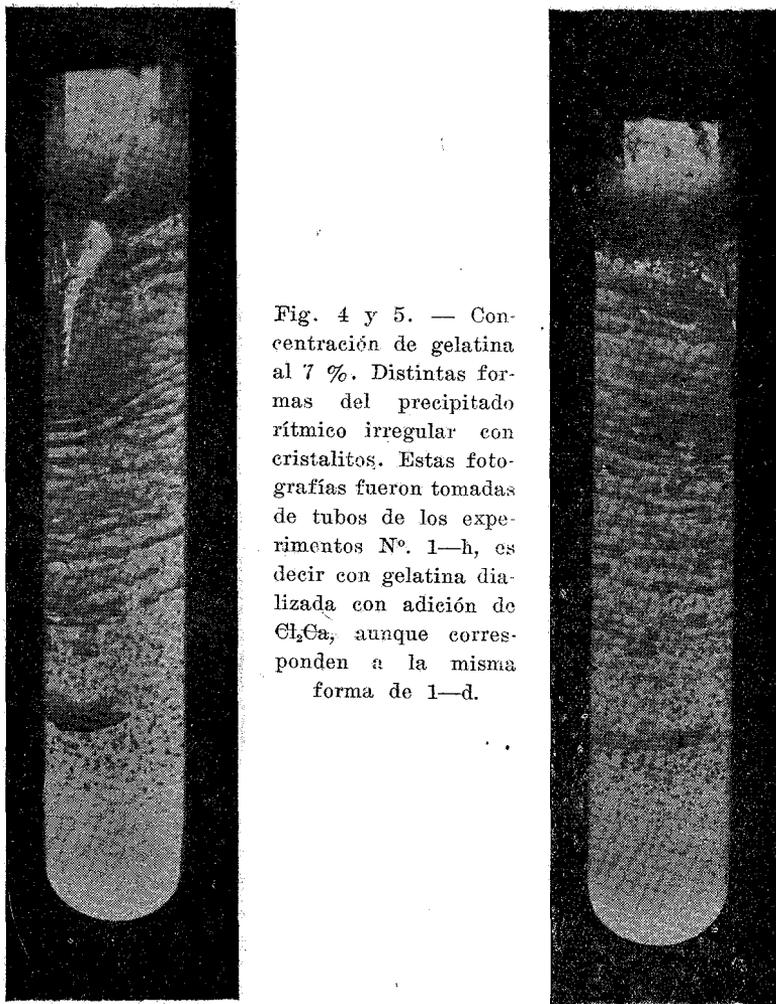


Fig. 4 y 5. — Concentración de gelatina al 7 %. Distintas formas del precipitado rítmico irregular con cristalitas. Estas fotografías fueron tomadas de tubos de los experimentos N°. 1—h, es decir con gelatina dializada con adición de Cl_2Ca , aunque corresponden a la misma forma de 1—d.

Para la precipitación constructiva de los huesos en ortofosfatos y carbonatos de calcio insolubles, deben tomarse en cuenta indudablemente y más que todo estas sales, pero no debemos excluir otros posibles precipitados, o por lo menos, es interesante conocer como se comportan en el experimento.

PRIMERA PARTE

LA OBTENCION DE PRECIPITADOS DE SALES DE CALCIO EN GELES
DE GELATINA

(De la quinta contribución, ver pág. 445, nota al pie)

1°. ENSAYOS CON ORTOFOSFATO DISODICO

Método. — Para el caso, se ha empleado gelatina natural, calidad Oro, con un contenido de calcio propio de un 8 por mil. Se disuelve la gelatina en agua caliente, empleando concentraciones desde un 2 hasta a un 25 %, y para impedir el desarrollo de microorganismos se agrega una pequeñísima cantidad de timol, sin que éste llegue a enturbiar el sol o gel, que se forma. El p. H. inicial determinado por el método de Michaelis es de 7.0. Se reparte el sol de gelatina en tubos de ensayos o en cápsulas de Petri y si la concentración y temperatura lo permite, se deja gelificar. Después se añade en los tubos el fosfato en sustancia, quedando naturalmente en caso de ser un gel el sólido superpuesto a la gelatina. Desde entonces se deja a una temperatura de 22°. En otros ensayos se invierten las colocaciones, es decir se agrega a la gelatina dializada el fosfato, y se superpone la sal cálcica, y en otras pruebas empleamos gelatina perfectamente dializada agregando la sal deseada. Cuando se opera en cápsulas de Petri, se dispone la sustancia sólida que debía difundir, en la parte media, en uno o varios centros de difusión. Los experimentos se realizan generalmente en las mismas condiciones en muchos tubos a la vez (5 a 20).

Ensayo 1° a) Usando una concentración de gelatina del 2 %, se mantiene en forma de sol a la temperatura que operamos, por lo cual la sustancia añadida va al fondo y la reacción de difusión se produce desde abajo. Si se agrega así a la gelatina natural cálcica el fosfato en sustancia, se produce un enturbamiento tenue, que corresponde a un precipitado de fosfato tricálcico, observándose que después de algunos días todo el tubo se ha enturbado igualmente. Al principio este enturbamiento puede hacerse en forma de estrias en el sentido vertical; mientras que aumenta la difusión de la sal fosfática va aumentando el p. H. hasta quedar finalmente en 8.0.

Ensayo 1. b) Concentración de gelatina 3 %, gelificación en los tubos y superposición del fosfato disódico. Se observa al principio en la zona de contacto una solidización del gel, que dura unos dos días, para volver a gelificarse después de nuevo. A la zona de solidización sigue otra de difusión con enturbamiento general, cuyo espesor es variable desde 2 milímetros hasta 16 milímetros; en las horas y días siguientes se van formando los anillos de precipitación, siendo los primeros regulares, luego cada vez más irregulares (ver Fig. 2 y 3). Se encuentran entre éstas: formas imperfectas, anillos de Saturno, anillos anastomosados, anillos con varios orificios y otros como colador, a veces quedan solo pedazos o esbozos de algunas ruedas, tomando a menudo los últimos una posición inclinada. El número de estos anillos oscila entre 13 a 20, y se encuentran bastante separados unos de otros. Se ha observado también la formación de pequeños cristalitos aislados, que vistos con lente tienen una disposición irradiada. Generalmente después del cuarto día no aparecen anillos, quedando en el fondo del tubo una zona sin precipitados. A medida que avanza la precipitación aumenta el p. H. hasta estabilizarse en la zona de reacción entre 7.8 y 7.9.

Ensayo 1. c) Concentración de gelatina 5 %, gelvatizado en tubos, fosfato superpuesto. Después de una estrecha zona de enturbamiento se forman ya en las primeras 24 horas, 2 a 3 anillos separados y perfectos. La anillación aumenta después y llega por

último hasta 26. También aquí, los últimos tienen las características de irregulares o incompletos. Hay pocos cristaliticos. El p. H. en la zona de anillación es alrededor de 7.7.

Ensayo 1. d) Concentración de gelatina 7 %, gel en tubos; fosfato superpuesto. La anillación se hace más rápida que en el caso anterior, al principio muy regular y juntos, luego irregulares, anastomosados, entrecruzados, agujereados, de posición inclinados, luego pedazos de anillos, a veces en U o semilunares, y pegados a la pared del tubo, su número llega hasta 40 o más; al último se notan muchos cristaliticos (ver Fig. 4 y 5). El p. H. de la zona de anillación llega hasta 7.5.

Hemos comprobado que si en vez de valerse en las mismas condiciones anteriores de la sustancia sólida superpuesta, se pone una solución saturada de fosfato disódico, la anillación es más distante, los anillos son más irregulares y la cantidad de anillos es menor (hasta 8).

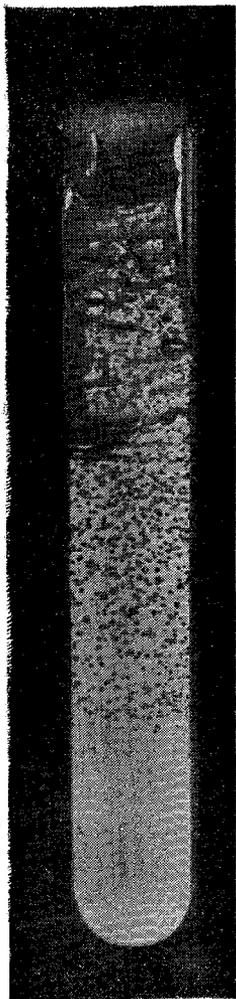
Ensayo 1. e.) Concentración de gelatina al 10 %. Al gel establecido en los tubos se sobrepone el fosfato disódico, y muy lentamente se forman anillos juntos y casi siempre perfectos, llegando su número solo a 7 y no multiplicándose más. En la zona de anillación el p. H. es alrededor de 7.4.

Ensayo 1. f.) Concentración de gelatina 25 %. Se pone el fosfato encima de la gelatina en los tubos y se advierte apenas una estrecha zona de difusión con precipitación turbia, no hay anillos, ni aún después de mucho tiempo; el p. H. en la zona turbia es de 7.2.

Ensayo 1. g.) Al agregarse en un gel de gelatina natural al 3 %, fosfato disódico en proporción del 1 % y se pone encima de este gel el cloruro de calcio cristalizado, entonces se solodiza, la sustancia va al fondo y se enturbia todo intensamente; no hay formación de precipitados rítmicos.

Ensayo 1 h.) Si se emplea gelatina perfectamente dializada, añadiendo cloruro de calcio al 1 % y superponiendo fosfato de sodio en sustancia, con cualquier concentración de gelatina, observamos siempre los mismos fenómenos anteriormente mencionados, siendo el desarrollo de los círculos más nítido, más clara

la gelatina, y más pronunciados los cristalitas; de estos últimos, hay en comparación al ensayo con gelatina natural, mayor cantidad, y a veces invaden toda la zona de precipitados rítmicos. (ver Fig. 6).



← Fig. 6

Ensayo 1 h) — Obsérvase la gran cantidad de núcleos de cristalización. (cristalitas).

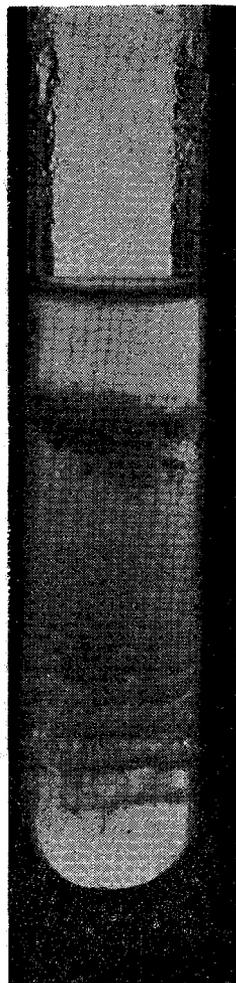


Fig. 7 →

Ensayo 1 i) — Difusión del cloruro de calcio desde abajo hacia una gelatina con contenido fosfático sódico.

Ensayo 1. i.) Si se invierten los términos anteriores con gelatina dializada, agregando a la misma fosfato disódico al 1 % y dejando difundir el cloruro de calcio superpuesto, se nota solidización del gel, la sustancia va al fondo o produce desde abajo un pre-

cipitado grueso que alcanza a veces algunos centímetros y otras veces se modelan en una zona inferior 2 a 7 anillos mal delineados y borrosos, y con interposición y superposición de cristalitas; luego viene una zona de enturbamiento general y termina más arriba en un único anillo muy grueso (ver Fig. 7).

Resultado de los ensayos anteriores. La relación que existe entre la concentración de la gelatina y la cantidad de anillos que se forman rítmicamente, se puede seguir en el diagrama adjunto (Fig. 8). Así vemos que la mejor anillación corresponde a una concentración del 7 % de gelatina con una temperatura de 22°. La curva del p. H. depende de la mayor o menor difusibilidad de la sal fosfática y ella no parece influir en los límites ensayados, en la mayor o menor formación de anillos, es decir que estos se desarrollan bien entre un p. H. de 7 a 8. Los anillos se congregan bien al difundir la sal fosfática de sodio a través de un gel de gelatina que contiene, aunque sean pequeñas cantidades de sales de calcio, mientras los anillos se configuran mal o no lo hacen con la difusión invertida.

**CUADRO DE LA RELACION DE LA CONCENTRACION DE GELATINA,
CON LA CANTIDAD DE ANILLOS PERIODICOS Y LA VARIACION
DEL p.H.**

<i>Ensayos</i>	<i>Concentración de gelatina</i>	<i>Nº. de anillos precipitados, término medio</i>	<i>P. H. final</i>
a	2 por %	0	8.0
b	3 " "	16	7.9
c	5 " "	26	7.7
d	7 " "	40	7.5
e	10 " "	7	7.4
f	25 " "	0	7.2

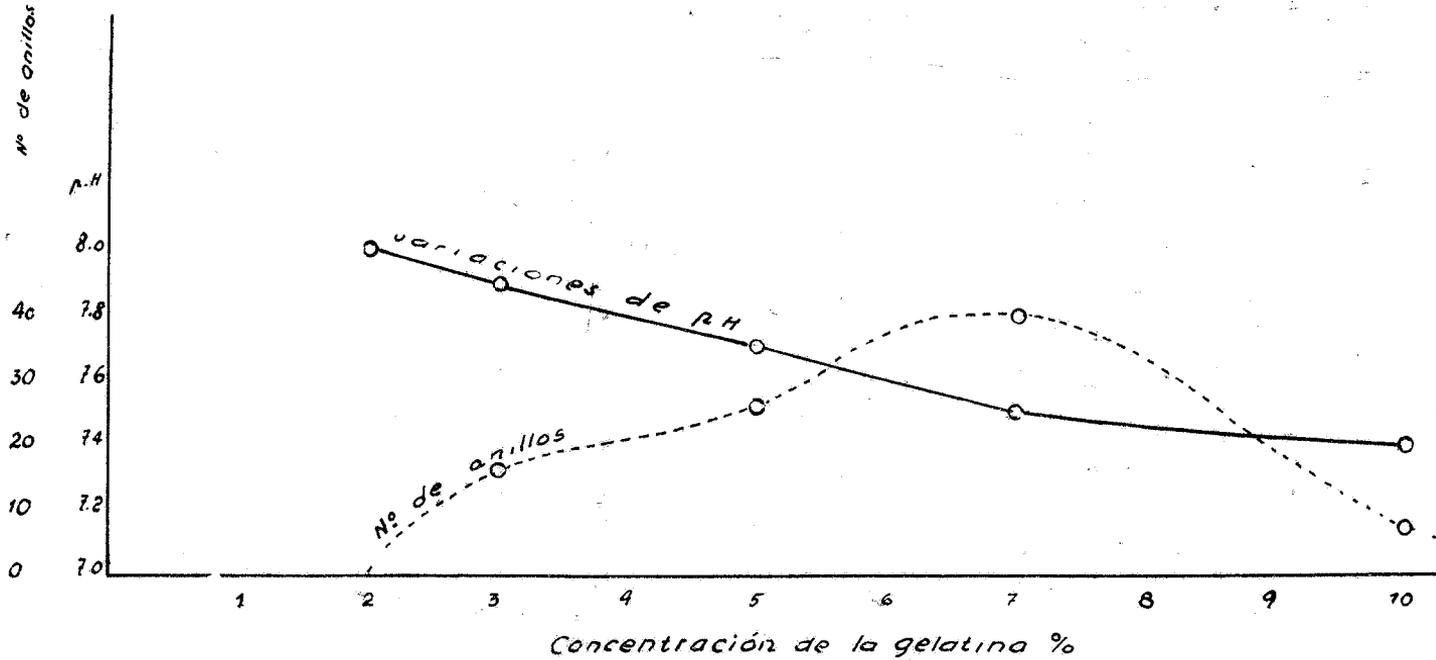


Diagrama del p. H. y de la formación cuantitativa de los anillos rítmicos de fosfato tricálcico en relación con la concentración de la gelatina

Fig. 8

Este resultado puede tener su aplicación para la interpretación de la teoría esteogénica de los capturadores de *Pfaundler*, *Freudenberg*, *György* y *Stuckert* (ver Osteogenesis l. cit. pág. 40, 44 y 98). Según aquel enunciado, la unión del colágeno se produce primero con el calcio y recién después se precipita con la sal fosfática, aunque el fenómeno inverso podría también suceder, por ser la gelatina o el colágeno un anfígeno; pero con estos ensayos afirmamos, que si se originan precipitados rítmicos perfectos, como los que se observan alrededor de los canales de Havers, debe producirse primero la reunión del prótido con el calcio y luego la precipitación del fosfato. Así que la suposición teórica ha sido confirmada por los hechos experimentales.

Los precipitados difusos simples o los de anillación periódica, al reaccionar el fosfato con una sal de calcio soluble, deben ser forzosamente de ortofosfato tricálcico, mientras que la formación de cristales, ya sea entre los anillos o debajo de ellos, debe ser de un fosfato con mucho menor contenido cálcico, quizás un fosfato doble de sodio y calcio, ya que no es probable que sea un fosfato ácido de calcio, debido al p. H. que no cambia mayormente.

Sin embargo, esto último resultará por dos causas, primero, porque los mismos cristalitos también se encuentran en el caso que tomamos un gel de gelatina dializado con un pequeño porcentaje de fosfato de sodio (1 por %), haciendo difundir a través de éste, la sal cálcica soluble, y que por lo tanto sus iones prevalecen sobre los de sodio y de fosfato, además encontramos los mismos cristalitos con un p. H. bajo, hasta menos de 5.0, siendo la zona de p. H. más favorable para la separación de cristalitos entre 5.0 a 6.0

Ensayos 1 k). — Difusión en cápsulas de Petri. —

Se usa gelatina natural al 3 % con timol, a la cual se adiciona cloruro de calcio cristalizado al 1 %. Se coloca el sol en cápsulas de Petri de manera que contenga más o menos 1 cm. de altura. Después de su gelificación se coloca en uno o varios focos distantes, al fosfato disódico en sustancia. Lo primero que se observa es una disolución del fosfato con parcial solvatación de la gelatina que rodea al fosfato y se van depositando anillos rítmicos de precipitación de fosfato tricálcico; su número es variable, en-

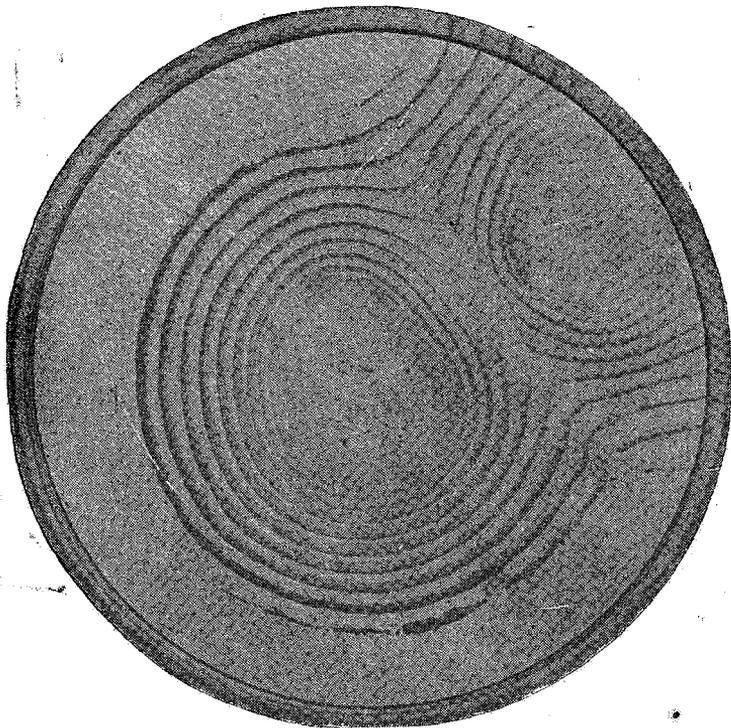
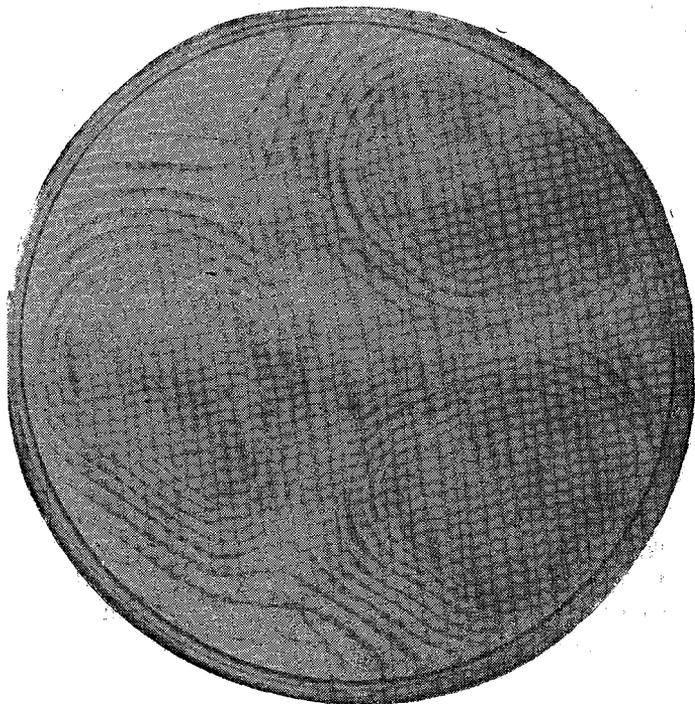


Fig. 9

Fig. 10

Dos casos de difusión rítmica de fosfato disódico en gel de gelatina cálcica, obtenida en cápsulas de Petri. Se nota en la primera figura la difusión desde dos núcleos y en la segunda desde tres. No hemos observado Cassinotaxis. (Lit.: Zehn Jahre Forschung auf dem physikalisch. Medizin Grenzgebiet, Fr. Dessauer. — Artículo de R. Ed. Liesegang sobre Cassinotaxis).



ENSAYOS COMPARATIVOS DE DIVERSOS GELES DE GELATINA EN TUBOS DE ENSAYOS Y PLACAS, CONCENTRACION DE GELATINA 5 POR %, ADICION DE SUSTANCIA SOLIDA.

Tipos de gelatina: A == grano fino, B == granc mediano, C == grano grueso. (Resultados a los 3 días)

<i>Gelatina y Fotografía</i>	<i>Sustancia añadida</i>	<i>Sustancia sólida superpuesta o añadida en el centro</i>	<i>Zona de P. p. difusa</i>	<i>Anillos</i>	<i>Forma de anillos</i>	<i>Distancia de anillos</i>	<i>Cristalitos</i>	<i>Soloidización del gel.</i>
A Fig. 11	O	PO ₄ Na ₂ H	poca	6-10	perf. e imp.	separados	pocos	no
B Fig. 12	O	"	"	3-5	imperf.	mai delin.	pocos	no
C	O	"	ancha	0	imperf.	—	regular	no
A Fig. 13 y 14	Cl ₂ Ca 1 %	"	ancha	5-25	perf. e imperf.	juntos	muchos	no
B Fig. 15 y 16	" "	"	"	4-7	imperf.	"	"	no
C Fig. 17	" "	"	poca	0-3	semilunar e imperf.	separados	muchos	no o parcial



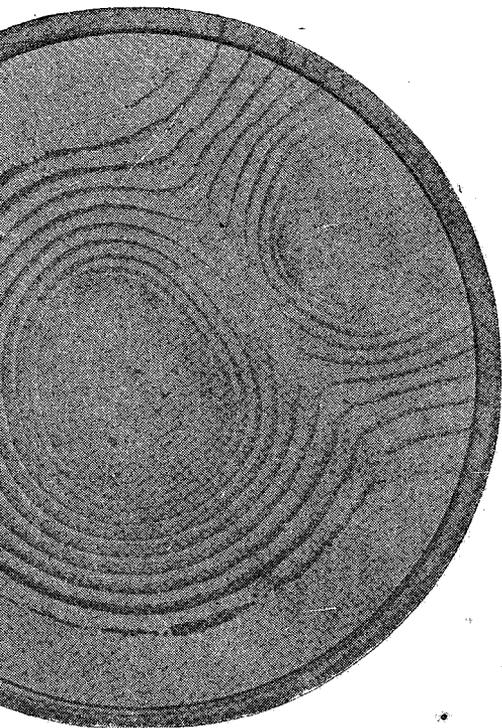
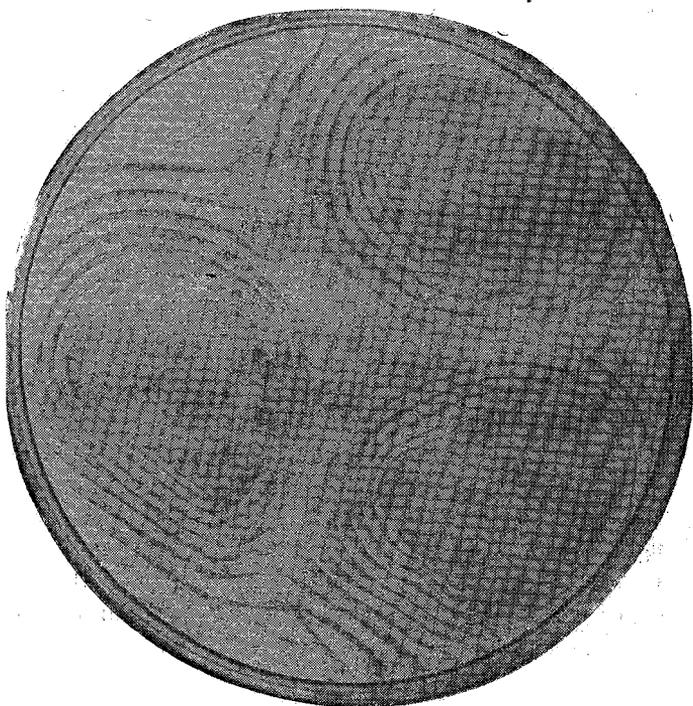


Fig. 9



rít-
ódico
álci-
sulas
n la
isión
n la
No
sino-
ahre
phy-
renz-
—
Lie-
nota-

<i>Gelatina y Fotografía</i>	<i>Sustancia añadida</i>	<i>Sustancia sólida superpuesta o añadida en el centro</i>	<i>Zona de P. p. difusa</i>	<i>Anillos</i>	<i>Forma de anillos</i>	<i>Distancia de anillos</i>	<i>Cristalitos</i>	<i>Soloidización del gel.</i>
AÑO 21. N.º 9-10. NOVIEMBRE-DICIEMBRE 1934								
A Fig. 11 B Fig. 12 C	O O O	PO ₄ Na ₂ H " "	poca " ancha	6-10 3-5 0	perf. e imp. imperf. imperf.	separados mai delin. —	pocos pocos regular	no no no
A Fig. 13 y 14 B Fig. 15 y 16 C Fig. 17	Cl ₂ Ca 1 % " " " "	" " "	ancha " poca	5-25 4-7 0-3	perf. e imperf. imperf. semilunar e imperf.	juntos " separados	muchos " muchos	no no no o parcial
A B C	" " " " " "	PO ₄ Na ₃ " "	regular mucho "	3 1 0	imperf. iris. —	poco sep. — —	no no no	no no si
A B C	" " " " " "	PO ₄ Na ₂ NH ₄ " "	regular mucho mucho	4 2 0	imperf. " Pp. relieve	juntos " "	muchos pocos no	no no no
A Fig. 18 B C	PO ₄ Na ₂ H 1 % " " " "	Cl ₂ Ca " "	mucho " muy mucho	1 0-1 0-1	imperf. " "	— — —	m. pocos P.p. fino no	si si si
A Fig. 19 B Fig. 20 C	Gluconato cálcico 1 % " " " "	PO ₄ Na ₂ H " "	poco mucho "	5-10 0-4 0-3	perf. e imperf. " imperf.	separados " juntos	regular muchos "	no no no
A B C	" " " " " "	PQ ₄ Na ₃ " "	mucho " "	1 1 0	iris. " —	— — —	no no no	no no no
A B C	" " " " " "	PO ₄ Na ₂ NH ₄ " "	mucho " "	1 0 0	iris. — —	— — —	no no no	no no no

NOTA: P.p. = precipitado. Perf. = perfectos. Imperf. = imperfectos. Iris. = irización. Semilun. = semilunares.

Dos
mied
en
ca,
de l
prin
desd
segu
hem
taxi
Fors
sikal
gebi
Arti
sega

contrándose entre 3 y 7 anillos perfectos y 1 a 3 irregulares. La distancia entre cada anillo aumenta de la perifería al centro, mientras que el p. H. disminuye en la misma dirección.

A veces, pero no siempre, se forman entre los anillos y mejor en una zona externa fuera de ellas, pequeños cristalititos. Hemos hecho experimentos con dos o más núcleos de difusión central, no encontrando Cassinotaxis (ver Fig. 9 y 10).

Si después, se dejan mucho tiempo las cápsulas expuestas al aire, la gelatina se deseca, y los anillos de precipitación quedan en forma de relieve bastante endurecidos. La altura de estos anillos en relieve oscila entre 3 a 10 milímetros, también pueden encontrarse los cristalititos sobresalientes de la gelatina deshidratada. La altura de los anillos en relieve disminuye en forma de escalones del centro a la perifería.

Si en vez de emplear gelatina natural, se realiza el experimento con gelatina dializada, y en la cual se comprueba que no existe más calcio, pero al cual se agrega cloruro de calcio al 1 %, entonces la anillación es más perfecta y mayor su número (8 a 12). La desquelificación también origina anillos en relieve, mientras que los cristalititos son raros. El p. H. disminuye del centro a la perifería.

Cuando invertimos en el caso anterior la posición de las sales actuantes, es decir, mezclamos con la gelatina el fosfato disódico y colocamos como núcleos centrales de difusión al cloruro de calcio cristalizado en sustancia, aparece una zona de soloidización mayor, que luego también se regelifica. Después precipita la sal cálcica insoluble en la perifería en parte en forma difusa y como un débil enturbamiento, y luego aparecen algunos anillos muy irregulares, entrecortados, mal delineados, cuyo número es apenas de 2 a 4; más afuera viene una ancha zona llena de precipitados de forma irregular, semejando letras extrañas; y que muy bien podríamos llamar *precipitados en escritura*.

Resultado de los experimentos en cápsulas. —

La difusión reaccionante en cápsulas del ortofosfato disódico con cloruro de calcio produce los mismos fenómenos que en el tubo de ensayo, únicamente que por la disposición horizontal del área reaccionante, las figuras resultantes son de precipitados concéntri-

cos; solo en esta forma de operar se ve bien la acción desquelificante en los anillos precipitados, con la presentación en relieve.

En estas pruebas de las cápsulas, mejor que en los tubos de ensayo, se observa especialmente la diferencia que existe entre la difusión del fosfato disódico en la gelatina cálcica con sus anillos perfectos y la difusión inversa del cloruro de calcio en la gelatina fosfática con la formación de anillos imperfectos y la precipitación irregular en escritura.

Influencia de la concentración de hidrogeniones en prácticas análogas a las anteriores. — Hemos notado ya que las variaciones de concentración de hidrogeniones que proceden de la adición de fosfato disódico, lógicamente no puede cambiarse, sino entre estrechos límites, es decir entre 7.0 y 8.0; la formación de anillos rítmicos es entonces más o menos perfecta. En otro trabajo habíamos indicado que un p. H. superior no es conveniente para la producción de precipitados rítmicos (ver Osteogénesis, l. cit. pág. 148 y anteriores), y que un p. H. inferior hasta 5.6 no afecta su configuración.

Conseguir una amortiguación de cambios de concentración de hidrogen-iones es con los buffers usuales imposible, puesto que ellos modifican fundamentalmente la forma de precipitación rítmica, que es el asunto de mayor interés.

Siguiendo en el campo ácido las pruebas, constatamos que al agregar pequeñas proporciones de ácido clorhídrico y así disminuir el p. H., la cantidad de los anillos es cada vez menor y ellos son imperfectos, sobre todo va borrándose el carácter de precipitado rítmico debajo de un p. H. de 4.7 (punto isoeléctrico de la gelatina), debajo de 3.5 ya no se componen anillos, sino que hay un enturbiamiento general. Cuando el p. H. se acerca a 2.6, empieza a solodizarse la gelatina gelvatizada y con un p. H. de 2.0 la solodización es total y muy rápida.

Resultado. — Hasta cierto punto, no del todo de acuerdo con mis conclusiones publicadas en osteogénesis, l. cit. pág. 148, encontramos que el p. H. más favorable para la formación cuantitativa de anillos rítmicos es alrededor de 7.0, y al disminuir éste, también disminuyen aquellos y se hacen más irregulares, debajo de 3.5 no hay precipitaciones rítmicas.

2°. ENSAYO CON BICARBONATO SODICO

Si en vez de ejecutar los ensayos con fosfato disódico se trata con el bicarbonato de sodio que se hace difundir en un gel de gelatina dializada con cloruro de calcio cristalizado en una proporción de 1 %, y operando con un p. H. inicial de 7.0, se observan los siguientes fenómenos.

Ensayo 2 a). Concentración de gelatina 2 %, quedando la mezcla en los tubos como sol, y la sustancia agregada va al fondo del recipiente. No se observan cambios, ni precipitados ni enturbiamiento, encontrándose que el p. H. aumenta hasta quedar alrededor de 7.8.

Ensayo 2 b). Concentración de gelatina del 5 %, al gel formado en los tubos se sobrepone la sustancia y se advierte después de varios días enturbiamiento o precipitados tenues en forma semilunar, mientras que p. H. sube hasta 7.6.

Ensayo 2 c). Concentración de gelatina 10 %, la sustancia superpuesta al gel difunde y provoca enturbiamiento general que progresa muy lentamente, lo mismo sucede con el p. H.

Ensayo 2 d). Si se opera con una concentración de gelatina al 25 %, se notan los mismos fenómenos anteriores, pero ellos son más lentos.

Resultados de estos experimentos. — Haciendo difundir el bicarbonato sódico a través de gel de gelatina con iones cálcicos, no se observan precipitados rítmicos, sino un enturbiamiento débil, por consiguiente el bicarbonato cálcico formado no tiene en las condiciones mencionadas un límite metaestable de formación periódica frente a las sales de calcio, como sucede con el fosfato disódico.

3°. ENSAYO CON CARBONATO NEUTRO DE SODIO

Sustituyendo en los experimentos anteriores el carbonato ácido de sodio por carbonato neutro, y operando en lo demás en condiciones idénticas, hemos hecho las siguientes observaciones:

Ensayo 3 a). Concentración de la gelatina 2 por %. En el sol formado, al que se ha añadido la sal, se encuentran precipitados irregulares, como musgos que parten desde el fondo; el p. H. aumenta hasta el 7.6.

Ensayo 3 b). Concentración de gelatina 5 %. Si se pone al gel en contacto con la sustancia en la parte superior, éste se invagina, se desarrollan precipitados en finos puntitos y el p. H. aumenta.

Ensayo 3 c). Concentración de la gelatina 10 %. La sustancia a difundir, apenas produce en una estrecha zona un poco de enturbiamiento y aumenta ahí el p. H.

Ensayo 3 d). Con una concentración del 25 % de la gelatina, no se nota enturbiamiento, ni cambio acentuado del p. H.

Resultado de las pruebas con carbonato neutro de sodio. — Esta sustancia no es capaz de precipitar periódicamente las sales de calcio en las condiciones anteriores; si la concentración de la gelatina no es demasiado elevada, se establecen a veces enturbiamientos uniformes, o en pequeños puntitos o sino en forma de musgos.

4°. ENSAYO CON ACETATO DE SODIO

Se ha empleado gelatina natural con un 8 por mil de calcio, y vestigios de timol, cuyo p. H. inicial era de 7.0 y a cuyo gel se superponía el acetato de sodio en sustancia.

Ensayo 4 a). Concentración de gelatina al 2 %, añadiendo al sol la sustancia, esta reacciona desde el fondo dando un halo de precipitación sin periodicidad, ni modificación del p. H.

Ensayo 4 b). Concentración de la gelatina al 5 %, la sustancia encima del gel produce primero una licuación invaginada y luego halo de precipitación tenue; la soloidización prosigue en los días siguientes hasta hacerse total. No se observa sistematización de precipitados.

Ensayo 4 c). Concentración de gelatina al 10 %. Al agre-

garse encima del gel el acetato en sustancia, se obtienen los mismos resultados anteriores.

Ensayo 4 d). Con gelatina al 25 % se observan los mismos fenómenos que en los casos citados.

Resultados de los experimentos con acetato de sodio. — El acetato de calcio que se forma, es soluble en el agua y lógicamente no produce precipitados rítmicos, pero se observa un enturbiamiento tenue, que se reparte por igual en toda la masa solidizada, por lo cual esta sal debe considerarse poco soluble en el gel de gelatina. El P. H. no se modifica.

5°. ENSAYO CON SULFATO DE SODIO

En las mismas condiciones del ensayo cuarto se ha superpuesto en los tubos de ensayo, sulfato de sodio neutro cristalizado, registrándose según la concentración los siguientes cambios:

Ensayo 5 a). Con gelatina al 2 %, que se mantiene como sol, se observa que la sustancia que va al fondo del tubo, no produce un precipitado, o este es apenas nubecular. El p. H. no sufre variaciones.

Ensayos 5 b, c y d). Con concentraciones de la gelatina al 5, 10 y 25 %, nos encontramos sin precipitado visible.

Resultados con el empleo del sulfato neutro de sodio. — Esta sal no modifica sensiblemente un gel de gelatina con calcio, nada de precipitado periódico se ve, y la difusión del sulfato, si es que se realiza, se hace al parecer con mucha dificultad. En un sol de gelatina se encuentra un enturbiamiento tenue.

ENSAYO 6°. CON FOSFATO DIPOTASICO

Aquí hemos analizado los experimentos con la gelatina natural de contenido cálcico del 1 %, añadiendo timol necesario, operando a una temperatura de 20° y con un p. H. de 7.0.

Resultado de la acción de una mezcla de fosfato disódico y carbonato monosódico. —

La superposición de esta mezcla a un gel de gelatina cálcica, produce solidización parcial e irregular, al mismo tiempo se forman precipitados espesos en una ancha zona. Con una concentración relativamente elevada de la gelatina se obtienen pocos precipitados rítmicos e irregulares, el p. H. aumenta en la zona de difusión.

CONCLUSIONES GENERALES: 1°.) De las sales empleadas para obtener precipitados de calcio insolubles en geles de gelatina de diferente concentración, solamente el ortofosfato disódico es capaz de difundir rítmicamente con producción de anillos de precipitación de fosfato de tricálcico; esto se realiza como en la osteogénesis, según la teoría de los capturadores de Pfaundler.

2°.) Aunque otros aniones ensayados pueden precipitar con el ion calcio, nunca hemos observado precipitados periódicos del tipo Liesegang.

3°.) Una mezcla de sales de fosfato disódico y carbonato ácido de sodio, no mejora en las condiciones experimentadas, la precipitación periódica, al contrario esta se hace menos nítida.

DEDUCCIONES PARA LA TEORIA OSTEOGENETICA

La precipitación rítmica de las laminillas óseas en forma de fosfato tricálcico alrededor de los canalículos de Havers, se hace en su primera fase, según los conceptos de Freudenberg y Stuckert (ver l.c. de Osteogénesis).

La precipitación de la segunda fase por nueva captación del carbonato según Pfaundler, no está demostrada; parece que al contrario, la precipitación del carbonato de calcio es independiente, quizás posterior a la separación sistematizada del fosfato insoluble.

SEGUNDA PARTE

LA FORMACION DE OTRAS SALES DE CALCIO INSOLUBLES Y LAS VARIACIONES EN LA CLASE DE GELATINA

(De la sexta contribución, ver pág. 445, nota al pie)

Tres nuevas observaciones podemos añadir a las consignadas en las líneas anteriores:

1°. Al difundir la sal doble de fosfato amónico-sódico en un gel de gelatina cálcica, el precipitado que se obtiene es muy poco espeso y borroso; y si sobreviene anillación, esta es muy poco pronunciada o los anillos son mal delineados. Muy bien visible se hace esta forma de precipitación borrosa en los experimentos en placas, porque en el tubo apenas se nota un tenue enturbiamiento. El p. H. en este experimento ha quedado por arriba de 8.2, así que es fácilmente comprensible, como según nuestras anteriores previsiones ni pueden producirse buenos precipitados sistematizados.

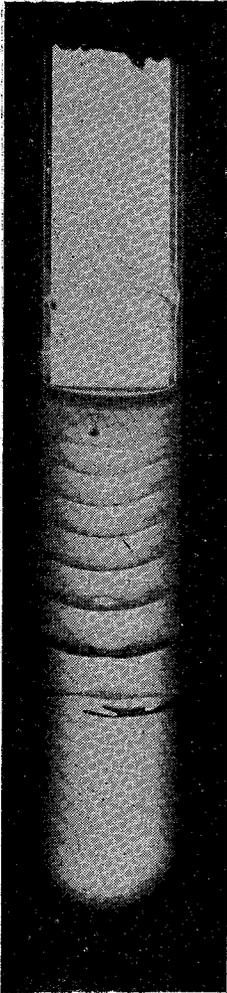
2°. Cuando se hace difundir ortofosfato trisódico a través de la gelatina cálcica extendida en placas, se forma primero una zona de débil enturbiamiento alrededor del cual se deposita un anillo de la sal cálcica, insoluble, en forma muy espesa y bien limitada, y cuyo aspecto opalescente llega hasta a una pronunciada iridación, análoga al marfil.

¿Ahora bien, cómo en este caso, a pesar de un p. H. que no ha sido mayor que en los experimentos con ortofosfato disódico, que por otra parte ha sido menor que en la mezcla fosfato disódico y bicarbonato sódico, puede producirse formación tan particular y diferenciada? Es este un problema cuya solución debemos buscar en nuevos ensayos.

3°. Anteriormente ya nos había llamado la atención, que ensayos hechos para la obtención de precipitados de sales, no eran de la misma forma, con gelatinas comerciales de procedencias distintas.

En los ensayos cuyos controles van adjuntos se puede observar este comportamiento diferente. En general podemos decir que las gelatinas de grano grueso no son convenientes para obtener buenos precipitados sistematizados, y parece que esta diferencia no solo proviene de la dificultad en su gelvatación, sino que es debido quizás a factores de su estructura coloidal interna.

Comparación de reacción precipitante en gelatina de tipo fino (A) y mediano (B)



← Fig. 11

Gel de gelatina tipo A, en tubo sin adición, superposición de fosfato disódico; obsérvase: zona de p.p. difusa, poca; primeros anillos perfectos, luego imperfectos, en forma orificada o de Saturno; pocos cristalitas debajo de los anillos.

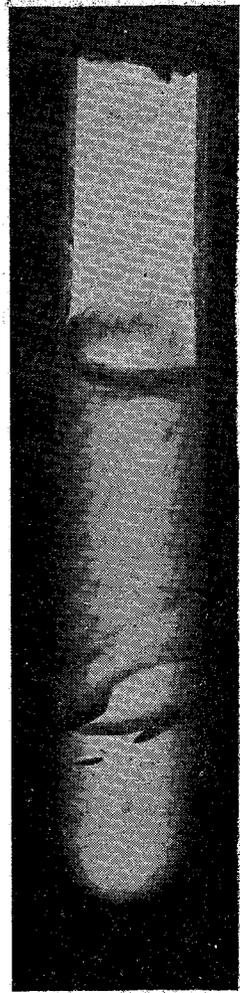


Fig. 12 →

Gel de gelatina tipo B, en idénticas condiciones de preparación anterior. Se observa: zona de p.p. difusa, poca; anillos pocos y muy imperfectos, anastomosados mal delineados; pocos cristalitas.

Reacción precipitante en gelatina de tipo fino (A)

En gelatina al 5 % se ha agregado un .1 % de cloruro de calcio y superpuesto el ortofosfato disódico en sustancia.

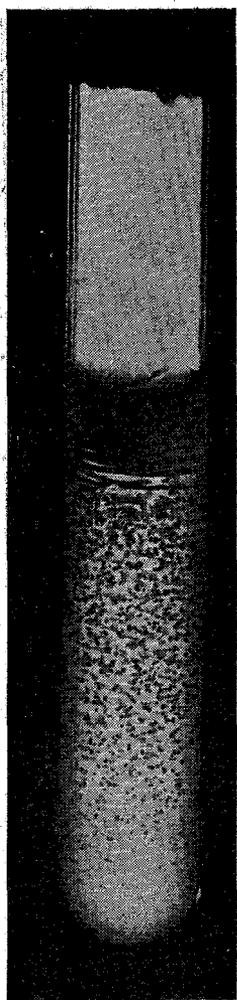
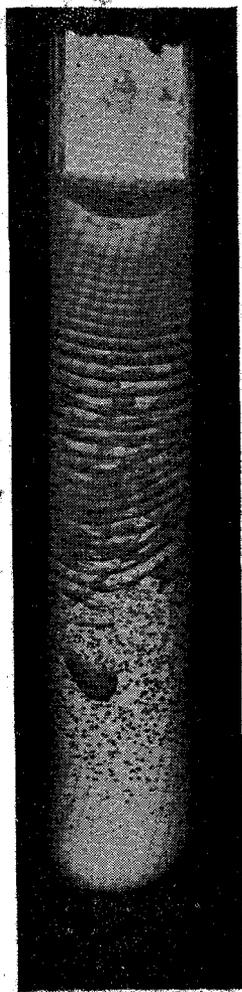


Fig. 13 y 14. Obsér-
vase una pequeña zo-
na de p.p. difuso, y
luego la formación de
anillos que pueden ser
desde 5 hasta 26, más
abajo se forman una
gran cantidad de cris-
talitos de tamaño gran-
de. Los anillos se en-
cuentran en estas con-
diciones muy juntos y
son muy espesos.



Reacción precipitante en gelatina del tipo grueso (B)

A la gelatina al 5 % en forma de gel se ha agregado, anteriormente a su gelvatación un 1 %- de cloruro de calcio y se ha superpuesto el ortofosfático disódico en sustancia sólida, (como en las fotografías anteriores).

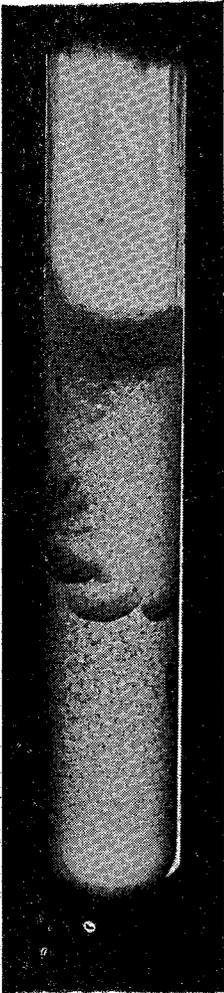
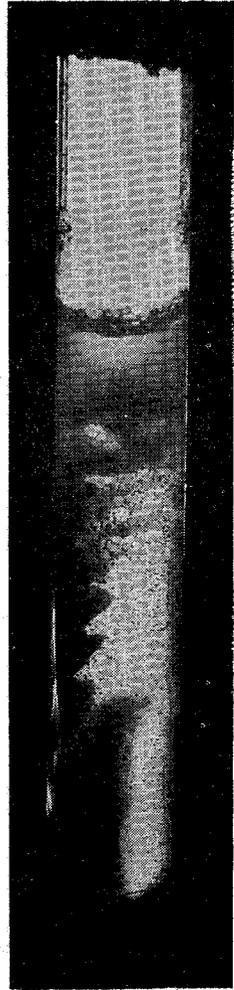


Fig. 15 y 16. Obsérvase una zona de p.p. difuso, luego unos anillos semilunares pegados a la pared del tubo y cuyo número oscila entre 5 a 10, más abajo se observa en la figura 16 un precipitado difuso lateral. En todo el gel se encuentra un gran número de cristalitas muy pequeños.



Reacción precipitante en gelatina del tipo grueso (C)

Hemos procedido aquí en la misma forma anterior.

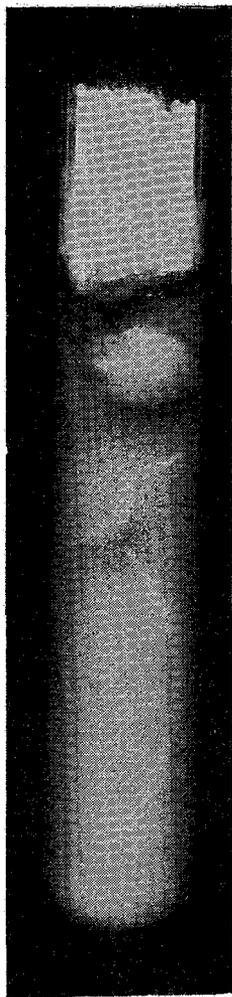


Fig. 17. Se encuentra una pequeña zona de precipitado difuso, y luego en todo el tubo, pequesísimos cristallitos. Además se ha formado una solidización de forma invaginante en S, que va hasta el fondo del tubo.

Observación de reacción precipitante del cloruro de calcio en un gel de gelatina tipo A con un contenido de fosfato disódico al 1 %

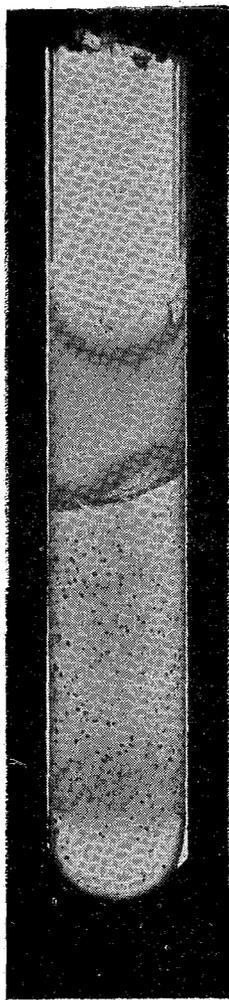
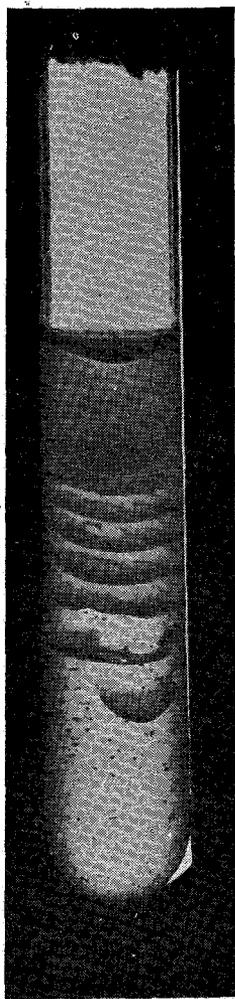


Fig. 18. Se observa que la sustancia superpuesta (Cl_2Ca), solidiza el gel y va al fondo, después se regelifica y empieza actuar desde abajo, formado un precipitado difuso que termina en un grueso anillo irregular, en toda esta zona de precipitación difusa se forman cristalitas en bastante cantidad.

Comparación de reacción precipitante en geles de gelatina de tipo fino (A) y mediano (B), con adición de gluconato cálcico al 1 % y superposición de fosfato disódico



← Fig. 19

Gel de gelatina tipo A. Obsérvase: zona de p.p. difusa, poca; anillos de 5 a 10, primeros perfectos, luego imperfectos, distancia muy separados, un anillo semilunar (no siempre). Regular cantidad de cristalitas.

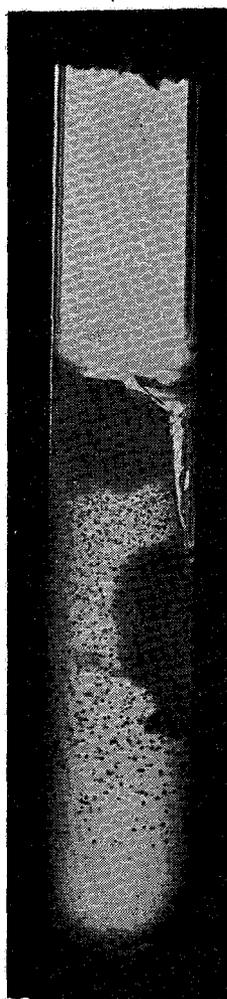


Fig. 20 →

Gel de gelatina tipo B. Obsérvase: zona difusa de p.p. espesa; anillos 0 a 4, muy imperfectos (figura no tiene); zona de p.p. espesa pegada a la pared del tubo de un solo lado (parecen ser la reunión de muchos anillos semilunares borrados). Cristalitas gruesos, muchos.

TERCERA PARTE

LA DIFERENCIACION ANALITICA DE LOS ANIONES DE ALGUNOS PRECIPITADOS DE CALCIO EN LA DIFUSION A TRAVEZ DE GELES DE GELATINA

(De la séptima contribución a los estudios coloidales, ver pág. 445 en la nota al pie)

Durante las experiencias anteriores y al observar las figuras precedentes nos surgió la posibilidad de la comparación de los precipitados obtenidos por difusión en los geles de gelatina para determinar la clase del anion. En efecto la forma de estos precipitados varía mucho de un caso al otro y como en algunos, por ej. en la diferenciación de los orto, piro- y metafosfatos es a veces difícil su determinación con los métodos ordinarios y la obtención de los precipitados mencionados es relativamente sencillo, pensamos que podría ser aplicable en la práctica; también podría servir para la diferenciación de los ortofosfatos primarios, secundarios y terciarios.

En nuestros ensayos hemos usado la difusión en geles de gelatina dispuestos en tubos de ensayo o en placas de Petri, el primer procedimiento nos ha resultado mejor, lo que por otra parte puede ser demostrativo con las fotografías anteriores.

Los experimentos siguientes han sido realizados, para comprobar cual forma de gelatina cálcica es mejor, empleando primero sin adición cálcica, es decir con su contenido natural del 0.7 %, después con un agregado cálcico de la misma concentración.

CU.

—
Nº.
exp

—
1

1

1

—
1

1

1

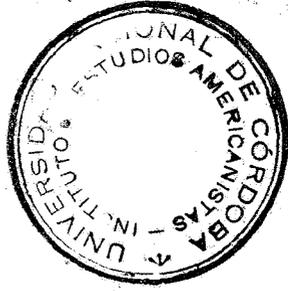
—
1

1

1

—
1

1



	CaCl ₂ 1 %	amónico	ninguno	si, muchos y finisimos	ninguno	si, 2-7, mal delimitados, juntos
	gluconato cálcico 1 %	" "	si, poco	si	si, poco pronunciado	ninguno
Y	ninguna	NaF	si, tenue y ancho	ninguna	ninguno	ninguno
	CaCl ₂ 1 %	"	si, espeso, regular ancho	ninguna	ninguno	ninguno
	gluconato cálcico 1 %	"	si, regular espeso, angosto	ninguna	ninguno	ninguno
	CaCl ₂ 1 %	Na ₂ CO ₃	si, muy fino	si, muchas finas	ninguno	ninguno
	" "	NaHCO ₃	si, finos	si, muchas finisimas	ninguno	crystalitos en forma de p. p. ritmico, 2-4 anillos
	" "	Na ₂ SO ₃	si, irregular, semilunares	si, muchas finas	ninguno	ninguno
	" "	Na ₂ SO ₄	si, pp. tenue	si, mucha	ninguno	ninguno
	" "	Na ₂ S ₂ O ₈	si, angosto	si, cristales irradiados, grandes	ninguno	ninguno
	" "	tartrato de sodio	ninguno	cristales y dentritas	ninguno	ninguno
	" "	citrate de sodio	si, + nue, ancho	ninguna	ninguno	ninguno

RO COMPARATIVO DE LOS RESULTADOS DE DIFUSION PRECIPITANTE DE SALES DE CALCIO EN GELES DE GELATINA. (GELATINA AL 5 % CON TIMOL, TEMPERATURA 22°, RESULTADO A LAS 48 HORAS)

<i>l</i> <i>m.</i>	<i>Sustancia añadi- da al gel</i>	<i>Sustancia de difu- sión precipitante</i>	<i>P. p. difuso en forma de halo o capa</i>	<i>Formación cris- talina</i>	<i>P. P espeso con irisación</i>	<i>Anillos ritmicos, N°. y distancia</i>
	ninguna CaCl ₂ 1 % gluconato de calcio 1 %	NaH ₂ PO ₄ " "	ninguno ninguno ninguno	ninguna si, ténue, muy ancho si, ténue, angosto	ninguno ninguno ninguno	ninguno ninguno ninguno
	ninguna CaCl ₂ 1 % gluconato de calcio 1 %	NaH ₂ PO ₄ " "	si, ténue, bien li- mitado, anillo an- cho si, grueso si, grueso	ninguna si, en anillo an- gosto y cristales grandes si, cristales pe- queños	ninguno ninguno ninguno	ninguno si, 2-19 muy jun- tos si, 2-5, poco pro- nunciados
	ninguna CaCl ₂ 1 % gluconato de calcio 1 %	Na ₃ PO ₄ " "	si, ténue ancho si, espeso, ancho, abajo más conden- sado si, grueso, muy ancho	ninguna ninguna ninguna	ninguno si, condensado si, grueso	ninguno ninguno ninguno
	ninguna CaCl ₂ 1 % gluconato	Pirofosfato sódico " "	si, muy ténue si, poco si, poco	ninguna si, grandes, estre- llados, en gel lim- pio si, grueso	ninguno si, muy espeso, angosto si, ancho	ninguno ninguno ninguno

Según el cuadro anterior podríamos diferenciar por ej. las siguientes sales por los fenómenos diferenciales que provocan en le gel de gelatina cálcica.

<i>Sal precipitante</i>	<i>Primera capa de difusión precipitante</i>	<i>P.p. cristalinosa</i>	<i>P.p. espeso en anillo irisado</i>	<i>P.p. en anillos rítmicos</i>
Ortofosfato monosódico	no	si	no	no
Ortofosfato disódico	si	si	no	si
Ortofosfato trisódico	si	no	si	no
Pirofosfato sódico	si	si	si	no
Ortofosfato sódico-amónico	no	no	si	si
Fluoruro sódico	si	no	no	no

Resultaría muy fácil diferenciar por este método las sales indicadas. A continuación figura la fotografía del resultado obtenido con la difusión de pirofosfato sódico en un gel de gelatina cálcica. Como puede verse, la formación es sumamente característica.

Formación del precipitado de pirofosfato cálcico, al difundir en gel de gelatina con un 1 % de cloruro de calcio cristalizado, el pirofosfato sódico



Fig. 21. — Se observa, primero una angosta zona de P.p. difusa que termina en forma de cristales dendríticos, después se ven en una zona limpio del gel, formaciones cristalinas dendríticas, y más abajo un ancho precipitado espeso.