

Métodos quelométricos y otros métodos volumétricos de análisis clínicos

A. Holasek \ H. Flaschka



EDITORIAL REVERTÉ

Dr. A. HOLASEK

Docente, Instituto Médico-químico
y Laboratorio Pregl de la Universidad
de Graz (Austria)

Dr. H. FLASCHKA

Profesor, Instituto Tecnológico
de Georgia, Departamento de Química,
Atlanta, Georgia (U.S.A.)

MÉTODOS QUELOMÉTRICOS Y OTROS MÉTODOS VOLUMÉTRICOS DE ANÁLISIS CLÍNICOS

MÉTODOS RÁPIDOS DE ANÁLISIS CLÍNICO-QUÍMICOS



EDITORIAL
REVERTÉ

BARCELONA - BUENOS AIRES - MÉXICO

Título de la obra original:

**Komplexometrische und andere titrimetrische Methoden
des klinischen Laboratoriums**

Edición original en lengua alemana publicada por

Springer Verlag, Viena

Copyright © by Springer Verlag

Edición en español:

© Editorial Reverté, S. A., 1964

Edición en papel:

ISBN: 978-84-291-1830-8

Edición e-book (PDF):

ISBN: 978-84-291-9006-9

Versión española por

Dr. F. Bermejo Martínez

Catedrático de Química Analítica de la Universidad de Santiago de Compostela.

Miembro del Cuerpo de Inspectores Farmacéuticos Municipales.

y

Dr. A. Prieto Bouza

Químico Director de «La Toja, S. A.»

Ex profesor Adjunto de Química Analítica de la

Universidad de Santiago de Compostela.

Propiedad de:

EDITORIAL REVERTÉ, S. A.

Loreto, 13-15. Local B

08029 Barcelona. ESPAÑA

Tel: (34) 93 419 33 36

reverte@reverte.com

www.reverte.com

Reservados todos los derechos. La reproducción total o parcial de esta obra, por cualquier medio o procedimiento, comprendidos la reprografía y el tratamiento informático, queda rigurosamente prohibida, salvo excepción prevista en la ley. Asimismo queda prohibida la distribución de ejemplares mediante alquiler o préstamo públicos, la comunicación pública y la transformación de cualquier parte de esta publicación (incluido el diseño de la cubierta) sin la previa autorización de los titulares de la propiedad intelectual y de la Editorial. La infracción de los derechos mencionados puede ser constitutiva de delito contra la propiedad intelectual (Art. 270 y siguientes del Código Penal). El Centro Español de Derechos Reprográficos (CEDRO) vela por el respeto a los citados derechos.

PRESENTACIÓN

En la bibliografía científica alemana se encuentra un número bastante grande de recetas para la ejecución de los análisis clinicoquímicos. Por ello es lógico preguntarse si es necesaria la aparición de una novedad en este campo. El presente libro debe su nacimiento, por una parte a la experiencia adquirida en la enseñanza de la química a auxiliares técnicos-sanitarios, y por otra a la circunstancia de que ambos autores, en los últimos diez años, han puesto a punto en mi Instituto una serie de métodos quelométricos para el análisis de sangre y orina. Puesto que estos procedimientos ya han sido comprobados en muchos Laboratorios clínicos, le pareció oportuno al editor recopilar en un libro todos los métodos quelométricos que pueden ser usados en Análisis Clínicos, con lo cual se pondrá de relieve la gran ventaja de estas técnicas y se podrá contribuir a que la quelometría encuentre en Química Clínica el empleo y atención que merece.

Al tener en cuenta también otros procedimientos volumétricos, bien elegidos y comprobados, ya generalmente conocidos, resulta un libro de laboratorio que presenta diversas ventajas frente a otros libros análogos.

De acuerdo con la idea de los autores de poner en primer plano los métodos quelométricos, en la parte general se explican los fundamentos teóricos con claridad suficiente para comprender las técnicas. Pero también merecen especial atención las explicaciones sobre otros procedimientos volumétricos, en particular sobre el análisis por neutralización, las observaciones generales para la preparación de las disoluciones valoradas y su conservación. Se definen y explican con claridad los conceptos de molaridad, normalidad, concentración y factor, se habla ampliamente de la importancia de la calidad del material de vidrio para la exactitud de las determinaciones y se hace hincapié sobre las causas de error que también pueden producirse por este motivo. Una especial ventaja de esta disposición la constituye el que el analista encuentra en ella una serie de notas, que quizá parezcan evidentes, pero que, sin embargo, es imprescindible observar al efectuar los procedimientos volumétricos, con el fin de lograr resultados correctos. Además, los autores se han esforzado en exponer solamente métodos que puedan efectuarse sin aparatos costosos, con medios modestos y empleando un mínimo de reactivos. Por todo ello es de esperar que la obra encuentre la más amplia difusión.

Graz, marzo 1961

Prof. Dr. HANS LIEB

Director del Instituto Médico-químico y del
Laboratorio Pregl de la Universidad de Graz

PRÓLOGO

En los últimos años la quelometría * se ha introducido también de manera sorprendentemente rápida en los laboratorios clínico-químicos, debido a su sencillez unida a su gran exactitud y a la estabilidad de las disoluciones valoradas empleadas. Incluso para algunas determinaciones es el único método posible, sobre todo en los laboratorios en los que no resulta rentable la adquisición de costosos aparatos. Éste ha sido el motivo que nos ha movido a hacer un resumen de los métodos quelométricos utilizables en Análisis Clínicos.

Ahora bien, existen una serie de sustancias que no pueden determinarse ni quelométrica ni fotométricamente con suficiente exactitud. Por ello, a los métodos quelométricos hemos añadido con preferencia otros métodos volumétricos, con el fin de que un laboratorio que posea un fotómetro esté en condiciones de poder determinar, con ayuda de los procedimientos expuestos, además de las sustancias que pueden determinarse fotométricamente, otros importantes componentes de la sangre y de la orina.

Al elegir los métodos nos hemos guiado de las siguientes ideas: en primer lugar, son preferidos los métodos quelométricos, no sólo por los motivos antes citados, sino también a causa de que aún no ha aparecido ninguna recopilación de estos métodos enfocada a los laboratorios clínico-químicos. En segundo lugar, es válido el principio de que hasta con la menor cantidad posible de reactivos y sobre todo con el menor número de disoluciones valoradas, siendo éstas muy estables. Del gran número de métodos no quelométricos hemos elegido primeramente aquellos que están muy difundidos y que, según nuestra experiencia, conducen en los análisis de rutina a valores exactos y bien reproducibles. En los contados casos en que se dan dos procedimientos para la determinación de una sustancia, el motivo de ello se encuentra expuesto en la introducción, aunque se trate de un método quelométrico.

No es posible exponer aquí los fundamentos de la Química Analítica, ni siquiera los del Análisis volumétrico. Por lo tanto, la parte general sólo contiene breves explicaciones de los diferentes tipos de valoraciones, para la más fácil comprensión de las reacciones que tienen lugar, así como amplias indicaciones prácticas. Únicamente en el caso de la quelometría se profundiza algo más, pues estos métodos apenas se describen en los libros de texto, incluso en los relativamente recientes. Al contrario de lo que se ha hecho con otros reactivos, se trata en un capítulo especial de la parte general, de la preparación y conservación, así como de las propiedades de las disoluciones valoradas, con lo cual se hace resaltar su especial significación. También

* Conocida también como *Complexometría* o *Valoraciones con AEDT* y análogos.

se hacen observaciones, que a veces parecén carentes de importancia, pero que pueden ser decisivas para el logro de buenos resultados.

Puede ocurrir que si se usa un método de acuerdo con la publicación original, se obtengan con frecuencia resultados erróneos debido a insignificancias que al autor del método le han parecido tan obvias que no se ha preocupado de citar. Nos hemos esforzado en exponer en las observaciones a cada procedimiento las causas de error y las dificultades, así como la forma de eliminarlas. De esta manera, también se consigne describir los procedimientos en forma concisa y clara.

De igual modo que no ha sido nuestra intención el hacer un resumen completo de todos los métodos volumétricos, tampoco se citan todas las referencias bibliográficas sobre los métodos y sus modificaciones. Además del primer trabajo original se citan, ante todo, los trabajos en alemán con resúmenes bibliográficos. Sólo en el caso de los métodos quelométricos se trata con más amplitud la bibliografía, pero aún así no es posible citar todas las referencias de los trabajos, especialmente en el caso de los muchos publicados sobre la determinación de calcio y magnesio.

Queremos hacer resaltar que cualquier método no citado, en ningún caso debe considerarse tácitamente rechazado. La enumeración de todos los métodos, a veces quizá mejores que los citados, pondría al lector ante el dilema de tener que elegir, y obligarle eventualmente a la preparación de más disoluciones, y precisamente es de esto de lo que quieren huir los autores. Serán bien recibidas todas las sugerencias encaminadas a mejorar el libro, siempre que estén de acuerdo con la idea básica de éste.

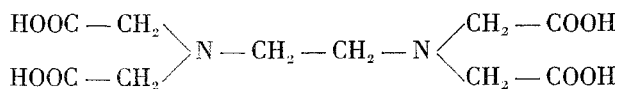
Graz y Atlanta, marzo de 1961.

A. HOLASEK y H. FLASCHKA

PARTE GENERAL

Fundamentos de la quelometría

El ácido etilendiaminotetraacético, abreviadamente AEDT (EDTA en inglés) o YH_4 tiene la fórmula siguiente:



El ácido es un polvo blanco, muy poco soluble en agua (0,02 g en 100 ml) y por ello se emplea raramente. La sal más utilizada, comercialmente, es el dihidrato de la sal disódica, de fórmula $\text{YH}_2\text{Na}_2 \cdot 2 \text{OH}_2$, en donde Y representa el anión del ácido. SCHWARZENBACH, fundador de la quelometría teórica y práctica, ha propuesto el nombre de complexonas * para el AEDT y sustancias análogas (ácidos aminopolicarboxílicos), de donde procede también la denominación de esta rama especial del Análisis volumétrico. Además de complexometría también se emplean los nombres de quelatometría o quelometría.

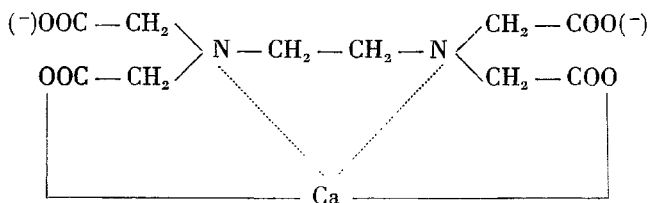
El ácido libre se conoce con el nombre de Komplexone II y la sal disódica antes citada con el de Komplexone III. El nombre Komplexone está registrado por la firma Ueticon, Suiza. Otras denominaciones comerciales son: Titriplex (Merck, Darmstadt) o Idranal (Riedel de Haen, Seelze). En Inglaterra se llaman Sequestrene o Sequestrol, mientras que en América se denominan Versenes. La marca Trilon procede de la Anilin- und Sodafabrik, Ludwigshafen, que fue la primera en sintetizar en escala industrial el AEDT. Este nombre de Trilon es el empleado en la bibliografía rusa. En España se vende bajo los nombres de Kelantren y Compleplan.

De los 4 hidrogeniones disociables, dos son de acidez bastante fuerte, el tercero de fuerza media y el cuarto tiene acidez marcadamente débil. Por ello, a pH aproximadamente 7 existe predominantemente el anión YH_2^{2-} . Como se verá más adelante, esto es de gran importancia en el trabajo práctico.

La especial estructura del AEDT le capacita para la formación de complejos estables, solubles en agua, con casi todos los iones metálicos polivalentes. En ellos el metal está unido tan fuertemente al AEDT no sólo por enlaces iónicos, sino también por enlaces coordinados, que prácticamente deja de existir como tal ion metálico, por lo que tampoco se puede reconocer por medio de sus reacciones características. Así,

* Nombre no utilizable hoy libremente por reclamar su propiedad una casa comercial.

por ejemplo, en presencia de AEDT no se produce, en medio alcalino, la precipitación del calcio como oxalato o la del magnesio como fosfato. El tipo especial de complejos formados se llama complejos quelatos (de ahí el nombre de quelatometría o quelometría) o más abreviadamente quelatos. La particularidad de estos complejos consiste en que el reactivo complejante (el ligando) agarra al ion metálico (ion central) por medio de varios grupos funcionales, a la manera de un cangrejo con sus pinzas. En griego la pinza del cangrejo se llama «Chele». La fórmula desarrollada del complejo AEDT-Ca (AEDT = ácido etilendiaminotetraacético) es la siguiente:



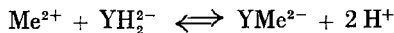
Las líneas de trazo continuo representan los enlaces iónicos (salinos) y las de puntos los coordinados.

El fundamento de una valoración quelométrica se basa en que, al añadir progresivamente la disolución valorada (AEDT), cada vez se combina más ion metálico «dibre», hasta que, finalmente, en el punto final todo el metal está en forma de complejo. Para poner de manifiesto este punto final existen varios procedimientos: visuales, fotométricos, potenciométricos, etc. En los laboratorios clínicos el punto final se reconoce, casi exclusivamente, por medio de indicadores coloreados observados visualmente.

Estos *indicadores* son sustancias que forman compuestos con los iones metálicos (en casi todos los casos también complejos quelatos) cuyo intenso color es diferente del color del indicador libre. No todos los reactivos que producen coloraciones intensas con los iones metálicos sirven como indicadores. Además de otras condiciones que han de cumplir, la más importante es que el complejo indicador-metal sea más débil que el complejo AEDT-metal.

A grandes rasgos, una valoración se efectúa de la manera siguiente: la disolución del ion metálico a valorar se lleva al pH necesario, se añade el indicador y a continuación se va adicionando la disolución valorada de AEDT. Primero se combina el ion metálico «dibre»; una vez consumido éste también se sustrae el metal unido al indicador poniendo de relieve el punto final de la valoración, por la aparición del color del indicador exento de metal. Ciertamente, en la práctica las cosas son algo más complicadas debido a diversas causas.

Como ya se ha dicho antes, en la disolución predomina el anión YH_2^{2-} por lo que la formación de un complejo AEDT-metal puede formularse de la manera siguiente:



Como se ve, por cada ion metálico que se combine se liberan dos iones hidrógeno.

Esto es muy importante por dos motivos. En primer lugar, puede verse que en el transcurso de una valoración aumenta la concentración de iones hidrógeno. Puesto que de ordinario una valoración sólo puede efectuarse en determinadas condiciones de pH, hay que procurar, por tanto, una suficiente regulación para evitar una disminución del pH, o para mantenerlo dentro de ciertos límites favorables.

Por otra parte, la ecuación anterior indica de qué modo pueden hacerse selectivas las valoraciones quelométricas. Por *selectividad* se entiende la propiedad de un reactivo de reaccionar sólo con unos pocos iones de una mezcla iónica complicada. Puesto que, como hemos indicado más arriba, el AEDT forma complejos con casi todos los iones metálicos polivalentes, su selectividad es muy escasa. Si, por ejemplo, en una disolución existen calcio y magnesio, formará complejos con ambos metales y —caso de no tomar otras medidas especiales— solamente podrá valorarse la suma de ambos metales. Pero de la ecuación arriba citada se pueden deducir las siguientes consideraciones:

La adición de iones hidrógeno a la disolución desplazará hacia la izquierda el equilibrio de la reacción, es decir, los complejos se disociarán tanto más cuanto más fuertemente ácida sea la disolución. Con una concentración de iones hidrógeno suficientemente alta, un complejo poco robusto estará muy disociado o lo estará prácticamente de manera total, en tanto que un complejo más fuerte estará tan poco debilitado que aún será posible valorarlo. En la práctica esto significa que, con una diferencia suficiente en la estabilidad de los complejos, puede encontrarse un valor de pH al que se pueda valorar selectivamente un ion metálico que forme complejos fuertes, sin que se produzca interferencia por la presencia de iones metálicos que originen complejos más débiles. Por ejemplo, a pH 2-3 el hierro, que forma con el AEDT un complejo muy estable, puede valorarse, sin interferencia, en presencia de Cu, Ni, Ca, Mn, Mg, entre otros, que forman complejos considerablemente más débiles.

Por tanto, de esto también se infiere que cuanto más débil sea el complejo entre el AEDT y el metal, tanto más alto debe ser el pH a que se efectúe la valoración. Así, el calcio y el magnesio, que forman con el AEDT complejos relativamente débiles, han de valorarse a pH 10 o más, mientras que el cinc, que forma un complejo mucho más fuerte (unas 10 000 000 veces más fuerte que el calcio), aún puede valorarse a pH 4-5.

Muy frecuentemente, también es de gran importancia para el indicador utilizado el ajuste del pH a un valor determinado o dentro de un cierto intervalo. Algunas de las valoraciones aquí descritas se efectúan empleando como indicador el negro de eriocromo T (en adelante, para abreviar, Erio T). El Erio T no sólo es un indicador quelométrico, sino también un indicador ácido-base, es decir, cambia de color tanto por adición o sustracción de iones metálicos como por variación de la concentración de iones de hidrógeno. Una disolución acuosa de Erio T es de color rojo oscuro al añadir ácido. Neutralizando poco a poco el ácido con una base, al llegar a pH aproximadamente 6 se produce un cambio de color al azul.

Al seguir añadiendo base, a pH aproximadamente 12, el color cambia de nuevo al rojo. Por tanto, en una valoración en que se emplee Erio T sólo será utilizable el intervalo de pH de 7 a 11, pues únicamente la forma azul del indicador (indicador libre) reacciona con los iones metálicos virando al rojo vino (indicador «metalizado»).

Lo dicho hasta ahora puede bastar para explicar suficientemente los fundamentos teóricos necesarios para comprender los procedimientos. Pero también debe hacerse ver con toda claridad lo importante que es la fijación de las condiciones de pH precisas para el éxito de la determinación.

Como se ha dicho más arriba, en el punto final el metal pasa del complejo con el indicador al complejo AEDT-metal y se libera el indicador. Es fácil ver que este mecanismo sólo puede funcionar si se cumple la condición fundamental de que el complejo indicador metal sea bastante más débil que el correspondiente complejo AEDT-metal. Si el complejo del indicador fuese más fuerte que el del AEDT no se produciría cambio de color. El cobre, níquel, cobalto, aluminio y otros iones metálicos forman complejos con el Erio T que, en parte, son apreciablemente más estables que los correspondientes complejos con el AEDT. Por tanto, no será posible la valoración de estos metales con AEDT empleando Erio T como indicador. Para la determinación de estos metales disponemos de otros buenos indicadores, pero carecen de interés en Análisis Clínicos, pues los citados metales existen en tan pequeña cantidad en los materiales biológicos que no pueden determinarse volumétricamente.

Sin embargo, es muy importante tener en cuenta que, por ejemplo, el cobre, aun existiendo en trazas, interfiere en la determinación del calcio y magnesio, haciéndola incluso imposible. El cobre reacciona con el Erio T (color rojo), y aun con un considerable exceso de AEDT no se produce viraje al azul. El indicador está bloqueado. Este bloqueo del indicador, según la cantidad de metal interferente que esté presente, puede afectar sólo a una parte o a la totalidad del indicador. En el primer caso se obtiene un punto final poco brusco, difícil de ver; en el segundo caso no se producirá viraje.

Las trazas de cobre son muy frecuentes en la llamada agua «destilada»; pueden existir en la muestra o ser introducidas como impurezas con los reactivos. Si existe cobre en la muestra, la forma más fácil de evitar su interferencia consiste en añadir unos cristallitos de cianuro potásico. El cobre forma con los iones cianuro un cianuro complejo extremadamente estable y ya no es capaz de reaccionar con el Erio T ni con el AEDT. Se dice que está «enmascarado».

El *enmascaramiento*, junto o en combinación con la fijación del pH, constituye uno de los medios más importantes para conseguir selectividad en las valoraciones con AEDT. El enmascaramiento se emplea no sólo para eliminar las trazas de metales interferentes, sino también para inactivar grandes cantidades de metales acompañantes. Así, por ejemplo, no es posible efectuar la valoración del cinc en presencia de iones uranilo frente a Erio T, pues el ion uranilo bloquea al indicador. La adición de carbonato enmascara a los iones uranilo y posibilita la valoración del cinc, como por ejemplo en la determinación del sodio. En la práctica, sin embargo, no se emplea el Erio T, sino otro indicador que produce un viraje más brusco.

Enmascaramiento es también el impedimento de la reacción entre una sustancia *A* y otra *B* por adición de *C*, sin que haya separación física. *C* es el agente enmascarante que enmascara a *A* frente a *B*. Según esta definición, un enmascaramiento también puede producirse por medio de una reacción de precipitación. Por ejemplo, a pH mayor de 12 el magnesio precipita como hidróxido, en tanto que el calcio permanece en disolución. El calcio puede valorarse después en presencia del precipitado de magnesio, de lo que se hace uso en los análisis clínicos. Sin embargo,

es esencial observar que el precipitado de magnesio no se filtra. Si se filtrase ya no sería enmascaramiento, sino una separación.

Hasta ahora se ha hablado sólo de un tipo de valoración, las llamadas *valoraciones directas*. La disolución del metal a valorar se trata con el indicador, se fijan determinadas condiciones y, a continuación, se deja fluir la disolución valorada hasta que se alcance el punto final. Pero puede ocurrir que se presenten dificultades al tratar de fijar las adecuadas condiciones para la valoración. Si, por ejemplo, ha de valorarse el calcio frente al indicador murexida, habrá que trabajar a pH aproximadamente 12. Pero en el caso de que la muestra contenga iones carbonato en estas condiciones el calcio precipitará como carbonato. Bien es verdad que el carbonato cálcico reacciona con el indicador y con el AEDT, pero lo hace tan lentamente que en la práctica es imposible llevar a cabo la valoración. Naturalmente, pueden eliminarse los carbonatos antes de la valoración, pero existe un camino más fácil, la *valoración por retroceso*.

Antes de añadir el hidróxido sódico se trata la disolución problema, débilmente ácida o neutra, con un exceso medido de disolución valorada de AEDT, a continuación ya puede alcalinizarse sin que precipite carbonato cálcico. El calcio está combinado con el AEDT y, por así decirlo, enmascarado frente a la reacción con carbonato. Seguidamente el exceso de AEDT puede «valorarse por retroceso» con una disolución valorada de calcio.

Frecuentemente en la práctica las valoraciones por retroceso suponen una gran ventaja. Una vez efectuada la valoración por retroceso se puede añadir de nuevo algo de AEDT, volver a valorar por retroceso con calcio y repetir esto varias veces. Se toma la media de las lecturas de las buretas de calcio y AEDT, eliminándose así el «error de gota» de la valoración. A este procedimiento se le llama *valoración pendular u oscilante*.

La mayoría de las veces también se puede evitar la interferencia producida por el cobre en el punto final de las valoraciones con Erio T mediante las valoraciones por retroceso. El cobre se combina con el AEDT y reacciona muy lentamente con el indicador, de suerte que se concluye la valoración antes de que se produzca el bloqueo. En las valoraciones por retroceso hay que advertir que el cambio de color producido al añadir la disolución de la sal metálica no indica el «verdadero» punto final. Este cambio de color es producido por una pequeña cantidad de metal en exceso. Sin embargo, el punto final correcto se logra cuando el indicador existe en forma libre. Por tanto, para concluir la determinación se debe valorar con AEDT hasta conseguir el color del indicador libre.

Teóricamente el punto final debe elegirse de forma que el color de la disolución, debido al indicador, corresponda exactamente a la cantidad de ion metálico libre que viene dada por la disociación del complejo AEDT-metal (en el equilibrio). Sin embargo, esto supondría que, en casi todos los casos, las valoraciones quelométricas habría que efectuarlas no hasta un color límite, sino hasta alcanzar un color mixto. En el caso del Erio T, por ejemplo, debería valorarse hasta una determinada tonalidad púrpura, lo que es muy difícil. Sin embargo, matemáticamente se ha visto, en completo acuerdo con la experiencia, que puede desprejarse el «error del indicador» producido al valorar hasta un color límite, y en todos los casos es menor que el error que se introduciría si se valorase hasta alcanzar un color mixto.