

# CATEDRA DE ANALISIS QUIMICO

Prof. Dr. R. García Villanova

## Micrométodo fotocolorimétrico de determinación de urea

por

R. García Villanova y J. Thomas Gómez

Siendo la urea una substancia de notoria importancia, no sólo en análisis, donde su uso como reactivo es frecuente, sino por encontrarse en el organismo como residuo del metabolismo albuminoideo, se explica fácilmente que haya sido objeto de numerosas publicaciones orientadas a su dosificación.

Los macro y micrométodos clásicos que aún siguen empleándose se basan: en la liberación del nitrógeno por oxidación y medida del mismo en gasómetro adecuado; transformación de la urea en amoniaco por la ureasa y medida fotocolorimétrica del mismo y determinación gravimétrica del precipitado obtenido al reaccionar con el xantidrol en disolución acética.

Los métodos colorimétricos, a causa de su sencillez, han sido empleados con éxito. ROSENTHAL (1) dosifica el producto de condensación de la urea con diacetilmonoxina acidificada y posterior oxidación con ácido arsénico y WEARNE (2), en lugar de hervir, lo hace a presión, lo-

grando un ahorro de tiempo y mayor estabilidad del color. De forma parecida y fundado en el mismo principio SARDOV (3) y KITAMURA (4) ha mejorado el método sirviendo como patrón frente a otros procedimientos.

Empleando la ureasa, como decimos al principio, opera HIJAR (5), y GOIFFON (6) aplica este principio con la particularidad de hacer la toma de sangre sobre papel secante. RAPPAPORT y EICHNON (7) lo hacen previa determinación del nitrógeno no protéico. FLEURI y EBERHARD (8) hacen uso de la ureasa y la reacción fenol-hipoclorito cuya coloración azul se presta bien a la dosificación colorimétrica. KRIEGER (9) desplaza en medio alcalino el amoniaco producido por la ureasa absorbiéndolo con ácido sulfúrico y, basado en la técnica de King, HESKETH (10) la dosifica en disolución isotónica con el suero sanguíneo.

Otras técnicas colorimétricas han sido empleadas por ARCHIBALD (11) basándose en la coloración roja obtenida con la urea y la  $\alpha$ -nitroso propiofenona en medio ácido. FENECH (12) utiliza la coloración rosa que se obtiene con la resorcina, BROWN (13) con el p-dimetilamido benzaldehído y BAFUSZ (14) con el clorhidrato de fenilhidrazina y disolución DAM.

Como decimos, el precipitado que se obtiene tratando la urea con el xantidrol, permite su dosificación. El clásico método de Fosse ha sido aplicado para su determinación en sangre por CARAWAY (15) y LAWRIE (16) aplica este principio para la dosificación turbidimétrica.

También se ha utilizado la determinación yodométrica para la valoración en sangre por MARCO y TORRELLA (17) que emplean exceso de hipobromito que valoran finalmente por yodometría. VAZQUEZ (18) oxida con hipobromito la urea en presencia de fenoltaleina que toma color verdoso cuando ha terminado la oxidación de la primera.

Las determinaciones gasométricas tan usadas en clínica, como son los métodos de Neveu para orina y Ambard para sangre se fundan en la oxidación por el hipobromito y el nitrógeno desprendido se recoge en el gasómetro. Existen varios modelos como los de Muñoz Cortazar, Fuente Hita, Barrón y «Saher» entre otros. Uno de uso común para líquidos biológicos es el de REPETTO (19) y los propuestos por HERNANDEZ ANDUEZA (20 y 21).

Finalmente y utilizando el método original «Saher», SORANDESES y HERNANDEZ (22) determinan con hipobromito la urea, incluso la reserva alcalina. La coloración marrón que se obtiene con el cloruro mercurico ha sido aplicada por BURLINA (23) para una cuantitativa aproximada. ROSENTHALER (24) sin llegar a aplicar el método de Kjeldhal, trata con

ácido sulfúrico en caliente y destila el amoniaco que valora posteriormente. Una nesslerización directa partiendo de una disolución de ureasa ha sido propuesta por GUZMAN AGUERO (25) siguiendo la técnica de Walter Karr modificada por Mata.

### Fundamento del método

El nitrógeno existe en la molécula de urea en grupos- $\text{NH}_2$ , siendo por tanto atacable por el ácido sulfúrico concentrado para ser transformada en amoniaco. El método ensayado, basado en este principio, permite que el ataque se realice en sólo unos segundos y la dosificación de amoniaco se hace por fotocolorimetría directa por su reacción con el reactivo de Nessler.

La transformación cuantitativa de la urea en amoniaco por el ácido sulfúrico en caliente en presencia de ácido perclórico partiendo de cantidades de 0,1 mg. y aún menores, ofrece dificultades a causa de una oxidación parcial del nitrógeno uréico.

Partiendo de una disolución de urea conteniendo 0,5 g. en 1000 ml. de agua, calentada con ácido sulfúrico conc. (D: 1,84) hasta la aparición de humos blancos, agregando III gotas de disolución de ácido perclórico del 60%, espaciadas convenientemente, se da por terminado el ataque cuando van transcurridos unos tres minutos de calentamiento. La disolución sulfúrica conteniendo los productos de oxidación de la urea, diluida en 50 ml. de agua destilada y alcalinizando con 2,5 ml. de disolución de hidróxido sódico conteniendo 30 g. en 100 de agua, agregando 1 ml. de reactivo de Nessler y haciendo la lectura fotocolorimétrica a los 5 minutos, da lugar a los resultados que se exponen en la tabla Ia.

Tabla Ia

Tubo número	Dis. urea 0,5 g l (ml)	Acido sulfúrico (ml)	Acido perclórico (ml)	Agua destilado (ml)	Disol. NaOH (ml)	Reacc. Nessler (ml)	Dens. optica
1	0,1	0,5	3	50	2,5	1	0,06
2	0,2	0,5	3	50	2,5	1	0,09
3	0,3	0,5	3	50	2,5	1	0,20
4	0,4	0,5	3	50	2,5	1	0,20

En la tabla Ib se exponen los resultados obtenidos con una disolución de cloruro amónico cuya concentración en ión amonio se corresponde con el que estequiométricamente debiera formarse con la urea contenida en igual volúmen:

Tabla Ib

Tubo número	Cl. amón 0,891 g L (ml)	Ac. sulfúrico conc. (ml)	Agua destilada (ml)	Disol. NaOH (ml)	Reac. Nessler (ml)	Dens. óptica
1	0,1	0,5	50	2,5	1	0,08
2	0,2	0,5	50	2,5	1	0,13
3	0,3	0,5	50	2,5	1	0,18
4	0,4	0,5	50	2,5	1	0,23

Comparando los resultados de las tablas precedentes se aprecia que la transformación del nitrógeno uréico en amoniaco no es cuantitativa. Hay que suponer que, o bien hay una pérdida de nitrógeno por volatilización o sufre una oxidación parcial.

Permaneciendo incolora la disolución de urea durante el tiempo que dura el ataque y no existiendo circunstancia alguna que indicase el final de la reacción, se hicieron ensayos colocando en cada tubo, antes del comienzo del ataque, una gota de disolución de glucosa al 3-5% y operando como en el caso anterior. En estas condiciones, la disolución sulfúrica se ennegrece y al añadir el ácido perclórico se logra a los pocos segundos de calentamiento que la disolución quede transparente, sirviendo la glucosa en este caso como indicador del final del ataque. Los resultados obtenidos se exponen en la tabla IIa:

Tabla IIa

Tubo número	Dis. urea 0,5 g/L (ml)	Acido sulfúrico (ml)	Acido perclórico (gotas)	Agua destilada (ml)	Dis. glucosa (gotas)	Dis. NaOH (ml)	React. Nessler (ml)	Dens. opt.
1	0,1	0,5	3	50	1	2,5	1	0,07
2	0,2	0,5	3	50	1	2,5	1	0,12
3	0,3	0,5	3	50	1	2,5	1	0,17
4	0,4	0,5	3	50	1	2,5	1	0,20

Los resultados que se obtienen con la disolución patrón de cloruro amónico se exponen en la tabla IIb:

Tabla IIb

Tubo número	Cl. amónico 0,891 g/L (ml)	Ac. sulfur conc. (ml)	Agua des. (ml)	Disol. NaOH (ml)	Reac Nessler (ml)	Dens óptica
1	0,1	0,5	50	2,5	1	0,09
2	0,2	0,5	50	2,5	1	0,14
3	0,3	0,5	50	2,5	1	0,20
4	0,4	0,5	50	2,5	1	0,25

Comparando las cifras encontradas en las tablas IIa y IIb, se comprueba que la presencia de la glucosa es beneficiosa en el ataque. Aun así, las cifras encontradas son bajas con relación a la cantidad de amoniaco que debiera formarse.

La posibilidad de que la cantidad de ácido perclórico fuera excesiva, dio motivo a que se practicaran experiencias reduciéndolo a sólo una gota. Incluso el tamaño de esta tiene influencia debiendo medir 0,015-0,02 ml., usando para ello una pipeta de 0,1 ml. dividida en centésimas.

En la tabla IIIa se exponen los resultados encontrados operando con esa cantidad de ácido perclórico y en la tabla IIIb se comprueba con la disolución patrón de cloruro amónico.

Tabla IIIa

Tubo número	Dis. urea 0,5 g/L (ml)	Acido sulfúrico (ml)	Acido perclórico (ml)	Agua destilado (ml)	Dis. glucoso (gotas)	Dis. NaOH (ml)	Reac. Nessler (ml)	Densidad óptica
1	0,1	0,5	0,015—0,02	50	1	2,5	1	0,12
2	0,2	0,5	»	50	1	2,5	1	0,18
3	0,3	0,5	»	50	1	2,5	1	0,24
4	0,4	0,5	»	50	1	2,5	1	0,29

Tabla IIIb

Tubo numero	Cl. amónico 0,891 g/L (ml)	Acido sulfúrico (ml)	Agua destilada (ml)	Disol NaOH (ml)	Reoc. Nessler (ml)	Densidad óptica
1	0,1	0,5	50	2,5	1	0,10
2	0,2	0,5	50	2,5	1	0,16
3	0,3	0,5	50	2,5	1	0,22
4	0,4	0,5	50	2,5	1	0,27

Comprobada la influencia que tiene la cantidad de ácido perclórico añadida y la presencia de la glucosa, se realizaron una serie de ensayos con mayor número de tubos para deducir el margen de concentraciones en las que se sigue la ley de Beer. En las tablas IVa y IVb se dan los resultados obtenidos con las disoluciones patrón de urea y cloruro amónico respectivamente, expresándose asimismo el pH de las disoluciones que han de ser fotocolorimetradas y la temperatura. La medida de la disolución de urea de los tubos 1 y 2 fue practicada partiendo de la disolución madre diluida al décimo y tomando 0,25 y 0,5 ml. respectivamente.

*Construcción de la curva-patrón.*—En tubos de ensayo de 15 x 1,5 cm. bien secos se colocan con una pipeta dividida en centésimas la disolución de urea al 0,5 g/L. debiendo introducir la punta hasta tocar el fondo del tubo y lograr que quede en el mismo los mililitros de disolución que se indican en la tabla IVa pero despreciando los dos primeros tubos. En cada tubo se pone una gota de disolución de glucosa al 3-5% procurando caiga íntegra en el fondo y a cada tubo se agrega 0,5 ml. de ácido sulfúrico concentrado (D: 1,84). Ayudándose de una pinza se calienta cada tubo a la llama del mechero agitando sin cesar para evitar proyecciones y cuando aparecen humos blancos se apartan del calor para depositar en cada uno una gota (0,015-0,02 ml.) de ácido perclórico del 60% que deberá caer al fondo del tubo si está colocado en posición vertical. De nuevo se lleva a la llama del mechero aproximándolo y retirándolo para mantener la ebullición regular y evitar la proyección. En pocos segundos se consigue que el líquido de ataque comience a aclararse hasta hacerse transparente. Si el contenido del tubo al final del calentamiento toma color amarillo limón, no es aconsejable seguir calentando puesto que al enfriar se tornará incoloro. El ataque dura en los primeros tubos de 15 a 30 segundos y en los últimos algo más de 1 minuto.

Tabla IV.a

Tubo número	Dis. urea 0,5 g/L (ml)	Acido sulfúrico (ml)	Acido perclórica (ml)	Agua destilada (ml)	Dis. glucosa (gotas)	Dis. NaOH (ml)	Reac. Nessler (ml)	pH	Tem.º °C	Densidad óptica
1	0,025	0,5	0,015-0,02	50	1	2,5	1	13,60	24	0,07
2	0,05	0,5	»	50	1	2,5	1	13,60	24	0,08
3	0,1	0,5	»	50	1	2,5	1	13,64	24	0,11
4	0,15	0,5	»	50	1	2,5	1	13,54	24	0,14
5	0,2	0,5	»	50	1	2,5	1	13,60	24	0,18
6	0,25	0,5	»	50	1	2,5	1	13,62	24	0,21
7	0,3	0,5	»	50	1	2,5	1	13,84	24	0,24
8	0,35	0,5	»	50	1	2,5	1	13,30	24	0,27
9	0,4	0,5	»	50	1	2,5	1	13,58	24	0,30

Tabla IVb

Tubo número	Cl. amónico 0,891 g/L (ml)	Acido Sulfúrica (ml)	Agua destilada (ml)	Disol. NaOH (ml)	Reac. Nessler (ml)	pH	Temperatura °C	Densidad óptica
1	0,025	0,5	50	2,5	1	13,70	24	0,06
2	0,05	0,5	50	2,5	1	13,72	24	0,07
3	0,1	0,5	50	2,5	1	13,69	24	0,10
4	0,15	0,5	50	2,5	1	13,67	24	0,13
5	0,2	0,5	50	2,5	1	13,65	24	0,16
6	0,25	0,5	50	2,5	1	13,65	24	0,19
7	0,3	0,5	50	2,5	1	13,68	24	0,22
8	0,35	0,5	50	2,5	1	13,69	24	0,26
9	0,4	0,5	50	2,5	1	13,71	24	0,28



Cuando ha terminado el ataque del último tubo, los primeros han enfriado lo suficiente para hacer la dilución. Se vacía la disolución sulfúrica sobre un matraz cónico de 100 ml. que contiene 50 ml. de agua destilada. Se vierte agua del matraz sobre el tubo y así se repite la operación dos o tres veces con lo que se consigue transvasar íntegramente el contenido del tubo al matraz. Se alcaliniza con 2,5 ml. de disolución de hidróxido sódico exento de carbonato que contiene 30 g. en 100 ml. de agua destilada y seguidamente 1 ml. de reactivo de Nessler. Cuando van transcurridos unos cinco minutos aproximadamente se hacen las lecturas en el fotocolorímetro. El empleado por nosotros es el modelo Speker de la casa Hilger con filtro violeta (440 m $\mu$ .) que presenta para este color la máxima absorción. Con los datos obtenidos se construye la curva.

*Método.*—Se parte de un volumen de disolución de urea que oscile entre 0,1 y 0,45 ml. de una concentración aproximada a 0,5 g/L. y se deposita en el fondo de un tubo de ensayo de 15 x 1,5 cm. tratándola como se ha dicho anteriormente para la construcción de la curva patrón. Diluido el contenido del tubo en 50 ml. de agua, alcalinizando con 2,5 ml. de disolución de hidróxido sódico, agregando 1 ml. de reactivo de Nessler, a los cinco minutos se hace la lectura colorimétrica en las condiciones ya expuestas. La concentración del problema se deduce con la ayuda de la curva patrón.

*Conclusiones.*—Con el método propuesto pueden dosificarse de 50 a 200 gammas de urea.

El amoniaco se determina directamente sin recurrir a su destilación ni difusión.

El método puede ser empleado para la determinación de urea en líquidos biológicos donde suele tener una concentración aproximada a la de la disolución patrón usada, siempre que se separen convenientemente los demás elementos nitrogenados. Nosotros lo hemos empleado con éxito en líquido cefalorraquídeo.

#### RESUMEN

Se propone un micrométodo de dosificación de urea, transformándola en amoniaco, previa hidrólisis rápida y lectura directa de la coloración producida con el reactivo de Nessler. Permite determinar cantidades de urea comprendidas entre las 50 y 200 gammas.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) ROSENTHAL, H. L.—*Analyt. Chem.*, 27 1980 (1955), Ref. en *Medicamenta*, 16, 113 (1956).
- (2) WEARNE, J. T.—*Journal Of Clin. Pathology*, 11 (n.º 4) (1958), Ref. en *Laboratorio*, 27, 93 (1959).
- (3) SARDOV, R.—*An. de Biol. Clin.* n.º 1-2 (1958), Ref. en *Laboratorio*, 25, 551 (1958).
- (4) KITAMURA, E. I.—*Clin. Quim. Acta*, 4, (n.º 5) (1959), Ref. en *Laboratorio*, 29, 96 (1960).
- (5) HIJAR ARIÑO, A.—*Laboratorio*, 12, 501 (1951).
- (6) GOIFFON, R. y GOIFFON, B.—*Laboratorio*, 15, 173 (1953).
- (7) RAPPAPORT, F. y EICHNOM, F.—*The Laboratory Digest*, 2, 14-15 (1951), Ref. en *Laboratorio*, 19, 465 (1952).
- (8) FLEURY, P. y EBERHARD, R.—*Ann. Pharm. Franc.*, 16, (n.º 7-8) (1958), Ref. en *Laboratorio*, 27, 481 (1959).
- (9) KRIEGER, L.—*La Presse Medicale*, n.º 53 (1951), Ref. *Laboratorio* 13, 49 (1952).
- (10) HESKETH, A.—*The Canadian J. of Med. Tecnology*, 18, 1 (1956), Ref. en *Laboratorio*, 22, 139 (1956).
- (11) ARCHIBALD, R.—*Monitor de la Farmacia*, 1633. 268 (1946).
- (12) FENECH, T.—*Boll. Chim. Farm.*, 91, (1952), Ref. en *El Monitor de la Farmacia*, 1552, 51 (1953).
- (13) BROWN, H. H.—*Anal. Chim.*, 1844 (1959), Ref. en *el Monitor de la Farmacia*, 1736, 332 (1960).
- (14) BAJUSZ, E.—*Das Arztliche Laboratorium*, 1 (n.º 4) (1955), Ref. en *Laboratorio*, 21, 73 (1956).
- (15) CARAWAY, W. T.—*Lettre Med. Tours*, 23, (1956), Ref. en *el Monitor de la Farmacia*, 1653, 236 (1956).
- (16) LAWRIE, H.—*Laboratorio*, 26, 566 (1958).
- (17) MARCO, R. y TORRELLA, E.—*Laboratorio*, 7, 201 (1949).
- (18) VAZQUEZ, A.—*El Monitor de la Farmacia*, 247 (1956).
- (19) REPETTO, B.—*Laboratorio*, 7, 341 (1949).
- (20) HERNANDEZ ANDUEZA, P.—*Laboratorio*, 3, 67 (1947).
- (21) HERNANDEZ ANDUEZA, P.—*Laboratorio*, 12, 401 (1951).
- (22) SORANDESES, A. y HERNANDEZ, J.—*Laboratorio*, 2, 301 (1956).
- (23) BURLIÑA, A.—*II progreso médico*, 11, (n.º 5) (1955), Ref. en *Laboratorio* 20, 19 (1955).
- (24) ROSENTHALER, L.—*Pharm. Ztg.*, 88, 252 (1952), Ref. en *Medicamenta*, 7, 314 (1952).
- (25) GUZMAN AGUERO, H.—*Laboratorio*, 11, 65 (1951).