

UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA ORIENTAL DEL URUGUAY

ANALES

DE LA

FACULTAD DE
QUIMICA Y FARMACIA



VOL. 4

1 9 5 5

HERALDO J. BIANCHI
Ingeniero Químico

INVESTIGACION TOXICOLOGICA DE COMPUESTOS METALICOS

(Método general de destrucción)

JUAN F. SAREDO y JOSÉ D. LEMA

Instituto de Química. Facultad de Química y Farmacia

RESUMEN

Se estudia una técnica de destrucción que asegura la mineralización completa de la materia orgánica, pudiendo servir en forma general para la investigación de los tóxicos denominados minerales o metálicos en química toxicológica. La técnica se desarrolla en tres etapas y coordina: I) La acción solubilizante por degradación ácida y oxidación del ácido nítrico diluído. II) La concentración de la solución, que completa la acción de dicho ácido y facilita luego el ataque sulfonítrico. III) Ataque sulfonítrico sobre el residuo anterior. Se realiza en un pequeño y simple aparato de destilación que permita separar tres fracciones: a) el mercurio por volatilización durante el ataque sulfonítrico; b) el arsénico por destilación con HCl; c) en el residuo del ácido sulfúrico quedan los metales tóxicos de importancia secundaria: plomo, bario, cobre, zinc, etc.

La técnica se conduce asegurando el máximo de rendimiento de reactivos lo que reduce el costo y evita posibilidades de contaminación. Como las pérdidas son mínimas, operando con sólo 100 gramos de masa visceral, es posible asegurar la identificación de los tóxicos metálicos dentro de límites aceptables, en los casos frecuentes que la falta de antecedentes no permitan orientar la investigación y exige el empleo de métodos generales.

Trabajando con 100 gramos de mezcla orgánica (carne, hígado y riñón) es posible identificar por reacciones corrientes hasta: mg. 0,1

de arsénico (mineral y orgánico); mg. 0,1 de mercurio (mineral y orgánico); 2 mg. de plomo, bario y cobre; 4 mg. de zinc, cadmio y bismuto.

La investigación química toxicológica de los llamados tóxicos minerales o metálicos, comprende todos aquellos cuya toxicidad puede atribuirse a la presencia de determinado elemento; por lo general, se incluye el arsénico, mercurio, plomo, bario, zinc, cobre, cadmio, etc., y contribuye a la formación de este grupo, el hecho que la técnica de investigación que se sigue involucra la mineralización de esos elementos a efectos de efectuar su identificación mediante las propiedades químicas analíticas de sus iones.

La mineralización, llamada corrientemente destrucción de sustancia orgánica, tiene importancia fundamental, pues la sustancia orgánica puede provocar interferencias capaces de hacer fracasar la investigación química analítica; las interferencias pueden ser de dos órdenes: 1º) la sustancia orgánica, aun estando mineralizado el elemento tóxico, puede inhibir el proceso de separación como también, las reacciones químicas de identificación; 2º) el elemento está formando parte de un compuesto orgánico estable, y no responde a las reacciones que conducen a su identificación; pueden presentarse dos casos: el elemento fué introducido al organismo formando parte de un compuesto orgánico, o introducido en forma mineral, fué transformado por el organismo en un compuesto orgánico estable durante el proceso de absorción o fijación.

Por las razones expuestas, para la investigación de tóxicos minerales, es fundamental la destrucción total de la sustancia orgánica, inclusive los posibles complejos inorgánicos estables; de modo que, la mineralización iónica asegure en todos los casos la identificación del elemento; aunque exista la posibilidad de investigar un elemento en presencia de sustancias orgánicas, no es una posición segura para un método general, pues la diversidad de compuestos que pueden formarse o sintetizarse, hace imposible prever un comportamiento constante.

La influencia de la sustancia orgánica fué reconocida por los químicos que realizaban investigaciones químicas toxicológicas desde principios del siglo pasado; una bibliografía completa es difícil de recopilar,

pues la mayoría de los químicos especializados en química legal han ideado métodos y modificaciones técnicas; una bibliografía histórica bastante completa puede verse en (1, 2). Voy a enumerar algunos métodos o técnicas que históricamente merecen destacarse y otras de personas vinculadas a nuestro ambiente.

Posiblemente uno de los primeros métodos de destrucción fué debido a Rapp (1817) que empleó la incineración con el agregado de nitrato de potasio; la técnica de incineración fué modificada en muchos sentidos y la más racional fué la propuesta por Bertrand (1903) empleando la bomba calorimétrica.

Los métodos por vía húmeda empleando diversos ácidos tiene innumerables variantes; desde el empleo del HCl sólo (Liebig, 1857) y asociaciones con diversos oxidantes; así tenemos: el método clásico de Fresenius y Babo (1844) empleando HCl y ClO_3K ; el método de Ogier (3) (año 1890) haciendo pasar gas HCl sobre las vísceras mezcladas con ClO_3K ; la mezcla de HCl y HNO_3 fué empleada por Malaguti y Sarzean (1851), Bechamps (1861); el profesor de nuestra Facultad, Dr. Pedro Peluffo (4), la estudió con dos variantes racionales: relación estequiométrica de los ácidos para producir la autodescomposición y destrucción con refrigerante a reflujo.

Los métodos que emplean el H_2SO_4 son por lo general métodos de destrucción integral; la iniciación de su empleo se remonta a Flandin y Danger (1841) y Filohl (1848); luego fué perfeccionado por Gautier (1873), pero el perfeccionamiento técnico más pulido corresponde a Denigés (5) (año 1903). Entre las modificaciones más recientes está la coordinación con el empleo del ácido perclórico a través de Kahane y sus colaboradores (6, 7); este método, a pesar de ser rápido y asegurar una mineralización tan perfecta como el de Denigés con la ventaja de describir una técnica en recipiente cerrado (7), no se ha generalizado, pues el empleo del ácido perclórico puede provocar explosiones sorpresivas (7, 8).

Sobre el empleo de otros agentes de destrucción corresponden citar los propuestos por el químico argentino J. Magnin, empleando el bromo (9) y el perhidrol (10).

La materia visceral, a pesar de estar constituida principalmente por sustancias químicas de gran complejidad (proteínas, carbohidratos y lípidos) tiene la particularidad de sufrir con relativa facilidad la degradación ácida formando compuestos más simples y solubles: ácidos aminados, glucosa, ácidos grasos (insolubles); pero luego resulta muy difícil la mineralización completa a: CO_2 , H_2O , $\text{N}_2(\text{NH}_3)$.

Teniendo el propósito de desarrollar una técnica general se debe elegir la que asegure una mineralización lo más completa posible y que al mismo tiempo las pérdidas de tóxicos sea mínima; de hecho el método que mejor asegure esas dos condiciones llenará la finalidad propuesta. Dada las dificultades técnicas de operar con grandes masas en tubos o bombas cerradas, debe descartarse la incineración; también debe descartarse las técnicas a base de HCl y HNO₃, pues, por lo general, conducen a soluciones más o menos incoloras, que mantienen en solución cantidades apreciables de sustancias orgánicas; si se evaporan las soluciones finales y el residuo se trata con H₂SO₄ concentrado, se produce una carbonización intensa que comprueba la relativa eficacia de destrucción de los distintos métodos.

De las técnicas propuestas, la técnica sulfonítrica de Denigés, es una de las que asegura una mineralización más completa, pero realizada en recipientes abiertos la pérdida de tóxicos puede ser apreciable, en especial el mercurio, cuya pérdida puede ser total.

La técnica que se propone es fundamentalmente una destrucción sulfonítrica, pero aplicada a una masa depurada y concentrada por un proceso previo, permite realizar la destrucción en un aparato de destilación relativamente pequeño y sencillo; además, se ha previsto la investigación sistemática de los tóxicos, destilando fraccionadamente el mercurio y el arsénico.

La técnica se desarrolla en tres etapas sucesivas y coordina la acción de diversos agentes de destrucción. En la primera etapa se emplea ácido nítrico diluído que por su acción hidrolizante y oxidante permite solubilizar la materia visceral exceptuando los ácidos grasos y posiblemente alguna grasa difícil de descomponer; en la segunda etapa se concentra la solución, lo que permite completar la acción del ácido y facilitar luego el ataque sulfonítrico.

Para evitar pérdidas, la concentración se realiza mediante la evaporación de superficie calentando desde arriba, empleando lámparas infrarrojas.

La tercera etapa es la destrucción sulfonítrica que se hace dejando avanzar la carbonización en forma progresiva, tratando de oxidar con HNO₃ el carbón coloidal que se va formando; las adiciones se regulan tratando de aprovechar el HNO₃ y evitando pérdidas, por destilación. La técnica ha previsto la separación de los tóxicos en tres fracciones: a) el mercurio que se volatiliza durante la destrucción sulfonítrica; b) el arsénico que se destila adicionando HCl; y c) en la solución sulfúrica quedan los metales fijos.

Cabe destacar que el residuo de la evaporación de la solución ácida (segunda etapa), por su pequeño volumen, permite abordar la aplicación de otras técnicas de investigación (análisis espectrográfico, incineración en tubos o bombas).

Técnica del método de destrucción

Primera etapa.— En un matraz de Erlenmeyer de un litro de capacidad se colocan bien triturados 100 gramos de vísceras y unos 100 ml. de agua para formar una papilla; si el material proviene de la investigación de tóxicos volátiles se trabaja directamente sobre el residuo de la destilación.

A dicha papilla se mezcla unos 30 ml. de HNO_3 concentrado; el matraz se tapa con un embudo y se calienta sobre tela metálica, manteniéndolo a suave o incipiente ebullición hasta alcanzar la desintegración del material; por lo general necesita unas 3 ó 4 horas. Se deja enfriar para permitir que las grasas se solidifiquen; luego se filtran por papel húmedo.

Segunda etapa.— Para la investigación corriente basta operar sobre la mitad del filtrado (equivalente a 50 gramos de vísceras) que se coloca en una cápsula de porcelana amplia y chata para facilitar la evaporación que se hace mediante una lámpara de rayos infrarrojos colocada a distancia prudencial de la superficie del líquido.

La evaporación se prolonga hasta consistencia siruposa (~ 20 ml.).

Tercera etapa.— Se lleva la cápsula a una campana de gases o un lugar abierto; se deja enfriar, se agregan 5 ml. de H_2SO_4 concentrado, mezclar; adicionar y mezclar nuevamente otros 5 ml. de H_2SO_4 . Si luego de esas adiciones no se produce reacción intensa (emisión de vapores nitrosos abundantes), se calienta la cápsula en forma gradual hasta que se inicie reacción intensa, retirar el mechero y luego a intervalos calentar en forma suave hasta que deja de producirse vapores nitrosos; se adiciona luego otros 10 ml. de H_2SO_4 y la mezcla se trasvasa al matraz de destrucción "D"; con 5 ml. de H_2SO_4 se enjuaga la cápsula y se recogen en el mismo matraz "D". Se ponen en el matraz unas 5 perlas de vidrio y luego de humedecer el esmerilado con H_2SO_4 , se dispone el aparato en la forma del dibujo.

El matraz de destrucción "D" para las cantidades establecidas, debe tener una capacidad mínima de 250 ml. (si se dispone es mejor emplear matraz de 300 a 350 c.c.); el tubo de destilación o desprendimiento (a. d.) consta de cuatro partes en una sola pieza, el cierre es-

meril que cierra el matraz "D", un ensanchamiento "a" que actúa como pequeña cámara de condensación, un tubo de desprendimiento "d" acodado y cuyas medidas están indicadas en el dibujo, y un pequeño embudo "e" de capacidad unos 5 c.c. con su llave de esmeril y que termina con un vástago que llega a $\frac{1}{3}$ del fondo de "D". Con el fin de simplificar el aparato y no teniendo necesidad de una refrigeración intensa como sistema de refrigeración del tubo de desprendimiento "d" se emplea una mecha de algodón "m" que se envuelve varias veces en el tubo "d"; la circulación del agua se hace sumergiendo un extremo en un recipiente alto "C", mientras el otro extremo descarga el agua en un vaso "V".

Los vapores durante la destrucción se reciben en un matraz Erlenmeyer (E_1) de 500 c.c. que se ha lavado y escurrido de modo que mantenga húmedas sus paredes, actuando como cámara de condensación.

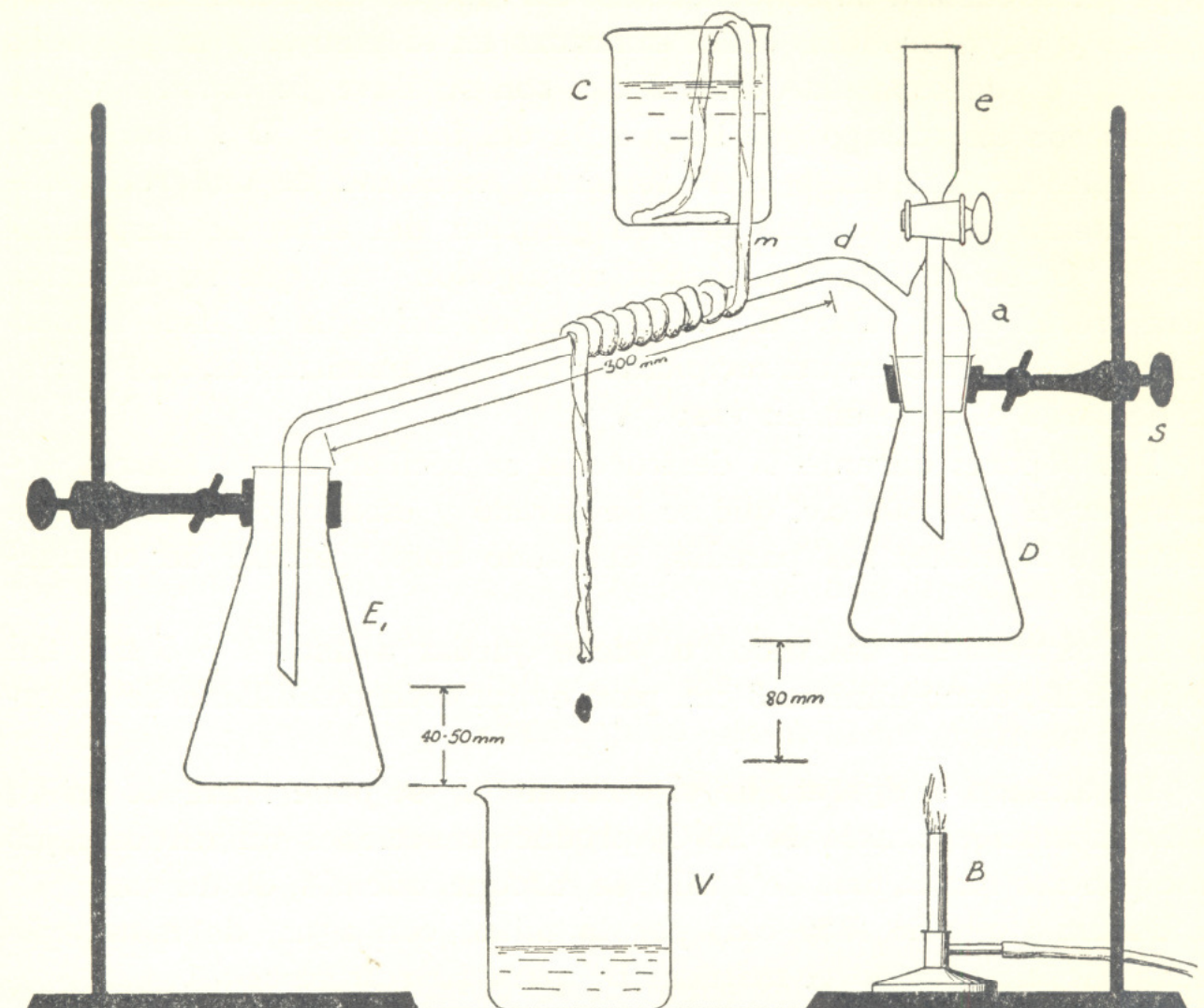
La extremidad del tubo "d" debe quedar a unos 4 ó 5 cm. del fondo de E_1 ; como mínimo 3 cm. para evitar toda posibilidad de absorción.

Ya armado el aparato en el embudo "e" se pone 1 ml. de HNO_3 (como la adición brusca de HNO_3 produce reacciones tumultuosas, no debe ponerse nunca más de 1 ml.); se dispone, además, de un vaso "V" de Bohemia amplio (800 c.c.) por la mitad con agua, de modo que pueda ser introducido el matraz "D" para su refrigeración.

Debe además preverse la agitación del matraz "D" dándole al conjunto una disposición adecuada en la mesa; una buena forma para agitarlo es tomar con una mano el soporte a la altura de la pinza "S", y con la otra, la pinza que sostiene el cuello del matraz E_1 , luego se imprime un suave movimiento lateral o de adelante para atrás.

Posiblemente el mayor cuidado de la operación está al iniciar la destrucción, pues al calentar la solución sulfúrica puede producirse una reacción violenta originándose abundante espuma capaz de invadir la ampolla "a" y el tubo "d"; para evitarlo se calienta al principio con una débil llama de un micromechero "B" a una distancia apreciable (8 cm.) del fondo, se agita a menudo el matraz "D"; si tiende a producirse una reacción violenta se retira el mechero y si la espuma amenaza invadir la parte superior del matraz, se enfría acercando el vaso "V" y sumergiendo en su interior el matraz hasta el cuello; en general, producida la reacción intensa del HNO_3 residual de la evaporación, es poco corriente que se repita si la operación se conduce

ESQUEMA DEL APARATO EMPLEADO EN LA DESTRUCCION



en la forma descrita más abajo y cuidando especialmente de agregar el HNO_3 por fracciones de $\frac{1}{2}$ ml.

Ya moderada la reacción, se calienta el matraz en forma suave hasta que la masa sulfúrica se ennegrece por carbonización de la sustancia orgánica adquiriendo el aspecto y color de un alquitrán fluido; entonces se retira el mechero, se deja enfriar algún minuto y luego se deja caer de $\frac{1}{2}$ a $\frac{1}{3}$ de ml. de HNO_3 , se agita el matraz "D", se deja unos instantes en digestión y se vuelve a calentar para facilitar la oxidación del carbón. Este proceso se repite, dejando avanzar la carbonización en caliente, enfriando unos instante, agregando $\frac{1}{2}$ ml. de HNO_3 , agitando y reponiendo la calefacción. El proceso dentro de la primera hora y media es cuando requiere mayor cuidado, llegando a consumirse unos 8 ml. de HNO_3 operándose con la cantidad de material indicado.

El ideal es regular las adiciones de HNO_3 asegurando su mayor rendimiento y evitando que destile sin actuar, para lo cual se trata que en el momento de agregar el HNO_3 la ampolla "a" esté sólo tibia; además, las adiciones se regulan evitando que la reacción sea violenta y aunque conviene dejar avanzar la carbonización se debe evitar que sea excesiva rompiéndose el estado coloidal (alquitrán fluido) y se formen conglomerados carbonosos; en este caso, debe calentarse menos y agregar más a menudo HNO_3 pero siempre en forma fraccionada, agitando frecuentemente y prolongando los períodos de digestión a calor suave; con un poco de cuidado y experiencia es fácil conducir la operación en forma perfecta. Cuando la solución sulfúrica tiende a mantener un color marrón oscuro se debe intensificar el calentamiento para facilitar la carbonización y eliminar el agua, entonces llega un momento que aparecen los vapores blancos y densos de SO_3 ; en adelante conviene dejar enfriar mejor el matraz "D" y agregar el HNO_3 cuando está tibio, en fracciones de $\frac{1}{2}$ ml.; por lo demás el proceso se continúa en la forma ya descripta.

Cuando la solución sulfúrica calentada en forma intensa unos 5' después de la última adición de HNO_3 mantiene un color caramelo oscuro, se dejan enfriar y retirando el tubo de desprendimiento (a-d) se agrega 1 g. de NO_3Na ; calentar unos 5' a calor suave y agitando a intervalos, luego se calienta en forma progresiva a ebullición suave otros 5'.

La destrucción se termina de acuerdo con ese proceso pero empleando $\frac{1}{2}$ ml. de HNO_3 por vez; cuando la solución sulfúrica mantenida a suave ebullición unos 5' no da indicios de mayor carbonización, se prolonga el estado suave de ebullición unos 10'; confirmada la ausencia de carbonización apreciable (por lo general la solución queda amarilla sin tinte naranja, pues el tinte naranja es índice de carbonización), se podría dar por terminada la destrucción pero para tener amplia seguridad se deja enfriar parcialmente el matraz y se repite la adición de $\frac{1}{2}$ ml. de HNO_3 , calentando en forma suave 5' y luego en forma progresiva a ebullición que se mantiene 10' después de aparecer los vapores blancos de SO_3 .

Se deja enfriar el matraz, y por lo general la solución sulfúrica que está amarilla en caliente, queda incolora, lo que asegura una destrucción total.

El proceso de esta parte de la destrucción, o sea la destrucción sulfonítrica en el matraz para la cantidad y material indicado, suele durar alrededor de 4 a 5 horas.

Se retira el matraz E_1 que se reserva para la investigación del Hg (I); en su lugar y en la misma forma se coloca otro matraz igual (E_2) con 10 ml. de agua; estando frío el matraz "D" se agrega por el embudo unos 5 ml. de HCl concentrado, se agita y se calienta al principio en forma suave para facilitar la condensación del HCl; luego, progresivamente, a ebullición lenta que se mantiene por varios minutos agitando a intervalos; se deja enfriar el matraz "D" y se repite dos veces más la operación con unos 5 ml. de HCl concentrado.

El destilado del matraz E_2 se destina a la investigación de As (II) y la solución sulfúrica del matraz "D" a la investigación de metales fijos.

Investigación de tóxicos metálicos

Los detalles técnicos de las operaciones se han suprimido por ser reacciones clásicas bien conocidas en la química analítica.

a) **Investigación del mercurio.**— Se destina el destilado, matraz E_1 , recogido durante la destrucción sulfonítrica.

Basta operar sobre $\frac{1}{2}$ (corresponde a 25 gramos) para identificar mg. 0,1 de Hg en 100 gramos de vísceras; en los ensayos de verificación se empleó: bicloruro de mercurio, como tóxico inorgánico y gortulina como compuesto orgánico.

La investigación química analítica se realizó precipitando el Hg^{++} con $S^{=}$ en presencia del Cu^{++} como colector, para asegurar la precipitación total conviene dejarlo varias horas (12 h.) en una atmósfera saturada de H_2S . El precipitado se disuelve en HCl en presencia de pequeñas cantidades de HNO_3 , se diluye con unos 5 ml. de agua; el Hg^{++} se separa por fijación sobre alambre de cobre, luego es sublimado en tubo de vidrio y mediante un cristal de yodo se provoca la formación de biyoduro de mercurio amarillo en caliente; rojo en frío; en esta forma se obtiene una excelente identificación de mercurio.

b) **Investigación del arsénico.**— Se destina el destilado con HCl (matraz E_2). Operando sobre $\frac{1}{5}$ del destilado se realiza como ensayo de orientación, la reacción de Sanger y Black (formación de AsH_3 , revelado con un papel de $HgCl_2$). Como método de confirmación y dosificación, según las cantidades de arsénico, se puede aplicar el mé-

todo de Marsh o el reactivo Bougault. En una próxima publicación sobre ensayo del método en vísceras de animales intoxicados con productos arsenicales se hará un estudio complementario sobre la identificación y dosificación del arsénico.

La posibilidad de investigar el arsénico por el método de destrucción descripto fué comprobada operando con: mg. 0,1 de arsénico mineral (As_2O_3) y mg. 0,2 de arsénico orgánico (arrenhal) mezclado a 100 gramos de materia orgánica (carne, hígado y riñón).

c) La investigación de tóxicos metálicos en la solución sulfúrica del matraz de destilación, se realiza trasvasando esa solución a un vasito de Bohemia al que luego se mezcla el agua del lavado del mismo matraz, tratando de arrastrar cualquier precipitado que pudo formarse. La solución se concentra a unos 3 ml., luego se diluye con unos 20 ml. de agua y se abandona unas 12 horas para facilitar la precipitación total del SO_4Pb y SO_4Ba que se formarían en presencia del Pb^{++} y Ba^{++} respectivamente, que se investigarán por los métodos corrientes.

En la solución sulfúrica se investigan los demás metales tóxicos por la marcha corriente: alcalinización con NH_3 que provoca la separación del bismuto y el complejo azul, $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4^{++}$, en presencia del Cu^{++} ; luego, el Cd^{++} y el Zn^{++} , se pueden separar al estado de sulfuros.

La verificación de la técnica para estos metales fué realizada dentro de los límites siguientes: 2 mg. de Ba^{++} , Pb^{++} y Cu^{++} ; 4 mg. de Zn^{++} , Cd^{++} , Sb^{+++} y Bi^{+++} ; mezclando compuestos inorgánicos a 100 g. de mezcla visceral; por la intensidad de las reacciones obtenidas, se puede deducir que esos límites pueden reducirse bastante.

Bibliografía

- (1) Mamelli: Tossicologia, 1927; pág. 192.
- (2) M. Kohn Abrest: Bull. Soc. Chim. de France, 1925 (37); 795.
- (3) Ogier; Kohn Abrest: T. Chimie Toxicologique, 1924; pág. 475.
- (4) Pedro Peluffo: Anal. As. Química y Farmacia Uruguay, 1933 (1); pág. 28.
- (5) Denigés: P. Chimie Analytique, 1920; pág. 304.
- (6) E. Kahane: Bull. Soc. Chim. Biolg., 1932 (14); 294.
- (7) R. Fabre: Leçons de Toxicologie (IX). Toxiques Mineraux (I), 1945; pág. 12-15.
- (8) E. Kahane: Bull. Soc. Chim. France, 1939. Documentación; pág. 495.
- (9) G. Magnin: J. de Phar. et Chim., 1911; pág. 302.
- (10) G. Magnin: J. de Phar. et Chim., 1925; pág. 333.