

Valores séricos de calcio y fósforo en Costa Rica

Dr. Karl Schosinsky* y Dr. German F. Sáenz**

INTRODUCCION

Una de las principales preocupaciones de quienes laboramos en laboratorios de análisis clínicos, es la de obtener una correcta interpretación de los resultados de los análisis, especialmente si tomamos como base las "normales" establecidas en otros países. Esta situación es particularmente importante, en lo que se refiere a elementos o compuestos cuya concentración en la sangre pueda tener alguna relación con los factores variables, entre ellos, dieta y raza. Con esta inquietud nos hemos interesado en conocer los niveles sanguíneos de calcio y fósforo en nuestro medio, siguiendo así la política de otros autores nacionales.

El calcio se presenta en el plasma como calcio enlazado a proteínas (no difusible) y como calcio difusible, que a su vez está formado por calcio ionizado y no ionizado, constituido por sales orgánicas, citratos, carbonatos y fosfatos (28). Aproximadamente del 45 al 55% del calcio total se encuentra en forma iónica (5). Se sabe que la hormona paratiroidea ejerce su influencia principal o total sobre la fracción difusible o ionizada, que probablemente es la única porción fisiológicamente activa del calcio sérico (8). Este catión toma parte en fenómenos fisiológicos de gran importancia para el organismo, como son la excitabilidad neuromuscular, permeabilidad de vasos capilares y membranas celulares, contracción muscular, transmisión de impulsos nerviosos, coagulación sanguínea y activación de algunos sistemas enzimáticos (8). Los valores que se citan como normales para calcio, varían dentro de límites bastante amplios, lo cual se podría deber en parte a la gran variedad de métodos y modificaciones, es decir, a un problema analítico. Por esos motivos, BURDICK *et al.* (7), han expresado que las determinaciones de calcio sérico son un serio problema en los laboratorios clínicos, por la multiplicidad de pruebas disponibles. Así, se citan como valores margen normales, desde 8,5 hasta 11,5 mg %.

* División Hematología, Laboratorio, Hospital Nacional de Niños y Cátedra de Hematología, Departamento de Análisis Clínicos, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

** Cátedra de Hematología, Departamento de Análisis Clínicos, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

La mayoría de los métodos para la determinación de calcio, se basan en su precipitación, para luego hacer la cuantificación por medio de procedimientos gravimétricos, volumétricos, nefelométricos, colorimétricos o compleximétricos (35), sin dejar de citar los métodos directos fluorométricos (23, 24), *flamométricos* (4, 13), compleximétricos (11, 12, 14, 33) y de absorción atómica (38).

Desde 1871 PRIBRAM (29) recomendaba hacer la cuantificación de calcio, precipitándolo como oxalato. Posteriormente CLARK, citado en REINER (30), entre otros, utiliza el mismo agente precipitante. Sin embargo, no es sino hasta 1921 que KRAMER y TISDALL (25) cuantifican el calcio sanguíneo precipitándolo como oxalato de calcio, titulando con permanganato el ácido oxálico formado, al disolverse el precipitado de oxalato de calcio con ácido sulfúrico diluido. Posteriormente TISDALL, citado en BURDICK (7), propuso una ligera modificación al método.

Años después, CLARK y COLLIP (10) varían ligeramente el procedimiento propuesto originalmente por KRAMER y TISDALL, citado en BURDICK (7). Esta técnica es la más usada en nuestro medio y tal vez universalmente.

Desde entonces a la fecha, la metodología para la determinación cuantitativa de este ión, ha ocupado la atención de un importante número de investigadores. Algunos han sustituido el ión oxalato por el ión fosfato en un medio de ácido tricloroacético alcalinizado, cuantificándose indirectamente el ión por métodos colorimétricos (26, 31, 32). TEERI (36), en 1954 propuso un método que consiste en la medida colorimétrica del descenso del color de una solución de ácido cloránilico, por la remoción de parte de este ácido al precipitar como cloranilato de calcio. En 1957 FERRO y HAM (19, 20), idearon métodos colorimétricos, en los que precipitan el calcio con ácido cloránilico o con cloranilato de sodio, para luego disolverlo con la sal tetrasódica del ácido etilendiamino tetra-acético, dando una solución rosada que aumenta de intensidad en proporción directa a la concentración de calcio. Estos métodos, al igual que los de otros autores (4, 7, 33, 36), fueron valorados tomando como referencia el de CLARK y COLLIP (10), obteniéndose resultados prácticamente iguales.

Por último y como se ha señalado, varios autores han ideado métodos directos para cuantificar el calcio, con la ventaja de que todos ellos requieren poca muestra y de que la determinación se realiza en un tiempo menor.

Aunque algunos investigadores se oponen al uso del procedimiento de CLARK y COLLIP (10), como método patrón para las determinaciones cuantitativas de calcio sérico, FALES, citado en SELIGSON (33), ha llegado a la conclusión de que cualquier medida directa de una mezcla completa, como es el suero, debe realizarse por el método de aislamiento. El autor considera que la concordancia de los resultados obtenidos con el método de CLARK y COLLIP (10) y otros (4, 7, 15, 20, 33, 36), elimina las dudas con respecto a este procedimiento antiguo, pero aparentemente fidedigno. No obstante, el mismo FALES, citado en SELIGSON (33), señala que siempre es más digna de confianza una determinación hecha con el método compleximétrico (directo), que cualquiera en que se utilicen procedimientos de aislamiento, ya que con las técnicas de determinación directa se eliminan las etapas de precipitación y lavado, con lo que se evitan posibles causas de error (pérdida de precipitado, lavado incompleto, etc.). Según otras opiniones (11, 14), el método de aislamiento con posterior determi-

nación compleximétrica directa del calcio, es más fidedigno que el método de CLARK y COLLIP (10), ya que no hay pérdida de calcio en el lavado y los efectos reductores de trazas de proteínas y de otras impurezas no se presentan. Por último, SENDROY (34), en un estudio exhaustivo de los factores que afectan la determinación de calcio sérico por precipitación con oxalato, sostiene que el método más indicado es el que utiliza el procedimiento de precipitación directa, por ser el que presenta el mínimo de detalles técnicos y de errores.

Por otra parte, BRANDSTEIN *et al.* (4) compararon las determinaciones de calcio por fotometría de llama y por el método de CLARK y COLLIP (10), obteniendo resultados exactamente iguales cuando usaron sueros tratados con resinas, pero más bajos por flamometría, cuando usaron sueros intactos debido a la interferencia que producen otros iones, principalmente sodio.

Las objeciones que se le hacen a la fotometría de llama para la determinación de calcio, se basan en que la presencia de otros iones que tienen la misma banda de emisión del calcio, da lugar a fenómenos de interferencia sobre la estrecha banda de emisión del mismo.

También se ha utilizado resinas de intercambio iónico, para la determinación de calcio en suero por los métodos compleximétricos, con el interés de eliminar las interferencias por hemoglobina y por lípidos, con las correcciones del caso. CHEN y DOTI (15), quienes aplicaron un método de esta naturaleza, observaron una estrecha relación con el procedimiento clásico de CLARK y COLLIP (10).

Tomando en consideración los argumentos anteriormente expuestos y ante la realidad de que el método de CLARK y COLLIP (10), llena a satisfacción los requisitos de exactitud, reproductibilidad y bajo costo, hemos utilizado este procedimiento en el presente trabajo, bajo la premisa también, de que es el método más difundido en todo el mundo y bajo el cual se confrontan la mayoría de los problemas clínicos causados por las alteraciones de la calcemia.

Tal vez la principal objeción que se le hace al método de CLARK y COLLIP (10), estriba en el volumen de suero que requiere el macrométodo. Sin embargo, autores como SUMMERS (35) han propuesto recientemente una microtécnica, que ofrece la misma confianza que la técnica original, en cuanto a exactitud y reproductibilidad.

El fósforo, que junto con el calcio son los principales constituyentes inorgánicos del hueso, es indispensable en el metabolismo humano, desde los procesos de absorción intestinal hasta los mecanismos de excreción urinaria, pasando por todas las etapas del metabolismo intermedio (fosforilación) (8).

El fósforo existe en el suero en forma mineral y orgánica. Juega un papel primordial en los mecanismos energéticos y forma parte de la estructura química de importantes lípidos, enzimas, ácidos nucleicos y nucleótidos (8).

Como se verá más adelante, para el plasma sanguíneo se citan como margen normal, valores de 2 a 5 mg %, que incluyen básicamente fósforo inorgánico (2).

La mayoría de los métodos usados para la cuantificación del fósforo inorgánico, se basan en la combinación de éste con el ión molibdato, para formar un complejo activado que es reducido por diversos agentes, entre ellos el 1-2-4 amino-naftol sulfónico para producir color (21). Muchas variaciones de la

metodología giran alrededor del complejo coloreado obtenido (16). La cantidad del complejo coloreado de molibdeno reducido, depende de la concentración de fosfato, de la naturaleza del agente reductor y de la acidez de la mezcla final (1).

La activación del molibdeno por el fosfato, se conoce desde hace tiempo como debida a la formación de $M_3PO_4 \cdot 10MoO_3 \cdot Mo_2O_5$ (1). Este es un compuesto, de los muchos posibles de molibdeno, que es fácilmente reducido al estado de azul de molibdeno. Para cada concentración de fosfato, una determinada concentración de molibdeno es reducida. Esta es la base del método de FISKE y SUBBAROW (21), que hemos utilizado en el presente trabajo.

GOMORI, citado en REINER (30), considera que la sensibilidad, exactitud y facilidad de reproducir resultados con los métodos para fosfatemia, dependen fundamentalmente de la "tolerancia ácida" que permite el agente reductor utilizado. El autor utiliza elon (sulfato de para-metil amino-fenol) más bisulfito de sodio como reductor. KUTTNER y COHEN (26), entre otros autores, sugieren el uso del cloruro estañoso como agente reductor; también se ha señalado a la fenil hidrazina, la hidroquinona en solución de bisulfito (3), el N-fenil p-fenilendiamina (16), el amidor (14) y el ácido ascórbico (1), como reductores del ácido fosfomolibdico formado.

FISKE y SUBBAROW (21) al criticar el uso de otros agentes reductores como sustitutivos de los usados en su método original, llegan a la conclusión de que el ácido 1-2-6 aminonaftol sulfónico o su isómero 1-2-4 aminonaftolsulfónico, son los más apropiados porque dan un color en menos tiempo, lo cual tiene la ventaja de que permite observar si la reacción se lleva a cabo normalmente y si es completa, ya que la presencia de cualquier sustancia interferente se revelaría automáticamente por un cambio en la lectura colorimétrica de un minuto a otro, en tanto que un aumento rápido en el grado de reducción, ofrece una proporcionalidad de color exacta sobre un rango elevado sin tener que esperar mucho tiempo.

Para FISKE y SUBBAROW (21), el reactivo de ácido aminonaftol sulfónico, la sustancia más delicada e inestable, sobre la cual se han suscitado la mayor parte de las objeciones al método, tiene un período de vencimiento máximo de dos semanas. Otros autores señalan más tiempo (32).

MATERIAL Y METODOS

Se hicieron determinaciones de calcio y fósforo en suero de adultos normales de uno y otro sexo, con edades comprendidas entre los 17 y los 50 años, provenientes de Bancos de Sangre, de un grupo de estudiantes de la Universidad de Costa Rica y del personal del Laboratorio del Hospital Nacional de Niños.

Los sueros, obtenidos en ayunas, libres de hemoglobina, se separaron del coágulo en un lapso de dos horas después de obtenida la muestra. Las determinaciones cuantitativas se realizaron entre las ocho horas siguientes a la toma de la misma. Los sueros, cuando no fueron trabajados de inmediato, se congelaron hasta el momento de la determinación.

El método que usamos para la determinación de calcio es el que usual-

mente se llama de CLARK y COLLIP (10); sin embargo, después de una amplia revisión de la literatura, compartimos el criterio de otros autores (22, 30), de que debe llamársele con el nombre de los autores de la técnica original que fueron KRAMER y TISDALL (25).

Método para Calcemia

(KRAMER y TISDALL (25), modificado por CLARK y COLLIP (10).

Reactivos:

1. Solución saturada de oxalato amónico.

Se añade a 100 ml de agua, alrededor de 20 g de oxalato amónico, se agita repetidamente y se deja reposar toda la noche.

2. Agua amoniacal.

Se diluyen con agua hasta 100 ml, 2 ml de NH_4OH .

3. Acido sulfúrico 1 N.

En un matraz aforado de 100 ml, que contenga 40-50 ml de agua, se vierten 2,8 ml de ácido sulfúrico concentrado. Se mezcla y enrasa con agua destilada.

4. Preparación y normalización de la solución de permanganato potásico 0,1N.

- a) Solución de permanganato potásico: se disuelven 3,16 g de KMnO_4 en un litro de agua. Debe guardarse por lo menos durante una semana en una botella de vidrio opaco con tapón de vidrio.
- b) Solución de ácido oxálico: Se tritura ácido oxálico ($\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) hasta convertirlo en polvo fino y se expone al aire, en la oscuridad, sobre un vidrio reloj durante 2 horas, removiendo de cuando en cuando. Se pesa a continuación 6,3035 g y se diluye en un matraz aforado hasta 1 litro. De esta manera se obtiene una solución 0,1 N.
- c) Normalización de la solución de permanganato: Se toman con una pipeta, 10 ml exactos de ácido oxálico 0,1N y se vierten en un matraz erlenmeyer de 250 ml, añadiendo a continuación 7,5 ml de ácido sulfúrico 1:5 (10 ml de H_2SO_4 concentrados, en 40 ml de agua) y alrededor de 100 ml de agua destilada (calentada a 80°C). Se valora la mezcla caliente con solución de KMnO_4 colocada en una bureta de 25 ml, hasta la aparición del primer color rosado, que persiste durante 30 segundos. Se calcula la media de 3 valoraciones. La normalidad de la solución de permanganato es en este caso, el recíproco del número de mililitros usados.

5. Solución de permanganato de potasio 0,010 N.

Se mide la cantidad exacta de solución 0,1 N de KMnO_4 que fue necesaria para oxidar 10,0 ml de ácido oxálico 0,1N y se vierte en un matraz aforado de 100 ml; se completa hasta el ras con agua destilada. La solución de permanganato 0,01 N conservada a 4°C , es estable durante dos semanas.

Procedimiento

Se mezclan 2 ml de suero con 2 ml de agua, en un tubo cónico de 15 ml. Se añade 1 ml de solución saturada de oxalato amónico, se mezcla y se deja reposar durante media hora por lo menos. A continuación se coloca en la centrífuga a unos 2.000 r. p. m. (Centrífuga International, tamaño 1) durante 10 minutos. Se decanta el líquido sobrenadante y se invierte el tubo, dejándolo drenar sobre papel filtro durante unos 5 minutos; se seca la boca del tubo y se lava el precipitado contenido en su interior, vertiendo sobre él 4 ml de agua amoniacal. Una parte de esta agua amoniacal se usa para lavar las paredes del tubo de centrífuga, inmediatamente después se centrifuga y se elimina el líquido sobrenadante, como la vez anterior. Se adicionan 2 ml de ácido sulfúrico y se calienta en baño de agua hirviendo hasta que se disuelva el precipitado. Se valora el ácido oxálico liberado, todavía en caliente, con permanganato 0,01 N hasta la aparición del primer color rosado que persista durante 30 segundos. Se valora un blanco de 2 ml de ácido sulfúrico hasta el mismo punto final, empleando una microbureta de 2 ml graduada en 0,01 ml. Es conveniente reducir el tamaño de las gotas de la solución de KMnO_4 tocando la pared del tubo con la punta de la bureta.

Cálculos

- a) 1 ml de KMnO_4 0,01 N = 0,1 mg de calcio
- b) $(\text{ml de } \text{KMnO}_4 \text{ usados en el problema} - \text{ml de } \text{KMnO}_4 \text{ empleados en el blanco}) \times 10 = \text{mg de calcio por 100 ml de suero}$
- c) $(\text{ml de } \text{KMnO}_4 \text{ usados en el problema} - \text{ml de } \text{KMnO}_4 \text{ empleados en el blanco}) \times 5 = \text{mEq de calcio por litro de suero.}$

Una de las modificaciones hechas a este método es la que permite trabajar con 0,2 ml de suero, es decir, bajo condiciones de microtécnicas (38).

Cuando se consideró pertinente, se hicieron controles de los reactivos correspondientes, utilizando suero liofilizado Lab-Trol de la Casa Dade Reagent.

El método que se siguió para la cuantificación de fósforo inorgánico fue el de FISKE y SUBBAROW (21).

Reactivos

1. Ácido tricloroacético al 5 %.

Se disuelven en agua 5 gramos de ácido tricloroacético, completando hasta 100 ml.

2. Molibdato de amonio al 2,5 %.

Se disuelven en agua 2,5 g de molibdato de amonio Q. P. hasta completar 100 ml. Esta solución no debe tener más de un mes de preparada y no se debe usar cuando ya se le haya formado sedimento.

3. Reactivo de ácido aminonaftolsulfónico.

En un frasco volumétrico de 200 ml, se disuelven en agua 30 gramos de bisulfito de sodio Q. P.; se agregan 0,5 gramos de ácido 1-amino-2-naftol 4-sulfónico puro y se completa con agua destilada hasta 200 ml. Se agita a intervalos y se deja de un día para otro en un frasco oscuro. No debe exponerse a la luz fuerte. Esta solución no debe usarse después de un mes de preparada.

Procedimiento

En un tubo de ensayo se le añaden a 1 ml de suero, 9,0 ml de ácido tricloroacético (reactivo 1). Se mezcla y centrifuga o filtra hasta que se obtenga un líquido completamente claro.

En dos tubos colorimétricos marcados 1 y 2 se ponen, en el primero 3 ml de filtrado claro y en el otro 3 ml de ácido tricloroacético (reactivo 1). Todas las operaciones siguientes deben efectuarse en ambos tubos, el primero de los cuales representa la incógnita y el segundo la concentración cero:

Se añaden 0,5 ml de molibdato de amonio (reactivo 2), 0,5 ml del reactivo de ácido aminonaftolsulfónico (reactivo 3) y 4 ml de agua destilada, se mezcla y se dejan en un sitio oscuro durante 10 minutos.

Se lee en el colorímetro, usando un filtro rojo 650 m μ , el porcentaje de transmisión de la incógnita, en comparación con la solución de concentración cero como blanco ajustado a 100 % de transmisión.

Cálculos

Con la cifra de transmisión que se obtenga se busca directamente el resultado en la curva o tabla de calibración, la cual da miligramos por ciento de fósforo frente a las lecturas de las transmisiones.

Para preparar una curva de calibración, se hace una solución de fosfato monopotásico de 100 mg de fósforo por 100 ml, disolviendo 4,39 g de fosfato monopotásico puro y seco (KH_2PO_4) en agua destilada, hasta completar un litro.

Se diluye con ácido tricloroacético (reactivo 1), 1 ml de esta solución hasta formar 100 ml. Se diluyen respectivamente 0, 2, 4, 6, 8 y 10 ml de es-

ta solución diluida, con ácido tricloroacético (reactivo 1), hasta formar 10 ml. Estas diluciones equivalen a muestras de suero que contengan respectivamente 0, 2, 4, 6, 8 y 10 mg % de fósforo.

En 6 tubos colorimétricos se ponen respectivamente, 3 ml de cada una de estas diluciones. Se adiciona a cada uno de los 6 tubos, 0,5 ml de molibdato de amonio (reactivo 2), 0,5 ml del reactivo de ácido aminonaftolsulfónico (reactivo 3) y 4 ml de agua destilada, se mezcla y se dejan en un sitio oscuro por 10 minutos.

Usando como blanco la solución de concentración cero y ajustando en el fotómetro a 100 % de transmisión, con filtro rojo de 650 m μ , se lee el porcentaje de transmisión de los otros 5 tubos. Si la calibración se lleva a cabo debidamente, a 6 mg por ciento de fósforo debe corresponder alrededor de 45% de transmisión.

En un papel semilogarítmico para gráficas, se asigna al eje de las concentraciones (eje de las abscisas), los valores de 0 a 12,5 mg por ciento de fósforo y se marcan los puntos correspondientes a las cinco lecturas de transmisión arriba de los correspondientes valores de concentración. Los puntos marcados quedarán situados aproximadamente en una línea recta que corta el eje de las transmisiones en el punto correspondiente al 100 %.

RESULTADOS

En el Cuadro 1 se señalan los valores séricos de calcio y fósforo inorgánico, obtenidos en 419 muestras de sangre de adultos normales, de uno y otro sexo, bajo el procedimiento de KRAMER y TISDALL (25), modificado por CLARK y COLLIP (10) y FISKE y SUBBAROW (21), respectivamente.

CUADRO 1

Valores séricos de calcio y fósforo inorgánico

	Calcio ** mg%		Fósforo inorgánico *** mg%
Promedio (\bar{X})	10,4	(1)	3,25
Desviación estándar (S)	0,47		0,53
Margen (*)	9,2 - 11,3	(2)	2,4 - 4,5
Número de muestras	419		419

(*) El margen incluye aproximadamente el 95% de los casos.

(**) Según el método de KRAMER y TISDALL, modificado por CLARK y COLLIP.

(***) Según el método de FISKE y SUBBAROW.

(1) (5,2 mEq/L).

(2) (4,6 - 5,65 mEq/L).

DISCUSION Y CONCLUSIONES

De la literatura consultada se deduce que los análisis de calcio en sangre, así como los del fósforo, se hallan sujetos a una serie de ligeras modificaciones introducidas por muchos investigadores desde que aparecieron los métodos originales de los autores que sentaron las bases del análisis cuantitativo de estos dos cationes, tan importantes en química clínica. En la introducción se señalan sucintamente, los procedimientos que se utilizan para la cuantificación del calcio sérico.

El calcio de la sangre se encuentra en el plasma en tres fracciones: 45-55 % como calcio ionizado, 5 % como calcio inorgánico no ionizado y un 45-50 % como calcio unido a proteínas. Como la mayoría de los anticoagulantes que se utilizan *in vitro*, reaccionan con el calcio eliminándolo por precipitación, el suero sanguíneo libre de hemoglobina es el material biológico que se debe utilizar para el análisis de este catión, sin embargo, también se puede usar plasma heparinizado (9, 27). En el método que hemos utilizado en nuestro estudio, el calcio del suero sanguíneo se precipita como oxalato cálcico, disolviéndose el precipitado con ácido sulfúrico diluido y valorando en caliente el ácido oxálico así formado, con permanganato de potasio. Este procedimiento de CLARK y COLLIP (10), que no es sino una ligera modificación del método original propuesto por KRAMER y TISDALL (25), ofrece algunas ventajas sobre los varios que se han propuesto para este fin, aunque en lo que se refiere a la técnica analítica misma, no es nuestra intención hacer un amplio análisis crítico de los diferentes métodos propuestos, ya que a esos efectos el lector puede consultar los trabajos citados en la literatura (14, 17, 33, 34).

En primer lugar este método es relativamente rápido, de precipitación directa del calcio y en donde sólo un reactivo, el permanganato potásico, debe ser cuidadosamente preparado. Por otra parte, es el más difundido en el mundo y las normales que se aceptan en química clínica para calcemia, parten fundamentalmente de los resultados que aportó este método hace más de cuarenta años. La bondad del mismo se pone en evidencia en la literatura, en la que se destaca que en la mayoría de los métodos para calcio (4, 7, 33, 36) y muy especialmente en los que utilizan cloranilatos y soluciones EDTA, se toma como método comparativo de referencia, el de CLARK y COLLIP (10). Su exactitud quedó demostrada cuando los resultados de 200 determinaciones de calcemia, obtenidos por los métodos de CLARK y COLLIP (10) y el espectrofotométrico de absorción atómica, guardaron un marcado paralelismo (38). Esta técnica, en fin, a pesar de ser antigua, es exacta y sin mayores complicaciones, pues toda la manipulación se hace en el mismo tubo de centrífuga y la posible reducción del permanganato por material orgánico se anula prácticamente (27) al lavar el precipitado cuidadosamente con el agua amoniacal.

En vista de la difusión que para estos fines está tomando en nuestro medio el método de FERRO y HAM, debemos hacer algunas consideraciones al respecto. En este procedimiento, como en otros similares, el calcio se precipita por el ácido cloránico (o su sal sódica), formando un cloranilato de calcio insoluble, el cual se lava con alcohol isopropílico al 50 % para librarlo del exceso de ácido cloránico y luego se disuelve en la sal tetrasódica del ácido etileno-

diaminotetra acético (EDTA), formando así una solución rosada soluble de cloranilato de sodio, cuya intensidad es proporcional a la cantidad de calcio precipitado y que se lee a una longitud de onda de 520 mμ. Es muy significativo el hecho de que la mayoría de los autores que han utilizado ácido cloránico o su sal (19, 20), encontraron valores muy semejantes a los obtenidos por CLARK y COLLIP (10). En uno de los trabajos, precisamente la mayor desviación en exactitud fue de 1,4 %, con una desviación promedio de 0,49 %.

Desde que se introdujo el método de precipitación y titulación de KRAMER y TISDALL y la modificación de éste por CLARK y COLLIP (10) para calcemia, se acepta que los valores normales de la misma son del orden de 4,5-5,5 mEq/L de calcio por litro de suero, es decir de 9 a 11 mg/100 ml. En otra cita (27) y con el mismo procedimiento, se señalan de 9 a 11,5 mg %, lo que correspondería a 4,5 - 5,7 mEq/L. Los autores de la técnica con cloranilato y EDTA (20), dan valores de calcio sérico en adultos normales, dentro de los límites del método de precipitación directa y titulación con permanganato de potasio. Si nos referimos concretamente a los resultados que hemos obtenido en la población estudiada, compuesta por individuos de uno y otro sexo y en edades entre los 17 y los 50 años, vemos que los valores margen de 9,2 a 11,3 mg % (4,6 - 5,65 mEq/L), guardan estrecha relación con los que se han citado para este procedimiento en otros países. Asimismo es interesante la concordancia en los valores de calcemia, bajo los procedimientos de CLARK y COLLIP y FERRO y HAM, los dos más difundidos en la actualidad en nuestro medio. Por último se han señalado algunas drogas y sustancias que interfieren con la determinación de calcio, ya sea porque elevan los resultados y dan lugar a "falsos positivos" o porque los disminuyen provocando "falsos negativos" (9, 18, 37). Podríamos establecer las mismas consideraciones para la crítica analítica del análisis del fósforo sérico, tal como lo hemos hecho para la calcemia, porque estudiando la abundante literatura sobre este tópico, nos encontramos con que un procedimiento original, clásico por así decirlo, como es el de FISKE y SUBBAROW (21), descrito hace más de cuarenta años, sufrió una serie de ligeras modificaciones que han dado lugar, dentro de la anarquía actual de la química clínica, a una serie de métodos, que en justicia se apartan muy poco del fundamento originalmente descrito por los autores señalados. En el método de FISKE y SUBBAROW (21) las proteínas séricas se precipitan con ácido tricloroacético y el filtrado se trata con una solución ácida de molibdato, para formar ácido fosfomolibdico a partir de los fosfatos inorgánicos presentes en ese filtrado. El ácido fosfomolibdico incoloro es finalmente reducido por la acción de 1, 2, 4-aminonaftolsulfónico, produciéndose un color azul de óxidos de molibdeno, cuya intensidad es proporcional a la concentración del fósforo presente. Las principales modificaciones al método se refieren al agente reductor utilizado (1, 3, 14, 16, 26, 30). A pesar de que la sustancia propuesta por los autores, ha sido objeto de muchas críticas, por tratarse de un reactivo inestable y poco sensible, lo cierto es que si se guardan los cuidados analíticos del caso y se utilizan reactivos frescos y compuestos químicamente puros, el método permite obtener valores fidedignos de fosfatemia. En abono a estas consideraciones técnicas, cabe citar que DRYER (16) señala que el agente reductor de FISKE y SUBBAROW, probablemente es el que tiene la mayor aceptación por provocar

desarrollo de color de alto grado de estabilidad (16). Definitivamente la mejor modificación que se le ha hecho al método de FISKE y SUBBAROW, ha sido la propuesta por GOMORI, citado en REINER (30), cuyos resultados en varios centenares de análisis de suero, presentaron excelente concordancia con los obtenidos por el método de FISKE y SUBBAROW. El autor aclara sin embargo, que en comparación con ese método, su modificación con el uso de elon como sustancia reductora, posee considerables ventajas, entre ellas, la relativa estabilidad, la escasa sensibilidad a sustancias no fosforadas y la exactitud dentro de un amplio margen de acidez. Su inconveniente estriba en que se necesita casi una hora, para lograr una máxima absorción de las soluciones coloreadas (16). Con respecto a la acidez, GOMORI se refiere con amplitud al hecho de que es uno de los factores más importantes en el análisis del fósforo sanguíneo, cuando se utilizan procedimientos de reducción de complejos de molibdeno.

Los límites normales de fósforo inorgánico en el suero de adultos y bajo el método utilizado en el presente trabajo (21), sin modificación alguna, va de 2,5 a 5 mg % (27) y de 2,5 a 4,8 (6). GOMORI, con su importante modificación al método, encontró en 100 donadores de sangre sanos, una oscilación de los valores de 2,4 a 4,7 mg %, con una media de 3,68 mg %.

Si estudiamos los valores que obtuvimos en 419 muestras analizadas para fosfatemia, encontraremos una excelente concordancia tanto con los ofrecidos por los autores del método, como con los señalados anteriormente por GOMORI con su modificación al mismo. Los valores margen de 2,4 a 4,5 mg %, con una media de 3,25 mg %, reflejan la concordancia de nuestros resultados.

Igual que para el calcio, se han reportado muchas drogas y sustancias que afectan las determinaciones de fósforo en el sentido de elevar o disminuir falsamente los valores o de provocar falsos positivos o negativos (18, 37).

Por último es interesante observar, cómo los valores de calcio y fósforo que hemos obtenido, mantienen una proporcionalidad muy estrecha, en un todo de acuerdo con el equilibrio biológico que estos dos cationes mantienen siempre en condiciones fisiológicas.

RESUMEN

Se comentan aspectos generales sobre los procedimientos técnicos y analíticos, que se utilizan para las determinaciones cuantitativas de calcio y fósforo en suero.

Se efectúan determinaciones séricas de calcio por el método de KRAMER y TISDALL (25), modificado por CLARK y COLLIP (10), en población adulta de uno y otro sexo, con edades comprendidas entre los 17 y los 50 años. Para fósforo en suero se utilizó el procedimiento original de FISKE y SUBBAROW (21) en la misma población y en el mismo número de casos. Los valores obtenidos fueron los siguientes: para calcio 9,2 - 11,3 mg % (10,4 mg %) (4,6 - 5,65 mEq/L); para fósforo 2,4 - 4,5 mg % (3,25 mg %).

BIBLIOGRAFIA

1. BAGINSKI, E. S., P. P. FOA & B. ZAK
Determination of phosphate: study of labile organic phosphate interference. *Clin. Chem. Acta* 15: 155, 1967.
2. BAUER, J. D., P. G. ACKERMANN & G. TORO
Bray's Clinical Laboratory Methods. 7th Ed., VIII + 764 pp., C. V. Mosby Co., Saint Louis, U. S. A. 1968.
3. BENEDICT S. R. & RUTH C. THEIS
Modification of the molybdc method for the determination of inorganic phosphorus in serum *J. Biol. Chem.* 61 (1): 63, 1924.
4. BRANDSTEIN M., A. CASTELLANO & CARMINE MEZZACAPA
Determinations of serum calcium by means flame photometry. *Am J. Clin. Path.* 40 (6): 583, 1963.
5. BRISCOE, ANNE M. & C. RAGAN
Coated charcoal assay of serum calcium fractions. *J. Lab. Clin. Med.* 69 (2): 351, 1967.
6. BULLETIN SIGMA
The colorimetric determinations of inorganic phosphorus in serum and urine at approximately 620-700 mu. Tentative Technical Bulletin N° 670: 1, Sigma Chemical Company, 1965.
7. BURDICK, C. O., G. WILDOSIN & BARBARA CHANG
Normal range of serum calcium by means of the cal-red Technic. *Tech. Bull.* 33 (9): 158, 1963.
8. CANTARROW, A. & M. TRUMPER
Clinical Biochemistry XXXI + 738 pp. 5ª E. W. B. Saunders, 1955.
9. CARAWAY, W. T.
Chemical and diagnostic specificity of laboratory test. Effect of hemolysis, lipemia, anticoagulants medications, contaminants and other variables. *Am. J. Clin. Path.*, 37 (5): 445, 1962.
10. CLARK, E. P. & J. B. COLLIP
A study of the Tisdall method for the determination of blood serum calcium with a suggested modification. *J. Biol. Chem.* 63: 461, 1925.
11. CONNERTY, H. V. & A. R. BRIGGS
Determination of serum calcium by means of orthocresolphthalein complexone. *Am. J. Clin. Path.* 45 (3): 290, 1965.
12. COPP, D. H., BARBARA A. CHENEY & NANCY M. STOKOE
Simple and precise micromethod for EDTA titration of calcium. *J. Lab. Clin. Med.* 61 (6): 1.029, 1963.
13. CUMMINS, G. M., MARGARET L. PHILLIPS & C. I. FISHER
Flame photometric determination of plasma calcium. *Am. J. Clin. Path.* 26 (9): 1.094, 1956.

14. CHEMICAL METHODS OF MEDICAL INVESTIGATION
10th. Ed. XVI + 347 pp. Merck E. A. G. Darmstadt, 1964.
15. CHEN, T. & L. B. DOTI
Determination of calcium in icteric, hemolized, or lipemic sera. *Am. J. Clin. Path.* 48 (1): 136, 1967.
16. DRYER, R. L.
The determination of phosphorus and phosphatase with N-phenil p-phenilendiamine. *J. Biol. Chem.* 225: 177, 1957.
17. ELDJARN, L., O. NÝGAARD & S. L. SVEINSSON
The determination of serum calcium. A comparison between the method of CLARK and COLLIP and the titration with ethylendiamine tetra-acetate. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 7: 92, 1954.
18. ELKING, MARY & H. F. KABAT
Drug induced modifications of laboratory test values. *Am. J. Hosp. Pharm.* 25: 485, 1968.
19. FERRO, P. V. & ANNA BELL HAM
A simple spectrophotometric method for the determination of calcium. *Am. J. Clin. Path.* 28: 208, 1957.
20. FERRO, P. V. & ANNA BELL HAM
A simple spectrophotometric method for the determination of calcium II. A semi-micro method with reduced precipitation time. *Am. J. Clin. Path.* 28 (6): 689, 1957.
21. FISKE, C. H. & Y. SUBBAROW
The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66 (20): 375, 1925.
22. HEPLER, O. E.
Manual of Clinical Laboratory Methods 4th Ed. XV + 387 pp. Charles C. Thomas Co., 1957.
23. HOWERTON, M. K. & J. C. WASILENSKI
Fluorescence titrations for calcium automated by "titracolomat". American Instrument Co., Inc., April, 1964.
24. KLASS, C. S.
The use of the indicator calcein, and its fluorescence, in a rapid, ultramicrotitration of serum calcium. *Am. J. Clin. Path.* 37 (6): 655, 1962.
25. KRAMER, B. & F. TISDALL
A simple technique for the determination of calcium and magnesium in small amounts of serum. *J. Biol. Chem.* XLVII (3): 475, 1921.
26. KUTTNER, T. & H. R. COHEN
Micro colorimetric studies. I. A molybdic acid, stannous chloride reagent. The micro estimation of phosphate and calcium in pus, plasma and spinal fluid. *J. Biol. Chem.* 75: 517, 1921.
27. OSER, B. L.
Hawk's Physiological Chemistry. 14 ed. XVI + 1.472 pp. McGraw-Hill Book Co., N. Y., U.S.A., 1965.

28. PERRAULT, M. B. CLAVEL & J. F. COLAS-BELCOUR
Cómo interpretar los exámenes complementarios de la clínica endocrinológica. 156 pp.
Colección Médica Internacional, N° 9, Cap. VIII. Paratiroides y metabolismo fosfocólico. 128 pp. Ediciones Daimon, Madrid, 1962.
29. PRIBRAM, R.
Berichte über die Verhandlungen der Königlich Sächsischen Gessellschaft der Wissenschaften su Leipzig, Math, Phys. Classe XX iii, 279, 1871.
30. REINER, M.
Métodos seleccionados de Análisis Clínicos. Vol. I, XVIII + 206 pp. Ed. Aguilar, Madrid, 1961.
31. ROE, J. G. & B. S. KHAN
A colorimetric method for the estimation of blood calcium. J. Biol. Chem. 67: 585, 1926.
32. ROE, J. G. & B. S. KAHN
The colorimetric determination on blood calcium. J. Biol. Chem. 81 (1): 1, 1929.
33. SELIGSON, D.
Métodos seleccionados de Análisis Clínicos. Vol. IV, XX + 296 pp. Ed. Aguilar, Madrid, 1966.
34. SENDROY, J.
Determination of serum calcium by precipitation with oxalate. A comparative study of factors affecting the results of several procedures. J. Biol. Chem. 152: 539, 1943.
35. SUMMERS, JANET
A micromodification of the CLARK-COLLIP method for serum calcium. Am. J. Med. Techn. 32 (2): 103, 1966.
36. TEERI, A. E.
Semi micro colorimetric determination of calcium in blood serum. Chemist. Analyst. 43 (2): 43, 1954.
37. WIRTH, W. A. & R. L. THOMSON
The effect of various conditions and substance on the results of laboratory procedures. Am. J. Clin. Path. 43 (6): 579, 1965.
38. ZETTNER, A. & D. SELIGSON
Application of atomic absorption spectrophotometry in the determination of calcium in serum. Clin. Chem. 10 (10): 869, 1964.