

DICNF
\$500

+

 **Biblioteca**
UNIVERSIDAD
DE MONTERREY

08 OCT. 2002

VENCIMIENTO

UNIVERSIDAD DE MONTERREY

Instituto de Ciencias

Naturales y Exactas

ESTUDIO COMPARATIVO DE 2 TÉCNICAS PARA
LA DETERMINACIÓN DE CALCIO EN SUERO

Tesina que presenta

LILIA MARGARITA RAMOS DE NARANJO

En opción al título de
Químico Farmacéutico Biólogo

Monterrey, N.L.

Junio de 1972.

BIBLIOTECA
UNIVERSIDAD DE MONTERREY

040.6151
R175e
1972

800207

LIBRARY OF CONGRESS
PHOTODUPLICATION SERVICE

Con amor y agradecimiento
a mis padres

Jesús Ramos Castañeda.

Lilia Gutiérrez de Ramos.

Con cariño a mis hermanos:

Jesús

y

Lucila Isabel

A la Universidad y Colegio Labastida.

A mis maestros.

A Víctor:

Mi compañero y único

amor de mi vida.

Con especial agradecimiento para
mis maestros:

Sr. José Vargas Mena, Q.F.B. M.Sc.

Srita. Q.F.B. Ma. Teresa Garza Gallardo.

Srita. Q.F.B. Blanca S. Garza Fernández.

Sr. I.Q. Aureliano García Fernández.

Por su valiosa colaboración en la elaboración
de ésta tesina.

Este trabajo se efectuó en el
Laboratorio de Análisis Clínicos
Servicio Social "Labasti-
da - U. de M."

Bajo la dirección del Sr. --
José Vargas Mena. Q.F.B.,M.Sc.

I N D I C E

	<u>PAGINA</u>
INTRODUCCION.....	1
MATERIAL Y METODOS.....	17
RESULTADOS.....	24
DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	31
RESUMEN.....	34
BIBLIOGRAFIA.....	35

- - - - -

I N T R O D U C C I O N

El metabolismo de los minerales de los alimentos no implica los cambios radicales de forma molecular observados en el metabolismo de proteínas, carbohidratos y lípidos. Los iones minerales positivos como calcio, magnesio, potasio y sodio, ingeridos en los alimentos como sales de ácidos orgánicos o inorgánicos, o unidos a proteínas o lípidos, después de absorbidos se asocian con iones negativos en la economía. El ion calcio puede asociarse parcialmente con proteína plasmática, proteína protoplasmática, ácidos orgánicos o con inorgánicos. El radical fosfato puede transformarse en cualquiera de un gran número de ésteres orgánicos en la sangre o células tisulares. Los iones minerales positivos o negativos no utilizados como unidades estructurales orgánicas no experimentan, en general, mayor alteración química que un intercambio de parejas durante el metabolismo y la excreción (1).

El valor normal del calcio sanguíneo en el hombre y otras muchas especies animales fluctúa entre 9 y 11 mg por 100 ml de suero. Las células poseen cantidades insignificantes la mitad aproximadamente del calcio sérico está unido a proteínas y el resto se encuentra en estado difusible. Esta última fracción se califica como "Difusible", "Ultra-Filtrable" o "ionizada". No es exacto que esté ionizado todo el calcio que difunde a través de una membrana de pergamino, celofán o colodión, aunque para fines prácticos se acepta como lógica tal suposición. Se da por sentado que el calcio iónico es la fracción fisiológicamente activa.

El calcio total se determina fácilmente en el suero, no en el plasma; los métodos empleados con más frecuencia recurren a la precipitación del oxalato a partir del suero diluido y titulación del ácido oxálico, liberado del oxalato de calcio separado por ácido, con permanganato potásico. El calcio difusible o ionizado puede determinarse por método de ultrafiltración; el suero no diluido es forzado a pasar a través de varias membranas semipermeables con presión positiva o negativa y se determina el contenido de calcio del filtrado. Se ha utilizado un método biológico basado en la respuesta del corazón de rana a la perfusión de calcio en suero. Existe también una técnica espectrofotométrica. En general, los diferentes métodos suelen concordar en que el 50 ó 60 % del calcio sanguíneo total se encuentra en estado difusible o iónico. Durante buen número de años fue escasa la actividad en el estudio de los ti

pos de calcio de la sangre, lo que quizá en gran parte haya dependido de la falta de correlación entre los diversos tipos de calcio y las condiciones en que se presentan los trastornos del metabolismo del calcio-fósforo en estado patológico.

El cuerpo humano posee aproximadamente una duodécima parte de su peso en sangre; así un hombre de 70 kg. tendrá unos 6 kg. que aproximadamente son 6 litros de sangre. de los cuales alrededor de la mitad es plasma. Cada 100 ml. de plasma contienen 10 -- mg de calcio, de modo que este hombre tien en su sistema circulatorio unos 300 mg de calcio, del que solamente la mitad es fisiológicamente activo. Se debe de tomar en cuenta que la eliminación --- diaria de calcio por la orina puede exceder los 300 mg y que un individuo puede ingerir menos de esta cantidad durante uno o varios días. En estado de perfecta salud no se modifican los valores de calcemia ni cuando se ingieren cantidades mínimas de calcio durante períodos prolongados.

De cuanto acabamos de exponer se deduce la existencia de mecanismos netos para la conservación de los valores de calcio en sangre dentro de límites muy estrechos. Las alteraciones de alguna importancia producen buen número de efectos indeseables. Consideraremos ahora algunos de los factores involucrados en la conservación de los valores de la calcemia.

Factores que afectan los valores de calcio en sangre.

1.- Concentraciones absolutas de calcio y fósforo y proporción Ca:P en el alimento. El ingreso bajo de ambos elementos durante lapsos prolongados produce disminución de sus valores sanguíneos. El déficit de estos minerales en los alimentos durante períodos breves es compensado fácilmente por el organismo; los huesos proporcionan calcio y fosfato, o intervienen los tejidos blandos para brindar fosfato. El balance negativo de uno o de ambos elementos carece de consecuencia, cuando es breve, o si la deficiencia es ligera aunque más prolongada. Por otra parte, en casos graves de larga duración los huesos se rarifican y fracturan fácilmente.

La proporción de calcio a fósforo en la dieta tiene estrecha relación con el grado de absorción, y por lo tanto con los valores sanguíneos de ambos elementos; cuando la dieta posee cantidades excesivas, aumenta la eliminación fecal de uno y otro. Suele explicarse este fenómeno basándose en la formación de fosfato de calcio insoluble, no fácilmente disponible para absorción. En todo caso, una proporción de Ca: P en la dieta dentro de los límites de 1:2 A 2:1 permite utilización óptima de ambos elementos, y con proporciones fuera de estos límites disminuye la absorción.

2.- Digestión de grasas y cantidad en la dieta.- En circunstancias normales la presencia de más o menos grasa en la dieta ejerce efecto mínimo sobre la absorción del calcio por el intestino, pero en condiciones patológicas puede observarse pérdida manifiesta del calcio alimenticio como resultado de trastornos en la absorción de grasa. Se sabe que las sales de ácidos grasos de calcio (jabones cálcicos) son insolubles. Si las grasas alimenticias se hidrolizan, produciendo ácidos grasos, y estos ácidos no se absorben, hay pérdida de calcio alimenticio en las heces. La pérdida de grasa no hidrolizada en las heces no representa pérdida de calcio para el organismo. En la diarrea y esteatorrea la pérdida de calcio puede ser intensa lo cual depende de la gravedad y duración del padecimiento.

3.- Acido fítico, hierro y oxalatos.- Muy rara vez se utilizan grandes dosis de hierro con fines terapéuticos y por períodos prolongados. En estas circunstancias adquiriría relieve especial el metabolismo del calcio y fósforo. El resultado final es un trastorno en la proporción Ca:P.

La presencia de oxalatos en la dieta da lugar a precipitación del calcio en el intestino en forma de oxalato calcico insoluble. Este hecho carece de importancia práctica por la rareza de alimentos ricos en oxalato y la ingestión de los mismos en forma muy irregular.

Puede tener alguna importancia la presencia de ácido - fítico en los alimentos. Este compuesto, hexafosfato de inositol, se encuentra en los cereales. Puede contribuir a la ingestión to tal de fosfato y ejercer influencia manifiesta sobre la absorción de calcio. En el hombre, la ingestión de grandes cantidades de á cido fítico en los alimentos, o su adición a los mismos, produce balances negativos de calcio.

Se admite en términos generales que el ácido fítico de los alimentos constituye un problema de nutrición solamente en ca sos especiales de ingestión de muy poco calcio, de ácido fítico - en exceso o de ambos.

4.- Relaciones de acidez.- El pH del intestino, aunque no expuesto normalmente a grandes variaciones, guarda relación di recta con la absorción de calcio y fósforo; los residuos ácidos en las dietas estimulan la absorción. El cloruro de calcio por - vía bucal aumenta la eliminación de calcio por la orina por increme nto de la absorción. La hiperacidez gástrica aumenta también - la solubilidad de las sales de calcio en el intestino y favorece su absorción. Es sabido que la ingestión de lactosa estimula la absorción del calcio, lo cual puede explicarse invocando el efecto acidificante del ácido láctico formado a partir del azúcar por los microorganismos.

5.- Proteína en la dieta.- Ha sido plenamente demostrado que algunas sales de calcio son mucho más solubles en una solución acuosa de aminoácidos que en agua. Se ha comprobado también relación directa entre grado de absorción de calcio y consumo de proteína. De esta manera se deduce que las dietas ricas en proteínas, estimulan la absorción de la pequeña cantidad de calcio dietético.

Los cinco factores antes mencionados, afectan la concentración del calcio sanguíneo indirectamente por su acción reguladora sobre el grado de absorción de calcio a partir del intestino. Los siguientes factores ejercen efecto directo sobre la calcemia sin relación alguna con el proceso de absorción.

1.- Hormona paratiroidea y Vitamina D.- La vitamina D aumenta la absorción de calcio y fósforo del intestino. La acción primaria de la hormona paratiroidea (además de aumentar la excreción urinaria de fosfatos), es aumentar un nivel de calcio bajo en sangre o mantener el nivel normal por separación de calcio de los huesos. El exceso de hormona causa hipercalcemia.

2.- Concentración de la proteína del suero.- El contenido total de calcio del suero y de algunos otros líquidos corporales guarda relación y en parte está regido por la cantidad de -

proteína presente. Otros investigadores han relacionado los valores de proteína y calcio del suero por la expresión matemática: -
 $Ca \text{ total} = 0.556 (\text{gramos de proteína en } 100 \text{ ml}) + 6$.

Si la proteína del suero es de 7 gr %, el calcio total = $3.9 + 6$ ó 9.9 mg por 100 ml. Cada gramo de proteína sérica, según esta ecuación, fija 0.556 mg de calcio y el resto (6 mg) es difusible o iónico. En circunstancias anormales un individuo podría tener una concentración de proteína sérica tan baja como 3.4 por 100. Según la ecuación anterior, el calcio total del suero sería $1.9 + 6$ ó 7.9 mg por 100 ml. En tal situación la fracción difusible podría permanecer normal, pero el calcio total sería -- tan bajo que se justificaría preguntar por qué no presenta el individuo síntomas de tetania. La explicación se encuentra en la pequeña cantidad de calcio ligado a la proteína.

3.- Relación recíproca entre calcio y fósforo séricos.-
Con frecuencia se afirma que existe en la sangre una relación recíproca entre las concentraciones de calcio y fósforo. Sin duda que tal afirmación es correcta dentro de ciertos límites estrechos, y cuando no concurren circunstancias que impliquen trastornos graves en el metabolismo calcio-fósforo. Por otra parte, no es raro observar en ciertos tipos de nefropatías, calcemia y proteinemia normales y una concentración de fósforo inorgánico de 10

o incluso 20 mg por 100. Es evidente que en estos casos no actúa ningún mecanismo que regule la relación recíproca.

4.- Umbral renal.- Sabemos que la importancia del umbral renal en la regulación de los valores del calcio sanguíneo, pero no conocemos bien el mecanismo de esta función, y los motivos de que a veces no actúe normalmente. En un adulto normal el calcio adicional que se absorbe por el intestino se elimina fácilmente por la orina. Así vemos, que la administración intravenosa de gluconato de calcio, por ejemplo, provoca inmediatamente aumento de la eliminación urinaria en grado netamente eficaz hasta el punto de no producirse generalmente disminución del fosfato plasmático por virtud de la relación recíproca antes mencionada. Por otra parte, puede observarse hipocalcemia de suficiente intensidad para dar origen a hiperirritabilidad de músculo y nervio o a tetania, incluso cuando el calcio (procedente de los alimentos o de sales administradas) experimente absorción a partir del intestino y aparezca en la orina. Semejante situación suele coincidir con hipofunción de las glándulas paratiroides, e indudablemente en estos casos no actúa el umbral renal. En la hipercalcemia también es anormal el umbral renal.

5.- Hormonas sexuales.- Durante la menopausia se observa en muchas mujeres balance negativo de calcio y fósforo que da

origen a un tipo de osteoporosis (desmineralización ósea). suelen acompañarse estos trastornos de dolor y de fragilidad anormal de los huesos que se fracturan fácilmente. Ciertos autores han demostrado que los balances negativos mejoran notablemente al administrar estrógenos y a Benzoato de Estradiol o el producto sintético dietiestibestrol, o bien andrógenos, como Testosterona. Se ha observado que la combinación de estrógenos y andrógenos resulta más eficaz que cada uno por separado.

6.- Otros Factores.- Puede afirmarse sin temor a errar que existen factores desconocidos o mal comprendidos todavía de importancia indudable en la regulación de los valores del calcio y fósforo en sangre. Constituyen un ejemplo de los dicho el estado acidobásico del individuo. ¿La hiperacidez en el organismo afecta el umbral renal, las glándulas paratiroides, o algún otro mecanismo, para originar aumento de la eliminación urinaria de calcio, que suele acompañarla? En la alcalosis, puede ser intensa la hiperirritabilidad muscular y nerviosa, y el cuadro simula con frecuencia el de aumento de irritabilidad resultante de hipocalcemia. En un tiempo se postuló que el aumento de alcalinidad de la sangre estimulaba la disociación de las proteínas plasmáticas como iones negativos, con fijación de más calcio, disminuyendo así la fracción ionizada. El resultado de semejante disminución producirá hiperirritabilidad, pero nunca se ha comprobado merma

en esta fracción del calcio sanguíneo, ni siquiera en casos de alcalosis grave. A falta de una explicación clara, quizás sea mejor pensar que la regulación de la irritabilidad del músculo y nervio no depende solamente del ion calcio sino de las proporciones entre diversos iones, como calcio, magnesio, sodio y potasio, así como hidrógeno o hidróxilo, todos ellos definitivamente involucrados.

Funciones del Calcio

Es evidente que el calcio y fósforo son esenciales para la formación de huesos y dientes. Sin desarrollo óseo no puede haber crecimiento y es esencial para el mismo.

El proceso de coagulación de la sangre necesita de ión calcio; la coagulación de la leche también lo requiere. Cierta número de enzimas, entre ellas lipasa, deshidrogenasa succínica, trifosfatasa de adenosina, y algunas enzimas proteolíticas, son activadas por el calcio. No se sabe si semejante activación es esencial o incluso importante para los procesos metabólicos normales.

El ión calcio está directamente relacionado con la contracción muscular, y en ausencia del mismo todos los tipos de músculo pierden su capacidad para contraerse. En presencia de calcio en exceso, el corazón aislado se detiene en sístole. Desde luego que también importan en la contracción muscular las proporciones de calcio y otros cationes. La transmisión del impulso nervioso -

guarda también relación con la actividad funcional del calcio.

El calcio, en términos generales, disminuye la permeabilidad de las membranas, efecto que neutraliza la acción opuesta de sodio y potasio. Por otra parte, puede observarse aumento notable de la permeabilidad capilar al perfundir con soluciones pobres en calcio, ya que es necesario aporte constante de este elemento para conservar la integridad de la sustancia de cemento intercelular.

Es mínima la acción fisicoquímica del calcio en la regulación del equilibrio hídrico (efecto osmótico) y ácido básico, -- por virtud de las pequeñas cantidades del mismo en los líquidos -- corporales, si la comparamos con la de otros iones reguladores como sodio, potasio, cloruro y bicarbonato.

Distribución.

El calcio no se encuentra localizado en los huesos y en los dientes, se halla distribuído (2) como lo muestra el cuadro siguiente:

DISTRIBUCION DEL CALCIO EN LOS LIQUIDOS Y
LOS TEJIDOS CORPORALES.

Líquido o Tejido.	mg/100 ml o en 100 g.	mEq/litro
Suero	9.0 - 11	5
L C R	4.5 - 5	2
Músculos	70	
Nervios	15	

Por todo lo descrito anteriormente resulta evidente la importancia que tiene el calcio para el hombre. Precisamente -- por este hecho para este trabajo se decidió determinar y buscar un método más exacto, más reproducible y más adaptable con ob-- jeto de adoptarlo como técnica rutinaria en el Laboratorio de A- nálisis Clínicos, Servicio Social Labastida.

La multiplicidad de métodos publicados para la determi- nación de calcio sérico es una indicación del problema analítico en cuestión. El rango normal es muy estrecho 8.8-10.5 mg/100 ml y sería deseable obtener una precisión de $\pm 1\%$, permitiendo resul- tados para propósitos clínicos con ± 0.1 mg/100 ml.

Los antiguos métodos de la estimación de calcio sérico basados en la precipitación del calcio por compuestos como los á

cidos picrolónico y cloranílico y otros están sujetos a inexactitud debido a la precipitación incompleta, inclusión de otros iones en el precipitado y la solubilidad parcial del mismo (3). El hecho de que no haya sido desechado el método de Clark y Collip (4), a pesar de ser un método de precipitación, se debe a una circunstancia favorable: la precipitación concurrente de algo de oxalata de magnesio es compensada por una pérdida similar de calcio en el lavado del precipitado. Los aspectos indeseables de este procedimiento son el tiempo necesario para la técnica y la cantidad de suero requerida han hecho de éste un método de referencia.

Un método más reciente de precipitación utiliza ácido naftal-hidroxiámico (N-Hidroxi-Naftalimida) seguida de una medición clorimétrica del naftalhidroxamato de calcio por su reacción con nitrato férrico ácido. Como en todos los métodos de precipitación es esencial la técnica analítica más exacta (4).

La medición de calcio por flamometría es difícil por la emisión de baja energía del ión calcio en la flama típica usual (aire-propano, aire-gas natural u oxígeno propano) y la interferencia de otros iones como sodio, potasio y fosfato. Una precipitación anterior del calcio elimina la principal ventaja de la flamometría que es la rapidez. Si se utiliza un flamómetro de altas temperaturas, como oxígeno-acetileno, combinado con un sistema fotométrico selectivo y muy sensible, es posible alcanzar resultados satisfactorios (4); pero el costo y la complicación son muy altos.

Una nueva variante es la utilización de un electrodo activo especial de calcio. Este electrodo es una membrana de intercambio iónico líquido en el cual el material conductor es una sal cálcica de un ácido orgánico fosfórico inmiscible en agua, sostenida por un disco extremadamente largo y poroso; el material interno del electrodo es una solución de cloruro de calcio. La sensibilidad de este sistema permite una precisión de aproximadamente de 0.05 mg/100 ml. Los resultados de las experiencias prácticas en este método ameritan atención. La desventaja del método en este caso es el costo del equipo.

El método más utilizado para la determinación de calcio concierne la formación de complejos coloreados (6). La variante más útil usa el ácido etilendiamino tetracético (EDTA), agente de quelación que fija algunos metales en su estructura molecular impidiendo que formen parte en reacciones químicas. En la medición del calcio se puede utilizar purpurato de amonio o también calceína, que forman complejos coloreados con el calcio. Al añadir sucesivamente pequeñas cantidades EDTA, el calcio pasa de su combinación con el colorante al EDTA. Cuando esta transferencia es completa, se produce un cambio del color; la cantidad de solución de EDTA necesaria para obtener este cambio constituye una medida del calcio existente. Las características más útiles de este método son su rapidez y su adaptabilidad a pequeños volúmenes de suero, por lo cual resulta especialmente cómodo en pediatría.

Para el trabajo de esta tesis se seleccionamos el método de Clark y Collip que es un método de precipitación (4) y el de Diehl y Ellingboe (4) basado en el uso de un agente quelante. Los dos métodos tienen la ventaja de que los reactivos que se usan son simples y el instrumental no es costoso.

MATERIAL Y METODOS

Se emplearon en este estudio las técnicas de Clark y --
Collip (4) y de Diehl y Ellingboe (4).

Con cada una se hicieron un total de 21 determinaciones
en un "pool" de sueros que fueron programadas para verificarse co
mo 7 series consistentes en tres determinaciones cada una.

Preparación del "pool" de suero.

Las muestras de sangre que se emplearon para preparar -
el "pool" de suero se obtuvieron de personas seleccionadas al a--
zar que asistieron al Laboratorio de Análisis Clínicos Servicio
Social Labastida durante el mes de abril de 1972. A cada una de
ellas se le extrajeron por función en el pliego del codo con agu
ja calibre 21, de cinco a diez ml de sangre. Cada una de estas -

muestras fue depositada en un tubo de 13 x 100 mm. se dejó coagular y retraer el coágulo y se separó el suero por centrifugación; los sueros hemolizados o turbios fueron descartados. Las porciones de sueros así obtenidas se fueron juntando en un matraz que se mantuvo constantemente en el congelador (-10°C). Una vez recolectada la cantidad adecuada de suero, se descongeló a temperatura ambiente, se homogenizó por rotación y se repartió en tubos de 13 x 100 mm., estos tubos se congelaron y se mantuvieron a esta temperatura hasta el momento de ser usados. Los volúmenes en cada tubo fueron los necesarios para hacer las tres determinaciones correspondientes a cada serie, de tal manera que en cada ocasión se sacó un tubo del congelador se descongeló a temperatura ambiente y se utilizó de inmediato para hacer las tres determinaciones. Todo este procedimiento se llevó a cabo con material previamente lavado con ácido clorhídrico enjuagado con agua libre de iones y esterilizado en horno.

Técnica de Clark y Collip.

A).- En un tubo de centrifuga cónico de 15 ml se colocan:
2.0 ml de suero no hemolizado, claro libre de células,
2.0 ml de agua destilada.

B).- Se agrega 1.0 ml de una solución saturada de oxalato de amonio, gota a gota con agitación lateral continua. Se tapa el tubo, se agita ligeramente y se permite que permanezca en posi-

ción vertical a temperatura ambiente 2 horas para asegurar una precipitación completa de oxalato de calcio.

- C).- Se centrifuga por 15 minutos a 3000 rpm.
- D).- Se decanta el sobrenadante en un solo movimiento para no alterar el precipitado. Se deja que el tubo invertido escurra por 5 minutos sobre un disco de papel filtro.
- E).- Se agregan 4.0 ml de hidróxido de amonio diluido, usando la mitad de éste para lavar el precipitado y la otra mitad se aplica por las paredes del tubo. Se centrifuga por 10 minutos a 3000 rpm.
- F).- Se repiten los pasos D y E.
- G).- Se decanta el sobrenadante y se escurre el tubo invertido en papel filtro. Se usa un disco de papel filtro enrollado para quitar las últimas trazas de solución de lavado de las paredes internas del tubo.
- H).- Se coloca el tubo en posición vertical y se agregan 2.0 ml de ácido sulfúrico normal. Se coloca el tubo en un baño de agua hirviendo por cinco minutos.
- I).- Se titula caliente por una solución 0.01 N de permanganato de potasio, usando una microbureta de 2.0 ml. Después de la adición de la primera gota es esencial agitar el tubo ligeramente hasta que el color rosa desaparezca completamente. El ion manganeso producido actúa como catalizador para el final -

de la titulación. El punto final es el primer tinte de color rosa que permanezca por un minuto.

J).- Se hace una titulación de un blanco de una manera idéntica, usando 2.0 ml de ácido sulfúrico normal previamente calentado en el baño de agua hirviendo. El resultado de esta titulación del blanco (usualmente 0.02 ml) se resta de la titulación del problema.

El contenido de calcio de la muestra se calcula utilizando la fórmula:

$$(A-B) 10 = \text{mg}/100 \text{ ml}$$

En donde:

A = ml de permanganato de potasio gastados para titular el problema.

B = ml de permanganato de potasio gastados para titular el blanco.

Reactivos:

Solución de trabajo de permanganato de potasio 0.01 N.

Se prepara inmediatamente antes de usarse, diluyendo 5 ml de una solución stock 0.1 N (3.16 gramos en un litro de agua destilada, y su normalidad se verifica con una solución de ácido oxálico 0.1 N y ácido sulfúrico normal) en 50 ml de agua destilada. La normalidad de la solución stock de permanganato de pota--

sio 0.1 N debe de verificarse con una solución 0.1 N de oxalato de sodio (0.67 g en 100 ml de ácido sulfúrico normal); el procedimiento es el siguiente: se colocan 5.0 ml de la solución de oxalato de sodio en un matraz erlenmayer de 25 ml y se calienta casi a ebullición; se titula después con la solución stock 0.1 N de permanganato de potasio hasta que aparezca el color rosa pálido. Se repite la titulación dos veces más y se saca la media de las tres titulaciones. El resultado de la relación 5/media de las titulaciones, es el factor por el cual se multiplican los valores obtenidos en la fórmula. La solución de permanganato de potasio deberá guardarse en frasco oscuro y deberá probarse mensualmente contra la solución de oxalato de sodio.

Solución de amoníaco diluido.

Se diluyen 2.0 ml de hidróxido de amonio concentrado en 100 ml de agua destilada. Se prepara cada día.

Técnica de Diehl y Ellingboe.

a).- Se llena una microbureta de 2.0 ml con una solución EDTA. Se preparan tres recipientes de plástico para titulación -- que contengan lo siguiente:

Blanco.- 0.02 ml de agua libre de iones.

0.01 ml de solución de calceína.

0.10 ml de solución 1.25 N de hidróxido de potasio.

Standard.- Igual que el blanco, solamente sustituyendo -
los 0.02 ml de agua por solución standard.

Problema.- Igual que el blanco, solamente sustituyendo -
los 0.02 ml de agua por el suero.

b).- Se titulan bajo una lámpara ultravioleta de 100 ---
watts. La lámpara debe ser de longitud de onda larga con su ener-
gía concentrada en la región de 360 mu, en un cuarto oscuro si es
posible. El punto final se señala por la desaparición rápida de -
la fluorescencia.

El contenido de calcio en la muestra se calcula utilizando
do la fórmula:

$$\frac{A - C}{B - C} \quad 10 = \text{mg}/100 \text{ ml}$$

Reactivos:

Solución de hidróxido de potasio.

Se disuelven 50 mg de cianuro de potasio puro en 100 ml
de una solución "standard" 1.25 N de hidróxido de potasio. Se guar
da en un frasco de plástico oscuro.

Calceína.

Se disuelven 25 mg de calceína en 100 ml de una solución
de hidróxido de sodio 0.25 N. Se conserva bien en un frasco de --
plástico oscuro.

Solución de EDTA.

Se desparrama en una caja petri aproximadamente un gramo de EDTA puro, y se seca por 4 horas a 110°C (no debe de excederse esta temperatura). Se transfiere inmediatamente a un desecador y se seca al vacío por 12 horas. Se saca del desecador e inmediatamente se pesan 0.372 gm. Se disuelven y se aforan a 100 ml con agua y libre de iones o bidestilada. Se conserva en una botella de plástico.

Solución "standar" de calcio.

Se pesan exactamente 250 mg de carbonato de calcio puro en un recipiente limpio y seco de 50 ml. Se agregan 6 ml de ácido clorhídrico N y se calienta lentamente a ebullición en una pequeña placa eléctrica. Se permite que hierva muy ligeramente hasta que ya no salgan humos ácidos (se prueba con un papel litmus azul húmedo puesto sobre el recipiente); se permite tiempo para que se enfríe. Cuidadosamente se lleva el contenido del recipiente a un matraz volumétrico de 1 litro y se afora con agua libre de iones. Se debe de guardar en una botella de polipropileno. Este "standar" contiene 10 mg de calcio/100 ml.

RESULTADOS

Técnica de Clark y Collip.

Los valores obtenidos en cada una de las 21 determinaciones por el método de Clark y Collip se presentan en la tabla 1. -- Los datos se presentan individualizados para cada determinación en cada serie, con objeto de comparar la variación entre las 3 determinaciones de cada serie con la de las series entre sí. En la tabla se observa que la diferencia máxima que se obtuvo entre las 3 determinaciones de una serie corresponde a la serie 4 (13.50-13.20) con un valor de 0.30 mg/100 ml. Considerando como valor para cada se--rie la media de sus 3 determinaciones, al comparar dichos valores - se observa que la variación máxima (entre las series 1 y 4) fue de 0.37 mg/100 ml. Por la similitud de los valores de estas diferen--cias (0.30-0.37) se consideró que no requerirían de análisis estadís--tico y que podrían considerarse de magnitud equivalente.

Por lo ya mencionado se decidió que los 21 valores podrían considerarse como otros tantos valores individuales o repeticiones. Con esta consideración se calculó su media aritmética (\bar{x}) y desviación standard (DS).

La media aritmética para estos valores fue 13.53 mg/100 ml con una DS de 0.14 que corresponde a un coeficiente de variabilidad (CV) de 1.03 %.

Con estos valores se presenta el esquema para establecer un programa de control de calidad para la determinación de calcio por este método (Fig. 1).

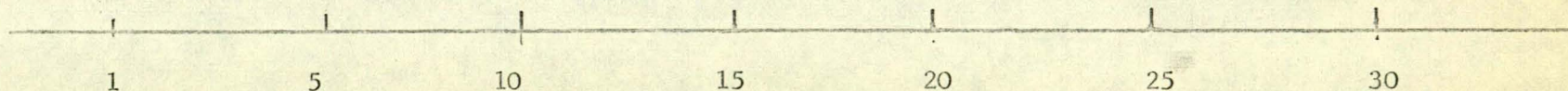
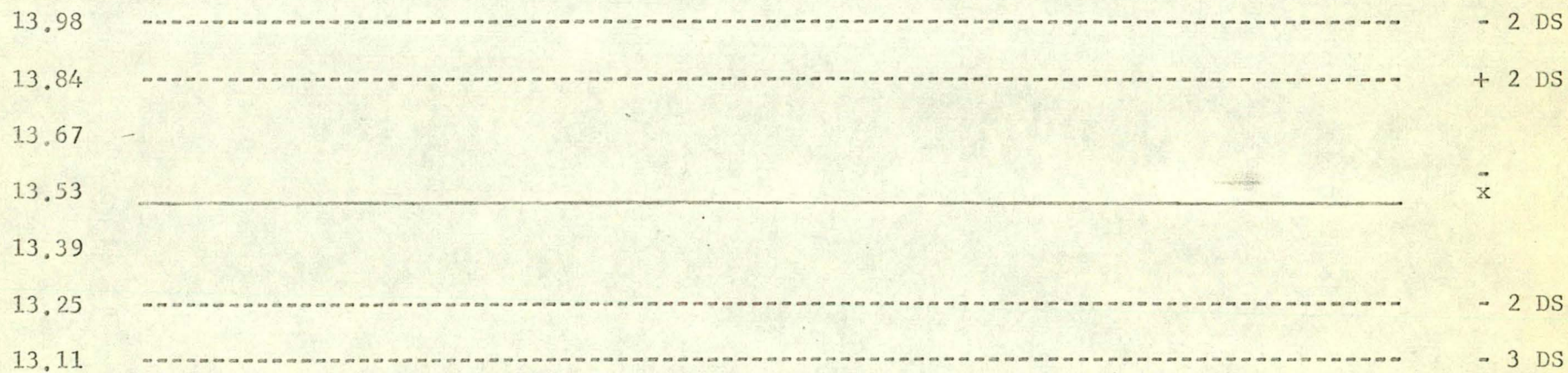
T A B L A 1

Valores, expresados en mg/100 ml, obtenidos para
3 determinaciones de cada una de 7 series en un
"pool" de suero, con la técnica de Clark y Collip.

Serie No.	Determinación			Media Aritmética
	1	2	3	
1	13.70	13.80	13.70	13.73
2	13.80	13.70	13.70	13.73
3	13.60	13.40	13.40	13.46
4	13.50	13.20	13.40	13.36
5	13.50	13.40	13.50	13.46
6	13.50	13.60	13.50	13.53
7	13.50	12.50	13.50	13.50

FIGURA 1.- Esquema de un Diagrama para control de calidad para la determinación de calcio por la técnica de Clark y Collip.

mg/100 ml



Técnica de Diehl y Ellingboe.

Los valores obtenidos en cada una de las 21 determinaciones por el método de Diehl y Ellingboe se presentan en la tabla 2. Los datos se presentan individualmente para cada determinación en cada serie, con objeto de comparar la variación entre las 3 determinaciones de cada serie con la de las series entre sí. Como puede observarse en la Tabla, la diferencia máxima que se obtuvo entre las 3 determinaciones de una serie corresponde a las series 3 y 4 (5.00-10.0) con un valor de 5.0 mg/100 ml. Considerando como valor para cada serie la media de sus 3 determinaciones, al comparar dichos valores se observa que la variación máxima fue de 3.30 mg/100 ml. Dado que la diferencia máxima entre repeticiones de una misma serie fue mayor que la observada entre las series, se consideró -- que podrían considerarse como 21 valores individuales o repeticiones. Con esta consideración se calculó la media aritmética (\bar{x}) y desviación standar (DS).

La media aritmética para estos valores fue 9.28 mg/100 ml con una DS de 1.3 que corresponde a un coeficiente de variabilidad (CV) de 14 %.

Con estos valores se presenta el esquema para establecer un programa de control de calidad para la determinación de calcio por este método (Fig. 2).

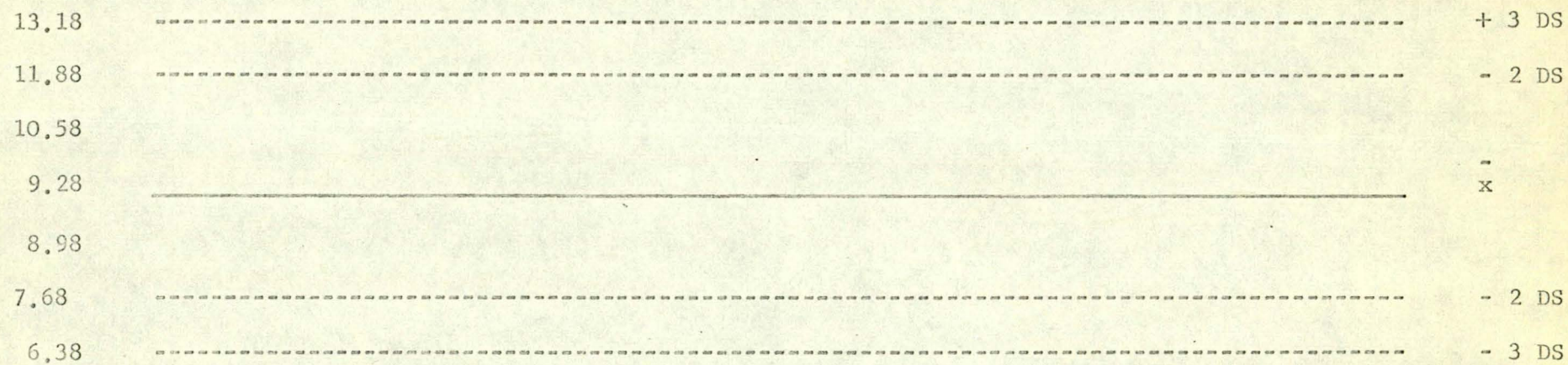
T A B L A 2

Valores expresados en mg/100 ml, obtenidos para
3 determinaciones de cada una de 7 series en un
"pool" de suero, con la técnica de Diehl y ---
Ellingboe.

Serie No.	Determinación			Media Aritmética
	1	2	3	
1	10.0	10.0	10.0	10.0
2	10.0	10.0	10.0	10.0
3	5.0	10.0	5.0	6.7
4	10.0	5.0	10.0	8.3
5	10.0	10.0	10.0	10.0
6	10.0	10.0	10.0	10.0
7	10.0	10.0	10.0	10.0

FIGURA 2.- Esquema de un Diagrama para Control de Calidad para la determinación de calcio para la técnica de Diehl y Ellingboe.

mg/100 ml.



Determinación número:

DISCUSION Y CONCLUSIONES

La técnica de Clark y Collip puede considerarse como una técnica sencilla, en la cual los reactivos empleados son de costo moderado y de fácil adquisición; respecto a la estabilidad de los reactivos no hay ningún problema excepto la solución stock de permanganato de potasio, la cual debe de verificarse cada mes con el fin de asegurar su normalidad.

Los inconvenientes de esta técnica son el tiempo requerido y la cantidad de muestra empleada.

Esta técnica puede hacerse en suero o en plasma citratado, pero con este último requiere por lo menos 18 horas para la precipitación total del oxalato de calcio. En este estudio se siguió la técnica de Clark y Collip utilizando suero.

Los errores cometidos en esta técnica son debidos al operador desde el momento del lavado del material hasta la deficiencia visual al observar el vire que nos indica el punto final.

La técnica de Diehl y Ellingboe es mucho más corta que la técnica de Clark y Collip y tiene mucho menor número de pasos, lo cual nos lleva a menor probabilidad de error. Los reactivos son -- bastante estables y se adquieren fácilmente.

Podría considerarse otra ventaja el hecho de que la cantidad de suero empleado (0.02 ml) es mínima, característica muy importante y útil en los casos de pediatría.

La desventaja de esta técnica en su mayor parte es la deficiencia visual para poder detectar el punto final que consiste en la desaparición de la fluorescencia.

Con respecto a la reproducibilidad de ambas técnicas, podemos concluir: que si la técnica de Diehl y Ellingboe muestra un coeficiente de variabilidad de 14% y la de Clark y Collip un coeficiente de variabilidad de 1% es de suponerse que la más reproduci--ble es la técnica de Clark y Collip.

Se debe de señalar que el error de la técnica de Diehl y Ellingboe reflejado por el coeficiente de variabilidad muy alto, --

puede deberse en gran parte al uso de una microbureta de 5 ml graduada en centésimas en lugar del uso de una microbureta de 2 ml -- graduada en milésimas.

Después de haber considerado detenidamente los puntos -- anteriormente expuestos, puede sugerir como técnica más adecuada -- la de Clark y Collip para que sea establecida como técnica "stan-- dard" en el Laboratorio de Análisis Clínicos Servicio Social Labas tida U. de M.

R E S U M E N

En este estudio se compararon dos técnicas para la determinación de calcio sérico, la de Clark y Collip y la de Diehl y -- Ellingboe.

De un "pool" de suero se hicieron 21 determinaciones -- (siete series con tres determinaciones cada una). Con los valores obtenidos se calculó la media aritmética, la desviación standar y el coeficiente de variabilidad para cada una de ellas. Se analiza ron cuidadosamente los resultados así como las ventajas y desventa jas de ambas técnicas, eligiéndose la de Clark y Collip como técni ca para ser utilizada en el Laboratorio de Análisis Clínicos Servi cio Social Labastida - U. de M.

5.- LYNCH, J. M.; RAPHAEL, S.A. and MELLOR, D. L.; Métodos de -
Laboratorio. Interamericana, México. 661 p. 1965.

6.- MURRAY, R. S.; Estadística. Mc Graw-Hill, México. 357 p.
1969.

800207

FECHA DE DEVOLUCION

El último sello marca la fecha tope para ser devuelto este libro.

Vencido el plazo, el lector pagará 1.00 peso por cada día que pase.

Plata 153,672

--	--	--