

DICNE
\$500⁰⁰

+

UNIVERSIDAD DE MONTERREY

CUANTIFICACIÓN DE GLUCOSA EN EL LABORATORIO
CLÍNICO

TESINA QUE PRESENTA

MA^{ra} MONTSERRAT TORRES DE SCHMIDT

EN OPCION AL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO



MONTERREY, N. L.

FEBRERO DE 1972

BIBLIOTECA
UNIVERSIDAD DE MONTERREY

040.6151

T693C

1972

809203

A MI ESPOSO

SR. C.P. CESAR ANTONIO SCHMIDT Z.

CON AMOR Y AGRADECIMIENTO

A MIS PADRES

SR. ING. JUAN TORRES UBACH

SRA. ANGELA BAYONA DE TORRES

CON CARÍÑO, RESPETO Y AGRA-
DECIMIENTO

A MI HIJA

JESSICA

CON AMOR Y TERNURA

A MIS HERMANOS

MA. MARTA

MARINA Y

DANIEL

CON CARIÑO

A MIS MAESTROS

SR. JOSE VARGAS MENA Q.F.B. M.Sc.

SRITA. MA. TERESA GARZA GALLARDO Q.F.B.

POR SU VALIOSA COLABORACION

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS

INDICE :

Página

I.- INTRODUCCION	1
II.- PARTE EXPERIMENTAL	4
A) Estudio de los factores que pueden ser causa de error en el método de Folin Wu	4
1.- Determinación de la consistencia de la técnica	4
a) Material y métodos	4
b) Resultados	5
2.- Efecto de la temperatura sobre la reacción de óxi- do-reducción	7
a) Material y métodos	7
b) Resultados	7
3.- Efecto del tiempo de calentamiento sobre la reac- ción de óxido-reducción	8
a) Material y métodos	8
b) Resultados	9
4.- Efecto del enfriamiento posterior a la reacción de óxido-reducción	11
a) Material y métodos	11
b) Resultados	11
5.- Efecto del tiempo transcurrido entre la reacción de formación del complejo coloreado y su cuantificación	14
a) Material y métodos	14
b) Resultados	14

6.- <i>Discusión y conclusiones</i>	17
B) <i>Efecto de la longitud de onda empleada en la cuantificación</i>	21
a) <i>Material y métodos</i>	21
b) <i>Resultados</i>	21
c) <i>Discusión y conclusiones</i>	22
C) <i>Calibración de un fotocolorímetro Leitz Modelo M para de</i> <i>terminación de glucosa sanguínea por 3 métodos</i>	25
1.- <i>Para el método de Folin Wu</i>	25
a) <i>Material y métodos</i>	25
b) <i>Resultados</i>	26
2.- <i>Para el método de Somogyi-Nelson</i>	28
a) <i>Material y métodos</i>	28
b) <i>Resultados</i>	30
3.- <i>Para el método de la orto-toluidina</i>	32
a) <i>Material y métodos</i>	32
b) <i>Resultados</i>	33
4.- <i>Discusión y conclusiones</i>	34
III.- <i>LITERATURA CONSULTADA</i>	37

1.- INTRODUCCION

"Glucosa sanguínea" significa la concentración de una -
substancia química específica, la glucosa. "Azúcar sangui-
neo" tiene un significado más amplio, y corresponde a subs-
tancias reductoras de muchos tipos además de la glucosa.

Estas sustancias reductoras provienen tanto de los gló-
bulos rojos como del plasma, e incluyen el glutati \ddot{o} n, la er-
gotionina, la lactosa, los glucur \acute{o} nidos, los compuestos de -
ribosa, el \acute{a} cido asc \acute{o} rbico y el \acute{a} cido \acute{u} rico. Casi todos los
m \acute{e} todos de cuantificaci \acute{o} n de la glucosa se basan en su poder
reductor, y la mejor aplicaci \acute{o} n de esta particularidad en --
los an \acute{a} lisis generales, es la t \acute{e} cnic \acute{a} modificada de Folin Wu.
El m \acute{e} todo de Folin Wu da valores de az \acute{u} car sangui \acute{n} eo alrede-
dor de 20 mg. por 100 ml. superiores a los de glucosa verda-
dera. Este error puede disminuir mucho si se utiliza sulfa-
to de sodio isot \acute{o} nico para diluir la sangre y de esta manera
la liberaci \acute{o} n de sustancias reductoras de los eritrocitos -
se impide precipitando las prote \acute{i} nas por el m \acute{e} todo de Somo-
gyi-Nelson, cuyo m \acute{e} todo es m \acute{a} s reciente y m \acute{a} s espec \acute{i} fico. -
Existen otros m \acute{e} todos para determinar la glucosa genuina de
la sangre con alto grado de exactitud, entre ellos menciona-
r \acute{e} el de Benedict, el m \acute{e} todo por ferrocianuros, los m \acute{e} todos
enzim \acute{a} ticos y el de la orto-toluidina.

El fundamento del m \acute{e} todo de Folin Wu consiste en lo si-
guiente: las sustancias reductoras en un filtrado libre de
prote \acute{i} nas de sangre completa, en plasma o en suero, reaccio-
nan en el ba $\~{n}$ o de agua a ebullici \acute{o} n con una soluci \acute{o} n alcali-
na de tartrato de cobre. Parte de los iones c \acute{u} pricos se re-
ducen, por acci \acute{o} n de las sustancias reductoras presentes, a
 \acute{o} xido c \acute{u} proso.

La concentraci \acute{o} n de iones cuprosos es despues valorada
colorim \acute{e} tricamente o fotom \acute{e} tricamente por la acci \acute{o} n de un ex

ceso de ácido fosfomolibdico para formar azul de molibdeno. El rango en los valores normales, tan grande como de 80 a 120 mg. por 100 ml., refleja la no especificidad de la reacción, lo cual es debido a la medición de otras sustancias reductoras además de la glucosa como se mencionó anteriormente.

El método de Somogyi-Nelson utiliza un filtrado sanguíneo, de tungstato de cobre, el cual está virtualmente libre de sustancias reductoras que no sean glucosa.

El ión cuproso formado por calentamiento del filtrado con una solución alcalina de cobre es medido fotométricamente por la adición del ácido arsenomolibdico, el cual forma un complejo coloreado. El rango en los valores normales es de 60 a 100 mg. por 100 ml., considerándose que estos valores sí corresponden a glucosa verdadera.

El método de la orto-toluidina, descrito por Hultman en 1959 está basado en la reacción de color obtenido por condensación de aldosaesacáridos con la orto-toluidina en ácido acético glacial. Un gran número de modificaciones del método de Hultman han sido introducidas recientemente. La rapidez, sensibilidad, exactitud, relativa simplicidad y especificidad del método de Dubowski (1962) hacen de éste un procedimiento manual ideal. Puede ser empleado para emergencias donde se precisa de resultados rápidos como también para determinaciones regulares.

Los métodos enzimáticos para la determinación de glucosa proveen el más alto grado de especificidad en la estimación de glucosa sanguínea verdadera. La glucosa oxidasa cataliza la oxidación de la glucosa a ácido glucónico y a peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno producido por la glucosa oxidasa es estimado en la presencia de peroxidasa que cataliza la transferencia del Oxígeno del peróxido a un receptor cromogénico de Oxígeno como la orto-toluidina o la orto-dianisidina.

Generalmente la determinación de glucosa en sangre se emplea para la investigación de la diabetes melitus y en trastornos que producen hiperglucemia o hipoglucemia; los métodos de determinación normalmente se hacen de sangre en ayunas. Las pruebas postprandiales, para las determinaciones de glucosa sanguínea son más fidedignas y por lo tanto preferibles; esto es especialmente de tenerse en cuenta en la investigación de la diabetes melitus asintomática benigna, sin glucosuria.

11.- P A R T E E X P E R I M E N T A L

A) Estudio de las factores que pueden ser causa de error en el método de Folin Wu.

1.- Determinación de la consistencia de la técnica de Folin Wu.

a) Material y métodos :

Se empleó en este experimento un fotocolorímetro Klett-Summerson (*) y se siguió estrictamente la técnica de Folin Wu descrita en el manual del aparato (Clinical Manual; Klett-Summerson, Photoelectric Colorimeter), a la cual me referiré en lo sucesivo como técnica "original" y que se describe a continuación:

- 1) Se coloca en un tubo de Folin Wu, 2 ml. de agua destilada y se marca como blanco.
- 2) Se coloca en un segundo tubo de Folin Wu, 2 ml. de la solución patrón de glucosa con una concentración de 10 mg. por 100 ml. (solución 2).
- 3) Se añade a cada tubo 2 ml. de solución cúprica - alcalina (solución 3) y se agita.
- 4) Se calientan los tubos en baño de agua hirviente durante 6 minutos.
- 5) Se enfría en agua corriente por 3 minutos.
- 6) Se añade a todos los tubos, 2 ml. de solución -- fosfomolibdica (solución 4), y se agita.
- 7) Se deja reposar durante 3 minutos.
- 8) Se aforan los tubos a la marca de 25 ml. con agua destilada.

(*)

Klett-Summerson Manufacturing Co. New York.

9) Se dejan reposar otros 5 minutos.

10) Se lee con filtro azul No. 42.

Esta técnica se hizo por quintuplicado (5 tubos) en 3 ocasiones distintas.

Soluciones y reactivos:

(Solución 1). Solución stock.-

Se pesa 1 g. de dextrosa anhidra y se afora a 100 ml. con solución saturada de ácido benzoico (solución 5).

(Solución 2). Solución patrón.-

Se toma 1 ml. de solución stock (solución 1) y se afora a 100 ml. con solución saturada de ácido benzoico.

(Solución 3). Solución cúprica alcalina.-

Se disuelven 40 g. de carbonato de sodio en 400 ml. de agua destilada, se calienta si es necesario. Se pasa la solución a un matraz volumétrico de 1000 ml., se agregan 7.5 g. de ácido tartárico y cuando esté disuelto se añaden 4.5 g. de sulfato de cobre disueltos en 100 ml. Si hay sedimento, se decanta y se utiliza el fluido claro.

(Solución 4). Solución fosfomolibdica.-

Se disuelven 70 g. de ácido molibdico y 10 g. de tungstato de sodio en 400 ml. de hidróxido de sodio al 10 %, agregar 400 ml. de agua destilada (las sales disueltas en agua forman una solución amarilla, pero al agregarle la sosa, la solución queda incolora antes de calentar). Se hierve vigorosamente por 20 a 25 minutos reduciendo el volumen a unos 750 ml. Se enfría y se agrega agua destilada si es necesario para completar el volumen a unos 750 ml.

Se añade 250 ml. de ácido fosfórico concentrado y se afora a 1000 ml.

(Solución 5). Solución saturada de ácido benzoico.-

Se pesan 3 g. de ácido benzoico y se afora a 1000 ml. de agua destilada; se calienta a ebullición la solución, se deja enfriar y se afora a 1000 ml.

b) Resultados :

Los resultados obtenidos en este experimento se presentan en la tabla No. 1. Como puede verse en ella, de los 5 tubos procesados en una de las ocasiones, 3 de ellos dieron una lectura de 100 y los 2 restantes, uno 98 y el otro 96; la media aritmética correspondiente a estas lecturas es de 98.8.

En la segunda repetición, hubo gran uniformidad en las lecturas de los 5 tubos (media aritmética = 100), pudiéndose decir algo semejante de las obtenidas en la tercera ocasión; (media aritmética = 99.4).

Tabla No. 1 : Lecturas obtenidas en 15 repeticiones de la técnica "original".

Repetición.	TUBO No.					Media aritmética.
	1	2	3	4	5	
1	100	98	100	96	100	98.8
2	100	100	100	100	100	100.0
3	100	100	99	98	100	99.4

Media aritmética de 15 lecturas = 99.4

2.- Efecto de la temperatura sobre la reacción de óxido-reducción. (Experimento No. 1)

a) Material y métodos:

Se utilizaron los mismos reactivos descritos anteriormente en la página 7.

Para determinar el efecto de la temperatura sobre la reacción de óxido-reducción, la técnica "original" -- previamente descrita fué seguida introduciendo la modificación en el paso No. 4. Esta modificación consistió en calentar los tubos en baño de agua a una temperatura de 85° C durante 6 minutos, en lugar de calentarlos en baño de agua hirviente.

b) Resultados:

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla No. 2. Podemos observar en ella que en la primera ocasión, 4 de los 5 tubos procesados dieron una lectura de 56 y el tubo restante dió una lectura de 55. Estas lecturas dan una media aritmética de 55.8. En la segunda repetición hubo más variación en las lecturas, siendo 2 de ellas de 56, las restantes dieron 2, 55 y una, 59; (media aritmética = 56.2).

En la tercera repetición hubo grán uniformidad en las lecturas con media aritmética de 55.8.

Tabla No. 2 : Lecturas obtenidas en 15 repeticiones de la técnica calentando los tubos en baño de agua a una temperatura de 85°C durante 6 minutos.

Repe- tición	T U B O N o.					Media - aritmé- tica.
	1	2	3	4	5	
1	56	56	55	56	56	55.8
2	56	56	59	55	55	56.2
3	56	56	56	55	56	55.8

Media aritmética de 15 lecturas = 55.2

3.- Efecto del tiempo de calentamiento sobre la reacción de óxido-reducción. (Experimentos Nos. 2 y 3)

a) Material y métodos:

Se utilizaron los mismos reactivos descritos anteriormente en la página 7.

Para determinar el efecto del tiempo de calentamiento - sobre la reacción de óxido-reducción, la técnica "original" previamente descrita fué seguida introduciendo la modificación en el paso No. 4. Se hicieron 2 series de experimentos variando el tiempo de calentamiento: en uno de ellos -- (experimento 2)

se calentó durante 4 minutos y en el otro (experimento 3) durante 7, en lugar de los 6 minutos prescritos en la técnica "original".

b) Resultados :

Los resultados que se obtuvieron se presentan en las tablas No. 3 y No. 4.

En la tabla No. 3 observamos que de los 5 tubos procesados en la primera ocasión, 3 de ellos dieron una lectura de 75 y los 2 restantes, uno 57 y el otro 73; la media aritmética correspondiente a estas lecturas fué de 71. En la segunda, hubo variación en las lecturas con una media aritmética de 80.4. En la tercera repetición, 3 de los 5 tubos procesados dieron una lectura de 75 y los 2 restantes, uno 81 y el otro 77 (media aritmética = 76.6).

Observamos en la tabla No. 4 que en la primera ocasión, 3 de los 5 tubos procesados dieron una lectura de 100 y los otros 2, uno 96 y el otro 99. Estas lecturas dan una media aritmética de 99. En la segunda ocasión hubo más variación en las lecturas dando la media aritmética de 106.4. En la tercera repetición hubo más uniformidad en las lecturas con una media aritmética de 100.

Tabla No. 3 : Lecturas obtenidas en 15 repeticiones de la -- técnica calentando los tubos en baño de agua hirviente duran te 4 minutos.

Repeti- ción.	T U B O No.					Media aritmé- tica.
	1	2	3	4	5	
1	75	75	57	75	73	71.0
2	76	87	85	77	77	80.4
3	81	75	75	75	77	76.6

Media aritmética de las 15 lecturas = 76.0

Tabla No. 4 : Lecturas obtenidas en 15 repeticiones de la -- técnica calentando los tubos en baño de agua hirviente duran te 7 minutos.

Repeti- ción.	T U B O N o.					Media aritmé- tica
	1	2	3	4	5	
1	100	96	99	100	100	99.0
2	102	100	100	115	115	106.4
3	100	100	101	100	99	100.0

Media aritmética de las 15 lecturas = 101.8

4.- Efecto del enfriamiento posterior a la reacción de óxido-reducción. (Experimentos 4, 5 y 6)

a) Material y métodos :

Se utilizan los mismos reactivos descritos anteriormente en la página 7.

Para determinar el efecto del enfriamiento posterior a la reacción de óxido-reducción, la técnica "original" previamente descrita fué seguida introduciendo la modificación en el paso No. 5. Se hicieron 3 series de experimentos variando el enfriamiento: en el experimento 4 se enfriaron los tubos en agua no corriente durante 3 minutos, en el experimento 5 se enfriaron en agua corriente durante 2 minutos y en el experimento 6 durante 4 minutos, en lugar de enfriar los tubos en agua corriente durante 3 minutos.

b) Resultados :

Los resultados obtenidos se presentan en las tablas No. 5, 6 y 7.

En las tablas No. 5 y 6 observamos uniformidad en todas las lecturas.

En la tabla No. 7 observamos que de los 5 tubos procesados en la primera ocasión, 4 dieron una lectura de 95 y el tubo restante dió una lectura de 93. Estas lecturas dan una media aritmética = 94.6. En la segunda repetición hubo uniformidad en las lecturas. En la tercera repetición, 4 de los 5 tubos procesados dieron lectura de 97 y el tubo restante de 95, (media aritmética = 96.6).

Tabla No. 5 : Lecturas obtenidas en 15 repeticiones de la --
técnica enfriando los tubos en agua no corriente durante 3 -
minutos.

Repeti ción	T U B O N o.					Media aritmé tica
	1	2	3	4	5	
1	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100

Media aritmética de las 15 lecturas = 100

Tabla No. 6 : Lecturas obtenidas en 15 repeticiones de la --
técnica enfriando los tubos en agua corriente durante 2 minu
tos.

Repeti ción	T U B O N o.					Media aritmé tica
	1	2	3	4	5	
1	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100

Media aritmética de las 15 lecturas = 100

Tabla No. 7 : Lecturas obtenidas en 15 repeticiones de la --
técnica enfriando los tubos en agua corriente durante 4 minu-
tos.

Repeti- ción	T U B O N o.					Media aritmé- tica
	1	2	3	4	5	
1	95	95	93	95	95	94.6
2	100	100	100	100	100	100.0
3	95	97	97	97	97	96.6

Media aritmética de las 15 lecturas = 97

5.- Efecto del tiempo transcurrido entre la reacción de formación del complejo coloreado y su cuantificación.

(Experimentos 7, 8 y 9)

a) Material y métodos :

Se utilizan los mismos reactivos descritos anteriormente en la página 7.

Para determinar el efecto del tiempo transcurrido entre la reacción de formación del complejo coloreado y su cuantificación, la técnica "original" previamente descrita fué seguida introduciendo la modificación en el paso No. 9. Se hicieron 3 series de experimentos variando el tiempo de reposo: en el experimento 7 se dejó reposar durante 2 minutos, en el experimento 8, durante 6 minutos y en el experimento 9 durante 10 minutos, en lugar de los 5 minutos prescritos en la técnica "original".

b) Resultados :

Los resultados que se obtuvieron se presentan en las tablas No. 8, 9 y 10.

Observamos en la tabla No. 8 que de los 5 tubos procesados en la primera ocasión, 4 de ellos dieron una lectura de 85 y el tubo restante de 84 (media aritmética = 84.8). En la segunda ocasión, 4 de los tubos procesados dieron lectura de 84 y el tubo restante de 85 (media aritmética = 84.2). En la tercera repetición hubo también uniformidad en las lecturas con una media aritmética de 83.8 .

En la tabla No. 9 observamos grán uniformidad en las lecturas.

En la tabla No. 10 observamos uniformidad en las lecturas, dando una media aritmética de 99 en la primera ocasión y en las 2 repeticiones restantes dieron todas las lecturas de 100.

Tabla No. 8 : Lecturas obtenidas en 15 repeticiones de la --
técnica dejando en reposo los tubos durante 2 minutos.

Repeti ción	T U B O N o.					Media aritmé tica
	1	2	3	4	5	
1	85	85	85	84	85	84.8
2	84	84	84	84	85	84.2
3	84	83	84	84	84	83.8

Media aritmética de las 15 lecturas = 84.2

Tabla No. 9 : Lecturas obtenidas en 15 repeticiones de la --
técnica dejando en reposo los tubos durante 6 minutos.

Repeti ción	T U B O N o.					Media aritmé tica
	1	2	3	4	5	
1	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100

Media aritmética de las 15 lecturas = 100

Tabla No. 10 : Lecturas obtenidas en 15 repeticiones de la -
técnica dejando en reposo los tubos durante 10 minutos.

Repeti- ciones	T U B O N o.					Media aritmé- tica
	1	2	3	4	5	
1	100	100	100	100	95	99
2	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100

Media aritmética de las 15 lecturas = 99.6

6.- Discusión y conclusiones.

En la tabla 11 se presentan los resultados obtenidos - en los experimentos 1, 2 y 3 diseñados para determinar el efecto que la temperatura y el tiempo de calentamiento tienen sobre la reacción de reducción del reactivo cúprico alcalino por la glucosa. Como puede apreciarse en ella no hay diferencia entre los resultados obtenidos, calentando en agua -- hirviendo por 6 min. (99.4) o por 7 min. (101.8); por el contrario los valores obtenidos al calentar a temperatura inferior a la de ebullición o por menos de 6 min. son notablemente inferiores (55.2 y 76.0 respectivamente) a los obtenidos con las condiciones indicadas por la técnica original (99.4).

Tabla No. 11 : Efecto de la temperatura y el tiempo de calentamiento sobre la reacción de reducción del reactivo cúprico alcalino por la glucosa (paso 4 de la técnica).

Condiciones experimentales		Media Aritmética	Desviación standard
Temperatura del baño de agua	Tiempo de exposición (min.)		
hirviente (*)	6 (*)	99.4	1.22
hirviente	4	76.0	6.26
hirviente	7	101.8	5.85
85°C	6	55.2	1.18

(*) Condiciones establecidas por la técnica original.

En la tabla 12 se presentan los resultados obtenidos en los experimentos 4, 5 y 6 diseñados para determinar el efecto del enfriamiento posterior a la reacción de óxido-reducción. Como puede apreciarse en ella no hay diferencia entre los resultados obtenidos, enfriando en agua no corriente por 3 min. (100.0) o en agua corriente por 2 min. (100.0), y existiendo sólo una pequeña diferencia cuando se enfrió en agua corriente por 4 min. (97.0) a los resultados obtenidos con las condiciones indicadas por la técnica original.

Tabla No. 12 : Efecto de las condiciones del baño de agua y el tiempo de enfriamiento posterior a la reacción de reducción del reactivo cúprico alcalino (paso 5 de la técnica)

Condiciones experimentales		Media aritmética	Desviación standard
Enfriamiento en agua :	Tiempo de exposición (min.)		
corriente (*)	3 (*)	99.4	1.22
corriente	2	100.0	0
corriente	4	97.0	2.32
estancada	3	100.0	0

(*) Condiciones establecidas por la técnica original.

En la tabla 13 se presentan los resultados obtenidos en los experimentos 7, 8 y 9, diseñados para determinar el efecto del tiempo de reposo posterior a la dilución del complejo coloreado. Como puede verse en ella no hay diferencia entre los resultados obtenidos, dejando en reposo durante 5 min. - (100.0) o durante 10 min. (99.6); por el contrario los valores obtenidos al dejar sólo 2 min. de reposo son inferiores (84.2) a los obtenidos con las condiciones indicadas por la técnica original (99.4)

Tabla No. 13 : Efecto del tiempo de reposo posterior a la dilución del complejo coloreado (paso 9 de la técnica)

Condiciones experimentales	Media aritmética	Desviación standard
Tiempo de reposo (min.)		
5 (*)	99.4	1.22
2	84.2	0.57
6	100.0	0
10	99.6	1.24

(*) Establecido por la técnica original.



B) Efecto de la longitud de onda empleada en la cuantificación.

a) Material y métodos :

Se utilizaron los mismos reactivos descritos anteriormente en la página 7. Además se hicieron diluciones seriadas a partir de la solución stock cuyas concentraciones de glucosa, expresadas en mg./ 100 ml., fueron las siguientes : 20.0 , 17.5, 15.0, 12.5, 10.0, 7.5, y de 5.0 , equivalentes a filtrados de sangres con concentraciones de 200, 175, 150, 125, 100, 75 y 50 mg. /100 ml. respectivamente.

Para determinar el efecto de la longitud de onda empleada en la cuantificación, la técnica "original" previamente descrita fué seguida introduciendo la modificación en el paso No. 10. Se hicieron 3 series de experimentos variando el filtro: en uno de ellos se empleó el filtro azul No. 42 (técnica "original"), en otro el filtro verde No. 54 y en otro el filtro rojo No. 66.

b) Resultados :

Los resultados se presentan en la tabla No. 14 y en la gráfica No. 1.

Tabla No. 14 : Curvas de calibración para determinación de glucosa sanguínea por el método de Folin Wu utilizando los 3 filtros: azul, verde y rojo.

Concentración de glucosa en la solución. mg./100 ml.	Equivalente a glucosa en un filtrado 1:10 de sangre. mg./100	LECTURA CON FILTRO		
		Azul	Verde	Rojo
5.0	50	56	60	145
7.5	75	77	100	230
10.0	100	105	150	350
12.5	125	130	202	490
15.0	150	155	254	600
17.5	175	178	305	700
20.0	200	202	350	900

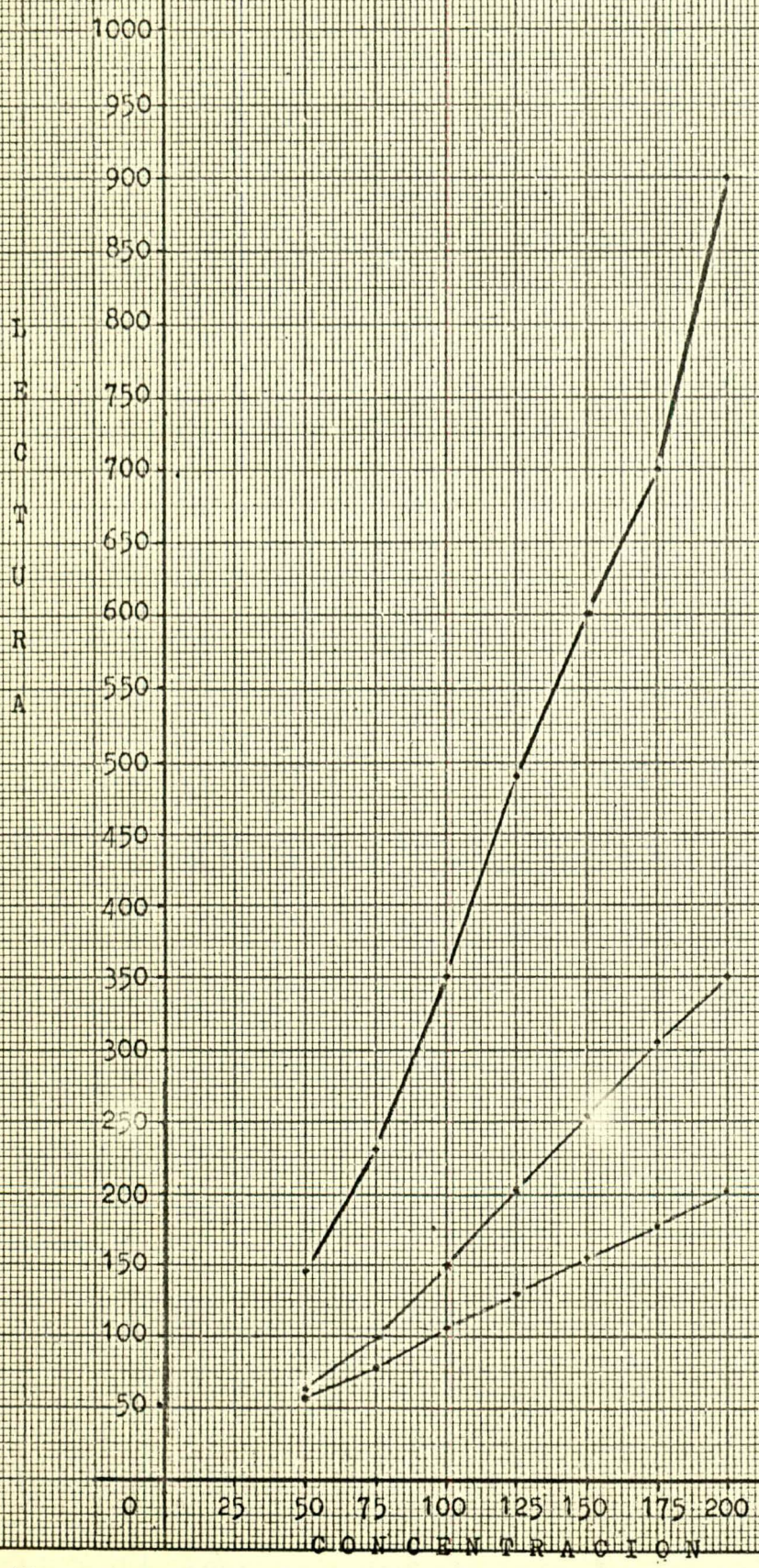
c) Discusión y conclusiones :

Observamos en la gráfica que las curvas obtenidas siguiendo la técnica de Folin Wu y utilizando los 3 filtros, son trazos casi rectos pero con diferente pendiente, siendo mayor ésta con el filtro rojo, menor con el filtro verde y mucho menor empleando el filtro azul.

Ahora bien, cuanto mayor sea la pendiente del trazo, sin que ésta pase de un ángulo de 45° , los intervalos en el eje de las abscisas son cada vez mayores para intervalos determinados en el eje de las ordenadas; por ejemplo : las primeras 2 diluciones con que se trabajó (50 y 75 mg./100) cuando se uti-

lizó el filtro rojo, en el intermedio de ambas concentraciones existen 85 unidades de lectura, sin embargo cuando se utilizó el filtro azul, las unidades de lectura en el trazo - que existe entre las 2 diluciones mencionadas son de solamente 21; por lo tanto se podría concluir que el trazo con filtro rojo es mas "sensible" que el obtenido con el filtro azul. En realidad en los análisis espectrofotométricos el color del filtro empleado para medir la absorbancia debe ser - el complementario del de la solución que se valora; el color de la solución obtenida en la técnica de Folin Wu es azul, - por lo tanto debería emplearse en su valoración el filtro rojo. El hecho de que en la técnica original se emplee el filtro azul, en contra de los principios básicos de la espectrofotometría, quizá sea debido a que con este filtro las lecturas en el fotocolorímetro Klett-Summerson, corresponden numéricamente a la concentración de glucosa, al menos dentro - de los valores normales para el método.

Gráfica No. 1 : Curvas de calibración para determinación de glucosa sanguínea por el método de Folin Wu utilizando los 3 filtros : azul, verde y rojo



C) Calibración de un fotocolorímetro Leitz Modelo M para determinación de glucosa sanguínea por 3 métodos.

1.- Para el método de Folin Wu.

a) Material y métodos :

Se utilizaron los mismos reactivos descritos anteriormente en la página 7. Se emplearon las mismas diluciones -- descritas en la página 20.

Se empleó en este experimento un fotocolorímetro Leitz modelo M (*) y se siguió estrictamente la técnica de Folin Wu descrita en el manual del aparato.

1) Se coloca en un tubo de Folin Wu, 2 ml. de agua destilada y se marca como "blanco".

2) Se coloca en tubos de Folin Wu, 2 ml. de cada dilución de glucosa y se marcan con su respectiva concentración.

3) Se añade a cada tubo, 2 ml. de solución cúprica alcalina.

4) Se mezcla perfectamente por agitación lateral de los tubos y se tapan flojamente.

5) Se colocan los tubos en baño maría hirviendo rápidamente por exactamente 8 minutos.

6) Se sacan los tubos del baño y se enfrían a temperatura ambiente bajo agua corriente.

7) Se añade a todos los tubos, 2 ml. de solución fosfomolibdica.

8) Se mezclan perfectamente mediante vigorosa agitación lateral de los tubos.

- 9) Se colocan nuevamente los tubos en baño maría hirviente por exactamente 5 minutos.
- 10) Se aforan con agua destilada a 25 ml.
- 11) Se tapan los tubos y se mezcla su contenido perfectamente mediante inversiones repetidas, permitiendo que los bulbos se vacíen cada vez.
- 12) Se transfiere una parte de cada solución a cubetas cuadradas de 10 mm. correspondientemente rotuladas.
- 13) Utilizando el filtro 520 con el "blanco", se ajusta el amperímetro del fotocolorímetro a 100 en la escala de transmisión.
- 14) Se reemplaza inmediatamente el "blanco" por cada una de las diluciones con diferentes concentraciones del azúcar, anteponiendo cada vez el "blanco" para ver si la aguja del amperímetro está en el 100. Se lee la transmisión en el amperímetro.
- 15) Se grafica en papel milimétrico la curva de calibración.

b) Resultados :

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla No. 15 y en la gráfica No. 2

Gráfica No. 2 : Curva de calibración para determinación de glucosa sanguínea por el método de Folin Wu en el fotocolorímetro Leitz modelo M.

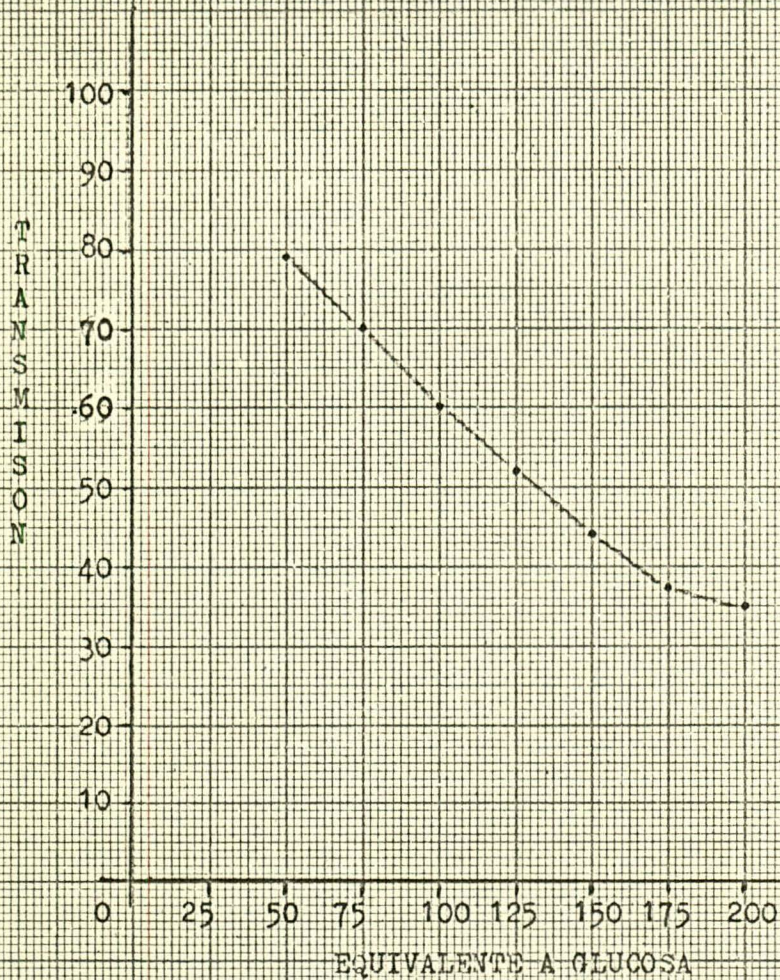


Tabla No. 15 : Calibración del Leitz para determinación de glucosa sanguínea por el método de Folín Wu.

Concentración de glucosa en la solución. mg./100	Equivalente a glucosa en un filtrado 1:10 de sangre mg./100	% de Transmisión.
5.0	50	79
7.5	75	70
10.0	100	60
12.5	125	52
15.0	150	44
17.5	175	37.5
20.0	200	35

2.- Para el método de Somogyi-Nelson.

a) Material y métodos:

Se empleó en este experimento el mismo aparato descrito anteriormente en la página 23, y se siguió estrictamente la técnica de Somogyi-Nelson descrita en el manual del aparato y que se describe a continuación:

- 1) En un tubo rotulado "blanco" se le añade 1 ml. de agua destilada.
- 2) Se coloca en tubos de Folín Wu, 1 ml. de cada dilu--

ción de glucosa y se marcan con su respectiva concentra
ción.

3) Se agrega a cada tubo, 1 ml. de solución alcalina de tartrato cúprico (solución 1).

4) Se mezclan y calientan los tubos en baño maría hir--
viente por 15 minutos.

5) Se enfrían los tubos en agua corriente.

6) Se agrega a cada tubo, 1 ml. de solución de arsenomo
libdato (solución 2).

7) Se mezclan los tubos y se diluyen a 25 ml. con agua
destilada, se mezclan por inversión repetida.

8) Utilizando el filtro 500 n.m. con el "blanco", se a-
justa el amperímetro del fotocolorímetro Leitz a 100 en
la escala de transmisión.

9) Se reemplaza inmediatamente el "blanco" por cada una
de las diluciones con diferentes concentraciones de glu
cosa, anteponiendo cada vez el "blanco" para ver si la
aguja del amperímetro está en el 100. Se lee la trans-
misión en el amperímetro.

10) Se grafica en papel milimétrico la curva de calibra
ción.

Soluciones:

(Solución 1). Solución alcalina de tartrato cúprico.-

Se disuelven 24 g. de carbonato de sodio anhidro y 12 g.
de tartrato de sodio y potasio en 200 ml. de agua destilada.
Se añade, mientras se agita, 40 ml. de una solución de sulfa
to de cobre al 10 %. Cuando está disuelto, se añade 16 g. -
de bicarbonato de sodio y se agita hasta que se disuelva.

Se disuelven 180 g. de sulfato de sodio anhidro en ----

600 ml. de agua, se calienta a ebullición, se enfría y se añade a la solución cúprica. Se transfiere la mezcla a un matraz de 1000 ml. aforándola.

(Solución 2). Solución de arsenomolibdato.-

Se disuelven 50 g. de molibdato de amonio en 900 ml. de agua destilada, se añaden 42 ml. de ácido sulfúrico concentrado y se mezcla. Se añaden 6 g. de orto-arsenato disódico ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) disueltos en 50 ml. de agua destilada. Se mezcla y se incuba a 37°C por 48 hrs. Esta solución es estable indefinidamente en frasco ámbar con tapón esmerilado.

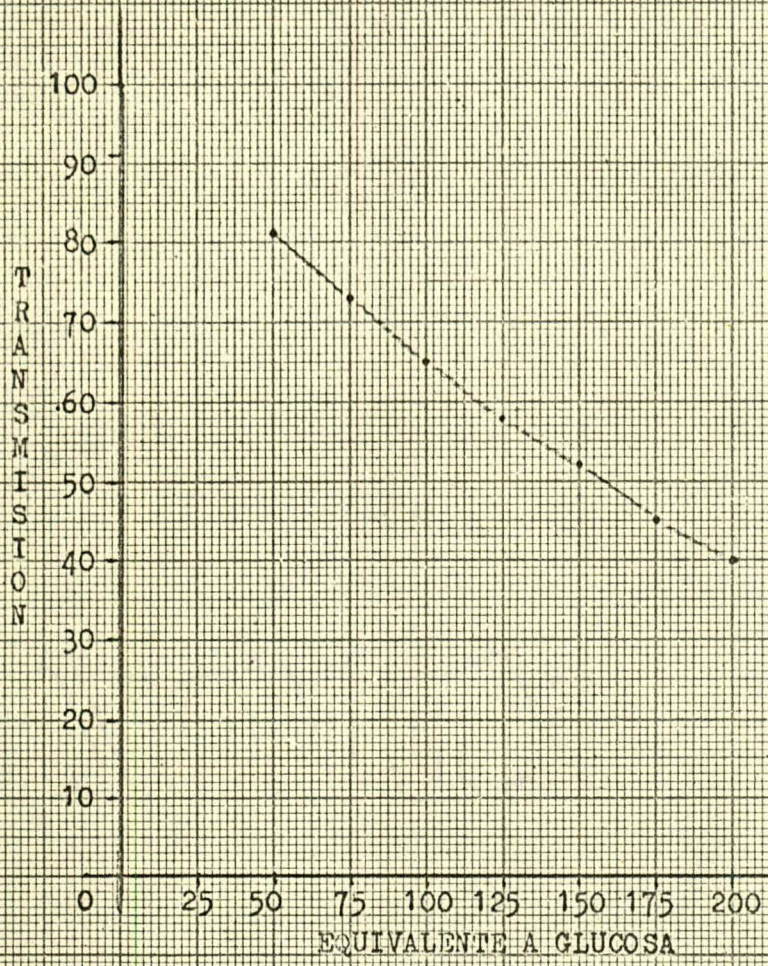
b) Resultados:

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla No. - 16 y en la gráfica No. 3.

Tabla No. 16 : Calibración del Leitz para determinación de glucosa sanguínea por el método de Somogyi-Nelson.

Concentración de glucosa en la solución. mg./100	Equivalente a glucosa - on un filtro de 1:10 de sangre - - - mg./100	Transmisión.
5.0	50	81
7.5	75	73
10.0	100	65
12.5	125	58
15.0	150	52
17.5	175	45
20.0	200	40

Gráfica No. 3 : Curva de calibración para determinación de glucosa sanguínea por el método de Somogyi-Nelson en el fotocolorímetro Leitz Modelo M.



3.- Para el método de la orto-toluidina.

a) Material y métodos:

Para el método de la orto-toluidina, se utilizaron los reactivos obtenidos en su forma comercial de los laboratorios Merck, y se emplearon también las diluciones de la solución stock descritas anteriormente en la página 20. Se siguió estrictamente la técnica descrita por los Laboratorios Merck (*) y que se describe a continuación:

A.-

1) Se coloca en un tubo de ensaye, 1 ml. de ácido tricloroacético (solución 1) y se rotula como "blanco".

2) Se coloca en otro tubo, 1 ml. de ácido tricloroacético y se le añade 0.1 ml. de solución patrón (solución 2), rotulando este tubo como "patrón" y se mezcla.

3) Se coloca en otros tubos, 1 ml. de ácido tricloroacético y se les añade 0.1 ml. de las diluciones de la solución stock y se rotulan con su correspondiente concentración de glucosa. Se mezcla cada tubo.

B.- Se introduce con pipeta en otros tubos de ensaye -- respectivamente rotulados :

4) Se toma 0.5 ml. de la mezcla dilución-ácido y se le agrega a cada tubo 2.0 ml. del reactivo de color (solución 3).

5) Se toma 0.5 ml. del "blanco" y se añade 2.0 ml. del reactivo de color.

(*) Merckotest, art. No. 3306. E. Merck AG Dormstadt, Alemania.

6) Se toman 0.5 ml. de la mezcla patrón-ácido y se le agrega 2.0 ml. del reactivo de color.

C.- Se mezclan los tubos, se dejan en un baño maría hirviente por 8 minutos y se pasan seguidamente en agua --
fría.

7) Después de enfriar y utilizando el filtro 610 n.m. - con el "blanco", se ajusta el amperímetro del fotocolorímetro a 100 en la escala de transmisión.

8) Se reemplaza inmediatamente el "blanco" por cada una de las diluciones con diferentes concentraciones de glucosa, anteponiendo cada vez el "blanco" para ver si la aguja del amperímetro está en el 100. Se lee la transmisión en el amperímetro.

9) Se grafica en papel milimétrico la curva de calibración.

Soluciones y reactivos :

(Solución 1). Acido tricloroacético.

Obtenido en su forma comercial de los laboratorios --
Merck.

(Solución 2). Solución patrón de glucosa (100 mg./100 ml.).

Obtenido en su forma comercial de los laboratorios --
Merck.

(Solución 3). Reactivo de color.

Solución de orto-toluidina en ácido acético glacial ob-
tenido en su forma comercial de los laboratorios Merck.

b) Resultados:

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla No. -
17 y en la gráfica No. 4 .

Tabla No. 17 : Calibración del fotocolorímetro Leitz para determinación de glucosa sanguínea por el método de la ortotoluidina.

Concentración de glucosa en la solución mg. /100	Equivalente a glucosa en un filtrado 1:10 de sangre. mg. /100	Transmisión.
5.0	50	70
7.5	75	66
10.0	100	60
12.5	125	52
15.0	150	45
17.5	175	40
20.0	200	34

4.- Discusión y conclusiones :

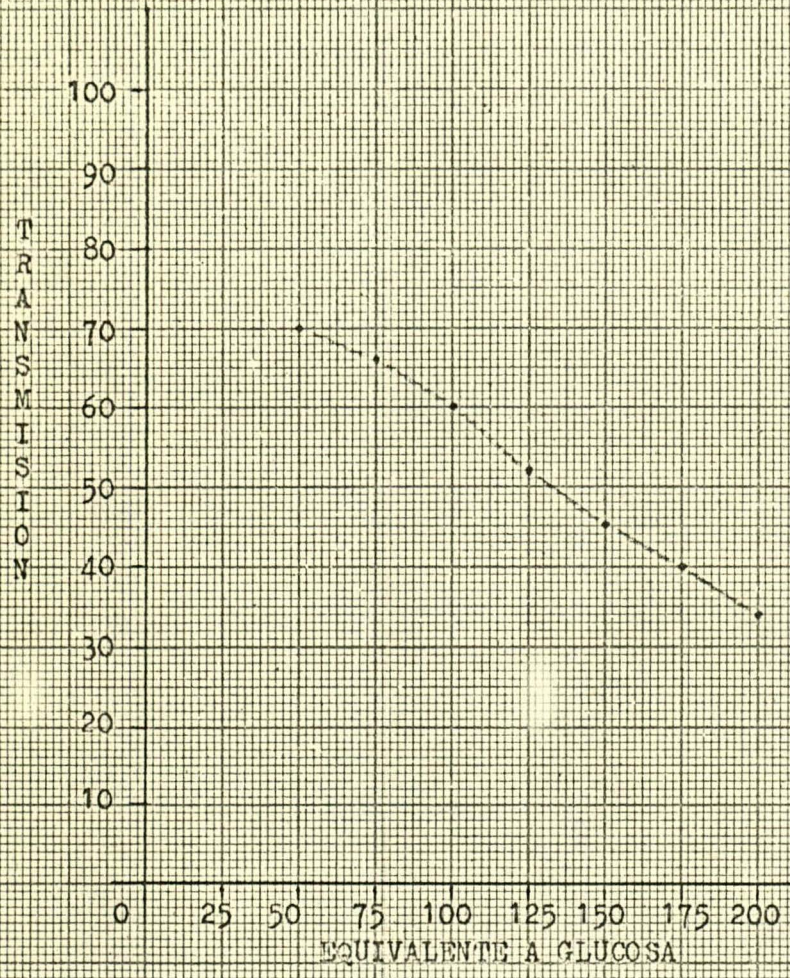
Si observamos la curva de calibración para la determinación de glucosa por el método de Folín Wu en el fotocolorímetro Leitz, vemos que a medida que va aumentando la concentración de la solución, la transmisión va siendo menor trazándose con los puntos obtenidos una recta, sin embargo, al llegar a una concentración de 175 mg./100 ml., la recta se va desviando un poco hacia arriba, aunque no se sabe qué tanto subirla pues la concentración mayor que se hizo fué de 200 mg./100 ml. Sin embargo, no es muy importante saberlo pues esa concentración queda muy lejos de los valores normales de glucosa (80-120 mg./100 ml.).

En la curva de calibración por el método de Somogyi-Nelson, observamos que hay un punto (125 mg./100) que hace desviar la recta, quizá se deba a las mismas variaciones que -- puedan existir en la técnica, sin embargo como no se hicieron repeticiones de ella, no es posible en este caso saber -- la causa.

En la curva de calibración por el método de la orto--toluidina, observamos pequeñas variaciones en ella pero resultó bastante recta.

Ahora bien, de las 3 técnicas empleadas, la que en mi o pinión es más manuable y fácil de seguir es por el método de la orto-toluidina, pues tiene muchos menos pasos que seguir que las otras 2 técnicas. En casos de emergencias es más rá pida seguir ésta técnica. Desde el punto de vista económico parece ser un poco más cara la técnica de la orto-toluidina al comprar los reactivos ya preparados.

Gráfica No. 4: Curva de calibración para la determinación de glucosa sanguínea por el método de la orto-toluidina en el fotocolorímetro Leitz modelo M.



111) LITERATURA CONSULTADA

1. *Bray's Clinical Laboratory Methods.*
Bauer, Ackermann, Gelson Toro
7^a Edición
páginas: 298, 299, 300, 301.

2. *Medical Laboratory Technology and Clinical Pathology*
Linch, Raphael, Mayor, Spare, Inwoop.
2nd. Edition W. B. Founder Company.

3. *Todd-Stanford Clinical Diagnosis by Laboratory Methods.*
Davidsohn and Henry.
Cap. X páginas: 557, 558.

4. *Manual de técnica del fotocolorímetro Klett-Summerson.*

5. *Manual de técnicas del fotocolorímetro Leitz.*

6. *Instrumental Methods of Chemical Analysis*
Third Edition
Galen W. Ewing
páginas 48 y 49

800203

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

--	--	--