

R-2754

T.188

FACULTAD DE FARMACIA

CARACTERIZACION DE LA INTERFERENCIA DEL NCLO-
TIL EN LA DETERMINACION ANALITICA DE GLUCOSA

Ma José Ariza Astolfi

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

1.978

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA
BIBLIOTECA

El Jefe del Departamento de QUIMICA FISICA
Prof. Dr. Don Francisco Sanchez Burgos por el
presente escrito acepta ser ponente de la Tesis
de Licenciatura cuyo título es "CARACTERIZACION
DE LA INTERFERENCIA DEL NOLOTIL EN LA DETERMINA-
CION ANALITICA DE GLUCOSA" efectuada por la as-
pirante al Grado de Licenciado en Farmacia
Doña Maria José Ariza Astolfi y efectuda bajo
la dirección del Profesor de Tecnicas Instru-
mentales de mi Departamento Dr. Camilo Fernán-
dez y el Prof. Dr. Joaquín Herrera Carranza.

El presente trabajo ha sido realizado durante
el curso 1.977-78 en los Laboratorios del Real
e Ilustre Colegio Oficial de Farmaceúticos de la
Provincia de Sevilla, ante la falta de medios
necesarios para llevar a cabo este trabajo en
los Laboratorios de esta Facultad de Farmacia.

Sevilla a 28 de Noviembre de 1.978



A handwritten signature in dark ink, appearing to be the initials "F.S.B." with a stylized flourish.

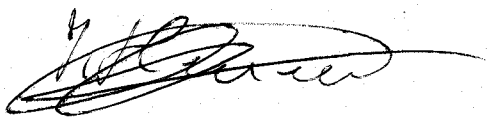
Fdo.: Prof. Dr. D. Francisco Sanchez Burgos

MEMORIA presentada en la Facultad de Farmacia
de la Universidad de Sevilla, para as
pirar al Grado de Licenciado en Farma
cia por M^a José Ariza Astolfi

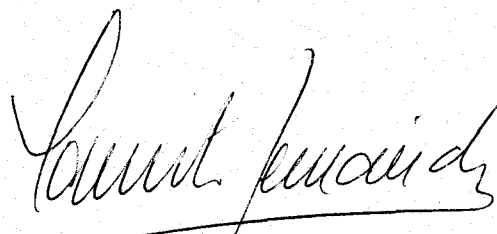
E^{do.}: M^a José Ariza Astolfi

Aspirante al Grado de Licenciado en Farmacia

El presente trabajo ha sido realizado bajo la
dirección conjunta de:



Dr. Joaquín Herrera Carranza
Director Técnico "AVENZOAR"
Fundación Farmacéutica
Colegio Oficial de Farmacéu-
ticos
SEVILLA



Dr. Camilo Fernández Espina
Prof. Técnicas Instrumentales
Facultad de Farmacia
Universidad de Sevilla
SEVILLA

El presente trabajo ha sido realizado durante el curso 1.977/78 en los LABORATORIOS DEL REAL E - ILUSTRE COLEGIO OFICIAL DE FARMACEUTICOS DE LA PROVINCIA DE SEVILLA.

Parte de los resultados que se recogen en la presente memoria han sido presentados en el I Congreso Nacional de la/ Sociedad Española de Química/ Clínica, Barcelona, Noviembre de 1.978.

Mi gratitud:

Al Dr. D. Rafael Alvarez Colunga, Presidente del Colegio Oficial de Farmaceuticos de la Provincia de Sevilla, por poner a mi disposición los medios necesarios para la realización de este trabajo.

Al Dr. D. Joaquín Herrera Carranza. que con tanto interés me ha prestado siempre la ayuda, orientación y estímulo necesario para el desarrollo de este trabajo bajo su dirección.

Al tambien director de este trabajo, Dr. -- D. Camilo Fernandez Espinosa, por haberme formado en la instrumentación necesaria para realizar esta la--bor.

Al Dr. D. Guillermo García Trenado, director del laboratorio del mismo nombre, por su colaboración crítica y bibliografía suministrada.

I N D I C E
=====

	<u>Página</u>
INTRODUCCION	6
- Importancia de la determinación de glucosa	7
- Valores normales de glucosa en sangre completa y suero	10
- Estabilidad de glucosa en sangre extraída	13
- Revisión de métodos de determinación de glucosa.	15
- Interferencias conocidas de farmacos y otras -- substancias en el analisis biologico de glucosa.	25
- Farmacologia del nolotil	31
- Interferencia del nolotil	36
MATERIAL Y METODOS	37
RESULTADOS Y DISCUSION	48
CONCLUSIONES	66
BIBLIOGRAFIA	68

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

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

= = = = =

IMPORTANCIA DE LA DETERMINACION DE GLUCOSA

Los carbohidratos representan el suministro mayor de alimentos y la principal fuente de energía para la población mundial.

La enfermedad más común en relación con el metabolismo de carbohidratos es la diabetes, la cual se caracteriza por nivel de insuficiente de insulina activa.

La deficiencia de insulina se traduce en menoscabo del metabolismo, aumentode la concentración de glucosa en sangre y cambios secundarios en el metabolismo de las grasas, lo cual conduce finalmente a cetosis y posible coma diabético. Entre otras complicaciones se presentan hipercolesterolemia, arteriosclerosis y enfermedad renal. Hay aproximadamente dos millones de diabéticos reconocidos en los Estados Unidos y probablemente dos millones más de casos que no han sido diagnosticados. Por ello la incidencia global es casi del 2% de la población total estadounidense. La enfermedad muestra fuerte tendencia familiar y la probabilidad de que un individuo padezca dia-

betes es varios tantos mayor si hay antecedentes familiares de la enfermedad.

El temprano diagnóstico de diabetes permite tratarla más pronto y quizás retardar o reducir al mínimo las complicaciones de la enfermedad.

La producción en exceso o la administración excesiva de insulina causa una disminución de glucosa en sangre a niveles inferiores al normal. En varios casos, la extrema hipoglucemia resultante va seguida de espasmo vascular/ y pérdida de conciencia, estado conocido como "Choque insulínico". Por todo ello, las mediciones de glucosa en sangre asumen importancia considerable y el laboratorio clínico ha de estar preparado para proporcionar resultados rápidamente y con alto grado de fiabilidad.

La determinación de glucosa en sangre es el procedimiento que se efectúa con más frecuencia en el laboratorio de química clínica. En un hospital medio esta determinación representa de ordinario más del 20% de los análisis químicos solicitados. Además, se efectúan muchas determinaciones de glucosa en clínicas, laboratorios independientes y consultorios médicos como ayuda en el diagnóstico y tratamiento de diabetes. La determinación puede efectuarse con el paciente en ayunas, en estado posprandial o/

en conjunción con pruebas de tolerancia a glucosa, según la solicitud del médico.

Hay otros factores, aparte de la insulina que afectan al nivel de glucosa en sangre y es un error asumir que un nivel elevado es diagnóstico de diabetes, si no hay otros datos que lo apoyen o pruebas que lo confirmen.

VALORES NORMALES DE GLUCOSA EN SANGRE COMPLETA Y SUERO

La concentración normal de glucosa en sangre completa determinada por métodos muy específicos, varía de 65 a 95 mg/100 ml. La concentración de glucosa es uniforme en la base acuosa de plasma y eritrocitos.

Como el plasma contiene aproximadamente 12% -- mas agua que la sangre completa, se deduce que la cantidad total de glucosa en 100 ml. de plasma es aproximadamente/ 12% mayor que en 100 ml. de sangre completa. El intervalo normal de valores de glucosa en plasma (o suero) se suele dar como 75 a 105 mg/100 ml.

Esta distribución desigual puede ilustrarse -- asumiendo una concentración de 1 mg. de glucosa por ml. - de la base acuosa en sangre como sigue:

<u>Componente</u> <u>Analizado</u>	<u>Porcentaje</u> <u>de agua</u>	<u>Mg. de glucosa/100</u> <u>ml. de componente</u>
Eritrocitos.....	73	73
Sangre completa..	83	83
Plasma.....	93	93

Por estos valores resulta evidente que el in--

tervalo "normal" para glucosa en sangre completa variará/ con el hematocrito. Por esta causa es preferible efectuar determinaciones de glucosa en plasma o suero. Además los/ eritrocitos contienen compuestos sulfhidrilicos, glutationa y ergotioneína, que actúan también como sustancias reductoras e interfieren en procedimientos de determinación de glucosa basados en su acción reductora en solución alcalina, a menos que se eliminen estos compuestos antes -- del análisis.

Estas sustancias reductoras, distintas a la - glucosa, llamadas "sacaroides" aumentan los valores de -- glucosa aparente en 10 a 30 mg/ml. aproximadamente, cuando se analiza sangre completa por el método de Foliu-Wu - (1, 2). El intervalo normal resultante con la inclusión - de sacaroides, llega a ser de 80 a 120 mg/100 ml. y se ininforma de él como "azúcar en sangre " aunque el término -- más apropiado sería "total de substancia reductores".

A causa de la variación en los valores norma-- les para glucosa verdadera en plasma, comparado con san-- gre completa, y de la relativa falta de especificidad de/ ciertos métodos de determinación de glucosa, ha surgido - confusión en cuanto a la interpretación de valores dados/ por diferentes laboratorios.

Si asumimos que el suero contiene 12% más de -

glucosa que la sangre completa y que el promedio de valores de sacaroides en sangre completa normal es de 20 mg/ - 100 ml., la relación entre los valores sería aproximadamente la siguiente:

Glucosa verdadera (mg/100 ml) "Azúcar" reductor (mg/100ml)

<u>SANGRE COMPLETA</u>	<u>SUERO</u>	<u>SANGRE COMPLETA</u>
70	80	90
100	110	120
150	170	170
200	225	320
300	335	320

Así pues, los valores tomados para el suero fueron obtenidos multiplicando los valores para glucosa verdadera en sangre completa por 1.12; los valores para azúcar/"reductor" en sangre completa fueron obtenidos sumando 20/mg/100 ml. a los valores de glucosa verdadera en sangre -- completa. Afortunadamente la mayoría de los métodos aplicados a suero dan resultados con concordancia bastante buena pues el contenido de sacaroides es bajo y relativamente -- constante; por ende, la comparación de resultados de diferentes laboratorios se facilitaría usando suero o plasma -- uniformemente para las determinaciones de glucosa.

ESTABILIDAD DE GLUCOSA EN SANGRE EXTRAIDA

Cuando se extrae sangre, se deja coagular y se deja sin centrifugar a temperatura ambiente, la disminución media de glucosa en suero es aproximadamente de 7 % en una hora. En suero separado sin hemolizar, la concentración de glucosa es en general estable hasta durante 8 horas a 25°C y hasta 72 horas a 4°C. Durante períodos de almacenamiento más largos se observa estabilidad variable relacionada con contaminación bacteriana. El plasma separado de las células después de moderada centrifugación contiene leucocitos que también metabolizan glucosa. El plasma exento de células no muestra actividad glucolítica. De estos datos se deduce que las determinaciones de glucosa en sangre completa habrán de efectuarse con prontitud después de la recogida de la muestra. Plasma o suero de sangre sin preservativos habrá de separarse de las células o coágulo dentro de una media hora después de extraída la sangre si han de obtenerse de modo consecuente valores de glucosa dentro de 10 mg/100 ml. del valor original.

Se puede prevenir la glucolisis y estabilizar glucosa hasta 24 horas, a temperatura ambiente por adición de fluoruro sódico a la sangre. El usar fluoruro --

inhibe también la coagulación, por precipitar calcio; -- sin embargo, puede ocurrir coagulación al cabo de varias horas y es aconsejable usar una mezcla de fluoruro y oxalato, como 2mg. de oxalato potásico y 2,5 mg. de fluoruro sódico por ml. de sangre. Puede analizarse sangre completa o plasma.

REVISION DE METODOS DE DETERMINACION DE GLUCOSA

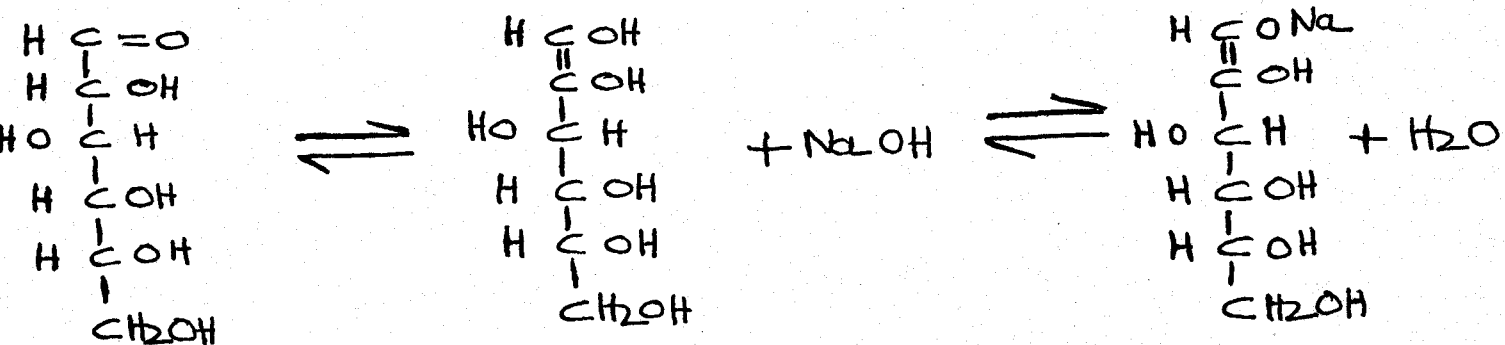
La determinación de la glucosa ha preocupado a los químicos clínicos desde hace más de 100 años. En los primeros tiempos del siglo actual se hicieron los avances más importantes en este sentido. Desde entonces hasta - - aquí ha sido constante la investigación de diversos medios para mejorar la especificidad de las técnicas.

Los métodos se pueden dividir en Métodos Químicos y Métodos Enzimáticos.

METODOS QUIMICOS

METODOS QUE DEPENDEN DEL PODER REDUCTOR DE LA GLUCOSA

En las soluciones de glucosa se hallan en equilibrio las formas ceto y enol. A pH ácido o neutro existen solamente trazas de la forma enolica, dado que esta forma es débilmente ácida, en las soluciones alcalinas se transforma la forma enolica en su correspondiente sal. y/ el equilibrio se desplaza hacia la derecha como sigue:



D- Glucosa

1,2 Eenediol

sal de Eenediol

El enediol que se forma es muy reactivo y fácilmente oxidable, incluso por la acción del oxígeno.

Hay que observar que la glucosa, la fructosa y la manosa forman el mismo enediol y la misma sal de enediol. Tras oxidación de la cadena de carbonos, se rompe ésta con formación de ácidos de cadenas más cortas. La reacción no es estequiométrica. Los productos formados son múltiples y variables, por lo que resulta sorprendente que pueda haber ningún método basado en esta reacción, que tenga valor cuantitativo. La importancia de la oxidación depende del pH de la temperatura, de la concentración salina y de la concentración del oxidante. Los equivalentes reductores de los diferentes azúcares varían para un método dado, de un azúcar a otro; también las relaciones de los equivalentes de reducción entre azúcares varían de una técnica a otra. Sin embargo, estandarizando rigidamente las condiciones se pueden obtener resultados cuantitativos válidos.

- Acido Picrico como Oxidante

El ácido Picrico, en solución alcalina caliente, es reducido a la sal roja del ácido picrírico. Este método fue introducido en 1.913 por Lewis y Benedict (3, 4). Actualmente tiene un interés exclusivamente histórico cayó rápidamente en desuso porque no es específico, ya --

que la creatinina, la acetona y el ácido diacético dan el mismo color.

- Ferricianuro como Oxidante

Los iones amarillos del ferricianuro son reducidos en solución alcalina a iones incoloros de ferrocianuro. El ferrocianuro no se reoxida fácilmente por el aire, lo cual es una de las ventajas del empleo de esta reacción para la determinación de glucosa. La glucosa se ha determinado, utilizando tal reacción de diversas formas:

A) Titulación redox directa: Los filtrados de proteinizados de la sangre se agregan, gota a gota, a ferricianuro alcalino caliente, hasta que desaparece el color amarillo haciéndose la solución incolora.

B) Medida del tiempo necesario para la decoloración de ferricianuro: En esta técnica se utiliza una cantidad de ferricianuro inferior al equivalente de glucosa que se quiere determinar. En tales condiciones el tiempo para la decoloración varía inversamente al logaritmo de la concentración de glucosa.

C) Añadiendo ferricianuro en exceso y midiendo luego el exceso que queda después de la reacción con glucosa: Se determina la glucosa deduciéndole de la diferen-

cia existente en la concentración de ferricianuro antes y después de la reacción, es decir, de la cantidad de ferricianuro gastado en la misma.

- 1.- Titulación yodométrica.
- 2.- Determinación gasométrica.
- 3.- Medida fotométrica del ferricianuro.
- 4.- Titulación con sulfonato sódico de Indigo.

D) Agregando ferricianuro en exceso y determinando el ferricianuro formado en la reacción: Este es un procedimiento más preciso que el de la determinación del ferricianuro gastado en la reacción, ya que la medida del ferrocianuro formado se hace gracias al cálculo de una -- única medida, en tanto que la del ferricianuro consumido/ acarrea el cálculo de la diferencia entre dos medidas.

- 1.- Medida fotométrica de la reacción coloreada del azul de Prusia.
- 2.- Medida fotométrica del molibdeno de ferrocianuro de color amarillo castaño.
- 3.- Medida fotométrica del ferrocianuro de uranilo, de color marrón.
- 4.- Titulación con iones férricos.
- 5.- Titulación manganimétrica.
- 6.- Titulación potenciométrica con Zn^{++} .

E) Medida potenciométrica con un electrodo de ferriferrocianuro.

- Cobre como Oxidante

El Cu^{++} en solución alcalina caliente es reducido a Cu^+ , el cual se combina con OH^- para formar Cu OH de color amarillo. El calor convierte a este Cu OH en Cu_2O , de color rojo, siendo ambos compuestos cuprosos insolubles. Para evitar la precipitación de $\text{Cu}(\text{OH})_2$ ó de Cu CO_3 en el reactivo, se compleja el Cu^{++} mediante citrato o tartrato (sal de Rochelle). Estos complejos solubles, de estructura mal conocida, se disocian suficientemente como para proporcionar un porte continuo de Cu^{++} durante la reacción redox. Los métodos que utilizan el cobre son, en principio, más específicos que los del ferricianuro a causa del inferior potencial de oxidación-reducción del primero. El grado de oxidación de los azúcares por el Cu^{++} , es decir, la sensibilidad del método, y por tanto la especificidad de la reacción, varía inversamente con la alcalinidad del reactivo de cobre.

Si las condiciones de la técnica se controlan/cuidadosamente, el Cu_2O producido es directamente proporcional a la cantidad de glucosa presente. Entre los procedimientos para la determinación de este Cu_2O citaremos -- los siguientes:

1).- Medida del color producido con fosfomolib

dato: La reducción del ácido fosfomolibdico por el Cu_2O - da lugar a la formación de "azul de molibdeno".

Folin y Wu (1,2) introdujeron este reactivo en 1.920 y su método, en el que se emplea también ácido tungstico para la precipitación de las proteínas, es probablemente el que más comunmente se ha utilizado en los Estados Unidos durante las cuatro décadas siguientes. Las modificaciones más conocidas de esta técnica, y también de los reactivos, son las de Folin (5, 7) y Benedict (8, 9), ésta última lograba una gran especificidad añadiendo/ bisulfito y alanina al reactivo de cobre.

2).- Medida del color producido mediante fosfo tungstato (10).

3).- Medida del color producido con arseno molibdato (11): Nelson, en 1.944, utilizó el arseno molibdato, conjuntamente con el reactivo de cobre de Somogyi (a/ este método se le domina comunmente técnica de Nelson-Somogyi).

4).- Medida de color producido por neocuproina (12).

5).- Titulación yodométrica (13, 14).

METODOS BASADOS EN LA FORMACION DE COLOR CON FENOLES EN
SO₄H₂ CONCENTRADO

Cuando la glucosa es calentada con ácido sulfúrico concentrado, es deshidratada y se forma el hidroximetilfurfural, en una cantidad proporcional a la cantidad de glucosa presente.

La base de diversos métodos de este tipo consiste en la medida fotométrica del color producido por condensación del radical aldehído, del hidroximetilfurfural con un compuesto fenólico. Entre los compuestos fenólicos empleados con este fin están el ox-naftol, el resorcinol, el timol, el floroglucionol, el maminofenol y la antrona. La más popular con mucho, de todas estas reacciones, es la que emplea la antrona.

OTROS METODOS

Se ha propuesto la medida fotométrica del color producido con los siguientes reactivos: ácido dinitrosalicílico, fenil hidrazina, ácido cromotrópico y diversas aminas aromáticas como son la anilina, bencidina, 2-aminobifenilo y otoluidina. Esta última se condensa con el grupo aldehído de glucosa y forma una mezcla en equili

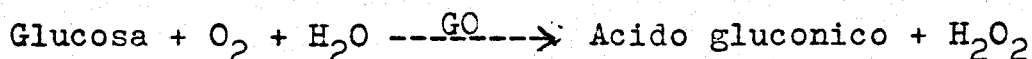
brio de una glucosilamina y la base de Schiff correspondiente. El producto final, de color verde, tiene un máximo de absorción a 630 nm.

METODOS ENZIMATICOS

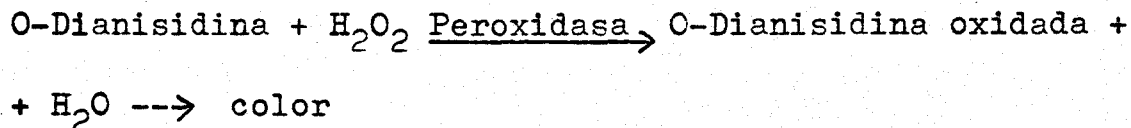
Ninguno de los métodos anteriores son absolutamente específicos para la glucosa. Sin embargo con los métodos enzimáticos puede conseguirse una absoluta exactitud en la determinación.

METODO DE LA GLUCOSA-OXIDASA

La oxidasa de glucosa es un enzima que cataliza la oxidación de glucosa a ácido gluconico y peróxido de hidrógeno.



La introducción de la enzima peroxidasa y un aceptor de oxígeno cromogénico, como o-dianisidina, produce generalmente desarrollo de color.



La oxidasa de glucosa tiene mucha especifici--

dad para la β -D glucosa. La glucosa en solución existe como 36% de la forma α y 64% de la forma β .

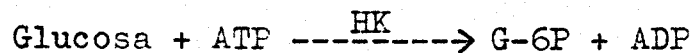
Algunos preparados comerciales de oxidasa de glucosa contienen una enzima MUTARROTASA, que acelera esta reacción.

El segundo paso en que interviene peroxidasa, es menos específico. Varias sustancias, como ácido úrico, ácido ascórbico, bilirrubina y glutatióna, inhiben la reacción, es de presumir que por competir con el cromógeno -- por el peróxido de hidrógeno.

Por esta causa, los resultados obtenidos directamente en suero suelen ser más bajos que los valores de glucosa verdadera. La mayoría de las sustancias que interfieren se eliminan con el uso de un filtrado de cinc de Somogyi.

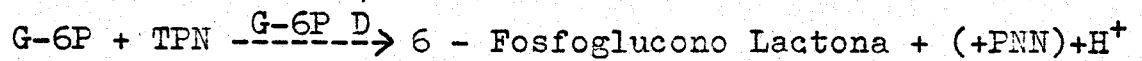
METODO DE LA HEXOKINASA

La glucosa puede ser medida por un doble sistema enzimático usando Hexokinasa y Glucosa -6- Fosfato Deshidrogenasa (G-6PDH). La hexoquinasa cataliza la fosforilación de glucosa por medio del ATP.



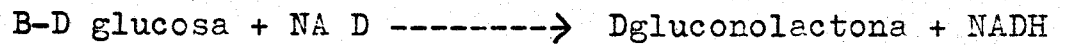
La G-6P es oxidada en presencia de Trifosfopi-

ridin Nucleotido (TPN) por la acción catalítica de G-6PD.



METODO DE LA GLUCOSA DESHIDROGENASA

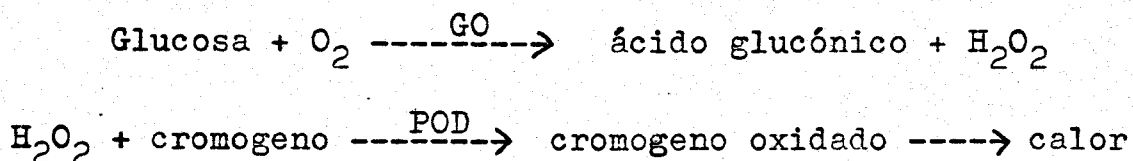
La glucosa - deshidrogenasa, cataliza la oxidación de glucosa según la siguiente ecuación:



La cantidad de NADH formado es proporcional a/ la concentración de glucosa.

INTERFERENCIAS CONOCIDAS DE FARMACOS Y OTRAS
SUBSTANCIAS EN EL ANALISIS BIOLÓGICO DE GLUCOSA (15)

A) METODO DE LA GLUCOSA OXIDASA - PEROXIDASA -
(GO - POD).-



La primera reacción es altamente específica para la glucosa y ha sido adaptada para usarla con electrodos de O_2 . La segunda reacción es menos específica. Cualquier sustancia reductora compite con el cromogeno por el agua oxigenada, o conserva al cromogeno en estado reducido, guiando a bajos resultados. El filtrado de Somogyi es recomendado para eliminar o minimizar interferencias con determinaciones en suero.

Las siguientes sustancias interfieren en los resultados del test, unas aumentando y otras disminuyendo los valores de glucosa.

Las sustancias son precedidas por la notación (+) ó (-) para indicar que la sustancia causa un falso/

aumento o una falsa disminución respectivamente, en la valoración del test.

Las sustancias hasta ahora conocidas por orden alfabético son las siguientes:

- | | |
|---------------------------------|---|
| (-) ACIDO ASCORBICO ----- | compite con el <u>cro</u> mo <u>ge</u> no. |
| (-) BILIRRUBINA ----- | compite con el <u>cro</u> mo <u>ge</u> no. |
| (-) BILIRRUBINA conjugada ----- | inhibe la reacción. |
| (-) FORMALDEHIDO ----- | inhibe la reacción.
Puede ser añadido a la orina como <u>pres</u> er <u>va</u> tivo. |
| (-) GLUTATION ----- | Compite con el <u>cro</u> mo <u>ge</u> no. No se encuentra presente en suero o filtrado de Somogyi de sangre total. |
| (-) ACIDO HOMOGENTISICO ----- | Actúa como una sustancia reductora. |
| (+) HIPOCLORITO ----- | Produce oxidación directa del cromogéno. Puede presentarse como un contaminante procedente de blanqueantes, etc. |
| (-) LEVODOPA ----- | Un metabolito, el ácido 3,4 dihidroxifenil acético (DOPAC), actúa como una sustancia reductora. |
| (+) OXAZEPAM ----- | Actúa como agente <u>re</u> ductor. |

- (-) FENAZOPIRIDINA ----- (Pyridium). La acción es tardía.
- (-) TETRACICLINAS----- Las preparaciones parenterales pueden contener gran cantidad de ácido ascórbico, el cual interfiere.
- (-) ACIDO URICO ----- Compite con el cromógeno.

B) METODO DE LA CRTC-TOLUIDINA.-

La orto-toluidina reacciona con la glucosa en una solución de ácido acético caliente, produciendo un color verde. La reacción es razonablemente específica para determinación de glucosa en suero y en muestras de orina.

- (+) DEXTRANO ----- se produce una turbidez en la solución de ácido acético.
- (+) DISACARIDOS ----- La maltosa y lactosa producen 5 y 33% respectivamente, más color que la glucosa. También se ha observado una producción de color con su crosa posiblemente como resultado de la hidrólisis ácida a monosacárido.
- (-) FORMALDEHIDO ----- Produce un anormal color naranja y reduce la intensidad del color verde generalmente producido por la reacción de la glucosa en la ortoluidina.

- (+) HEXOSAS ----- La galactosa y manosa producen color equivalente a la glucosa. La fructosa no reacciona.
- (+) PENTOSAS ----- Estas producen un color naranja con el reactivo. La reacción ha sido aplicada para medir xilosa en orina.

C) METODO DEL FERRICIANURO.-

El ferricianuro es reducido por la glucosa en una solución alcalina caliente a ferrocianuro incoloro./ El método es seguro aplicado a sueros, pero es insatisfactorio para medidas en orina.

Se han observado aumentos aparentes en valores de glucosa con las siguientes substancias cuando fueron analizadas en soluciones puras.

- (+) GREATININA ----- 1 mg. es equivalente a 1 mg de glucosa.
- (+) ACIDO URICO ----- 1 mg. es equivalente a 0,5 mg. de glucosa.

D) METODO DE LA REDUCCION DEL COBRE.-

En este método interfieren los siguientes fármacos:

- (+) AMINOPIRINA ----- Se produce el glucuronido como metabolito.

- (+) AMINOACIDOS ----- Produce interferencias variables con altas concentraciones.
- (+) P-AMINO SALICYLATO ----- Probablemente excretado como un metabolito, igual al ácido gentisico.
- (+) ACIDO ASCORBICO ----- Positiva el test con concentración de 50 mg/dl.
- (+) CEFALOTINA (KEFLIN) ----- Produce un color marrón oscuro con clinitest tablets.
- (+) HIDRATO DE CLORAL ----- Un metabolito, el tridolactol es excretado como el glucuronido.
- (+) CLORANFENICOL (CLORO MICETINA)
- (+) CLORTETRACICLINA (AUREOMICINA)
- (+) FORMALDEHIDO
- (+) FRUCTOSA
- (+) GLUCOSAMINA
- (+) METABOLITOS GLUCUTONIDOS - Presenta en sangre u orina y actúan como agentes reductores.
- (+) ACIDO HOMOGENTISICO
- (+) INDICAN
- (+) ISONIAZIDA
- (+) LEVODOPA ----- Un metabolito, DOPAC, es un agente reductor.
- (+) METAXOLONA
- (+) ACIDO NALIDIXICO ----- Aparece como glucuronido.

- (+) NEOCINCLOFEN (TOLYSIN)
- (+) DERIVADOS NITROFURANOS --- Los metabolitos actúan co
mo agentes reductores.
- (+) OXAZEPAM
- (+) OXITETRACICLINA (TERRAMICINA)
- (+) PENICILINA ----- El fármaco y los produc--
tos de degradación en al-
tas concentraciones, ac--
túan como agentes reductore
s.
- (+) PROBENECID
- (+) ACUCARES REDUCTORES ----- Fructosa, galactosa, lac-
tosa, maltosa, rhamnosa,-
ribosa y xilosa.
- (+) SACAROIDES ----- En sangre total estas subs-
tancias reductoras son --
principalmente glutatión
y ergotioneina. El aumen-
to de ácido glumronico es
reportado en la sangre de
diabéticos.
- (+) SALICILATOS ----- Un metabolito, el ácido -
gentisico es un agente rere
ductor.
- (+) STREPTOMICINA ----- El fármaco y sus metaboli-
tos son agentes reductores.
- (-) SULFANILAMIDA ----- Forma un complejo CU (II)
soluble e incoloro.
- (+) SULFATIAZOL ----- Forma un complejo de ama-
rillo a naranja en orina/
alcalina.

FARMACOLOGIA DEL "NOLOTIL" (16,17)

=====

El "Nolotil" es un medicamento analgésico.

Los analgésicos son las sustancias que suprimen el dolor. actuando sobre el sistema nervioso central.

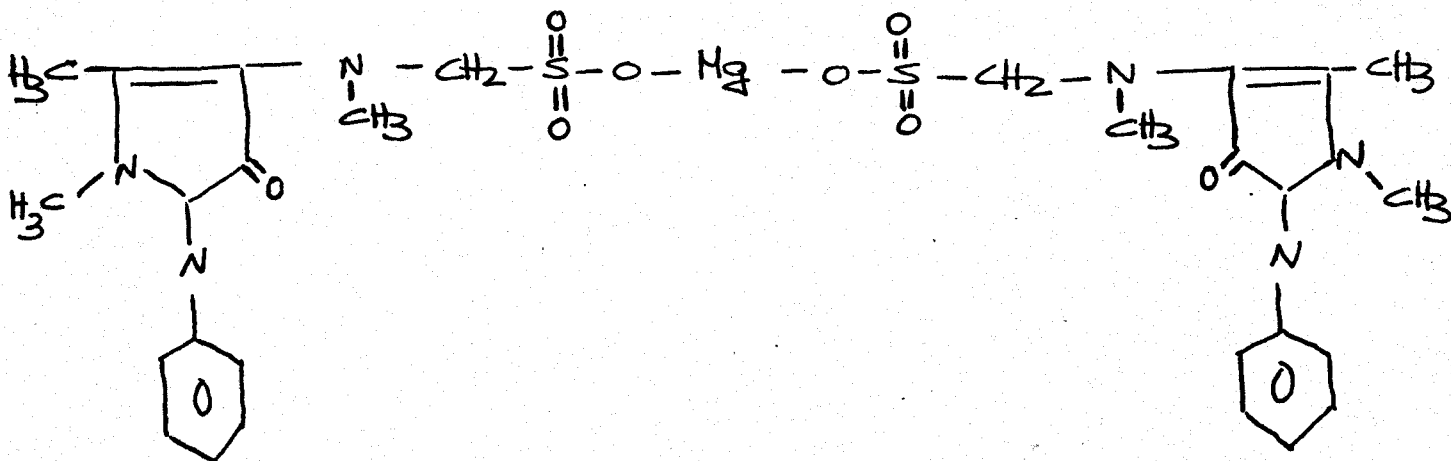
Estas sustancias se pueden dividir en dos grandes grupos terapéuticos:

1º.- Los Hipnoanalgésicos

2º.- Los Termoanalgésicos

El "Nolotil" pertenece al 2º grupo, es decir al de los analgésicos antetérmicos-antiinflamatorios derivados de las pirazolonas,

El "Nolotil" es: Dimetil - Oxiquinazina - Metilena - Metilamino - Sulfato de Magnesio,



Las propiedades farmacológicas más destacadas -
de este compuesto son:

- 1.- Acción analgésica
- 2.- Acción espasmolítica
- 3.- Acción antiinflamatoria
- 4.- Acción antitérmica
- 5.- Acción antiagregante plaquetar

FARMACOCINETICA Y METABOLISMO

- "Nolotil" es soluble en agua a temperatura ambiental, - de tal forma que 1 g, se disuelve rápida y totalmente en/ 1,3 ml. de agua. siendo el ph de máxima y mínima solubilidad 6 y 8 respectivamente.
- Se absorbe bien por plexo sublingual. estómago e intestino delgado. así como por la mucosa rectal, Su vida media es aproximadamente de tres horas. siendo metabolizado por el aparato mitocondrial hepático. Esta vida media depende de la capacidad de acetilación de cada individuo.
- Circula en la sangre ligado en un 15% a las proteínas - plasmáticas y se elimina por riñón en forma de fármaco libre en un 3% y especialmente (el 45%) en forma de metabolitos (sulfoconjugados. glucoronidatos. n - aminoantipirina, n-hidroxiamtipirina, ácido rubazónico).

- Se ha comprobado en virtud de sus características físico-químicas, que atraviesa las barreras hematoencefálica y placentaria.
- Actúa directamente sin metabolizarse en sustancias catabólicas y no deprime los sistemas enzimáticos fisiológicos, como lo hacen por ejemplo. los opiáceos. que inhiben el metabolismo de los carbohidratos.

CRONOLOGÍA DE LA RESPUESTA A "NOLOTIL"				
SEGUN VIA DE APLICACION				
	Vía Oral	Vía Rectal	Intramuscular	Intravenosa
Máximo nivel en sangre	2 hs.	1 h.	30 min.	5 min.
Primer signo de respuesta	1 h.	30 min.	15-20 min.	3-8 min.
Máximo efecto	2-3 hs.	1-2 hs.	30-60 min.	15 min.
Desaparición del efecto	4-6 hs.	6-8 hs.	8-12 hs.	8-12 hs.

CAMPO DE APLICACION DEL "NOLOTIL"

EL "Nolotil" tiene un amplio campo de aplicación que llega a todas las especialidades médicas clínicas.

Así se emplea en: anestesiología, cirugía, odontología, cirugía maxilofacial, angiocardiólogía, hematología, gastroenterología, neumología, neurología, oncología ortopedia y traumatología, reumatología, otorrinolaringología, oftalmología, nefrourología, pediatría, ginecología, obstetrina y pociología, etc.

PROSOLOGIA Y VIAS DE ADMINISTRACION

La dosis media habitual es variable, de acuerdo con la intensidad y duración del proceso doloroso, así como a la edad del paciente y condición del mismo.

En adultos la dosis varía entre 1 a 8 g. al día.

En niños pequeños, ésta será de 0,5 a 2 g. al día.

Se puede utilizar cualquier vía: parenteral (intravenosa o intramuscular), oral y rectal, de acuerdo con el tipo e intensidad del dolor, practicabilidad de estas vías o necesidad de efectos precoces o más duraderos.

PRESENTACION

NOLOTIL CAPSULAS

NOLOTIL INYECTABLE

NOLOTIL SUPOSITORIOS: adulto e infantil

En este trabajo experimental, se ha utilizado -
"Nolotil" inyectable.

Cada ampolla contiene: Dimetil - oxiquinazina -
metilena - metilaminosulfonatodi magnesio 2 g.

Excipiente C.S.P. 5 ml.

INTERFERENCIA DEL "NOLOTIL".

"Nolotil" hasta ahora no se conocía que interfiriera en los resultados de análisis biológicos, utilizando como muestra la sangre u orina de pacientes que estén recibiendo el fármaco.

El presente trabajo trata de explicar los resultados experimentales obtenidos en diversos métodos de determinación de glucosa en los cuales se ha puesto "Nolotil".

El motivo de esta tesina ha sido a través de una observación hecha en enfermos que habían sido tratados con "Nolotil" y a los cuales el análisis de glucemia no concordaba con resultados lógicos.

Dada la importancia de la determinación de glucosa en líquidos biológicos, señalada anteriormente por la gran incidencia de diabéticos, creo que es un problema sanitario para tener en cuenta, dado también que el "Nolotil" es un fármaco muy utilizado tanto en el ámbito interhospitalario como extrahospitalario, por el gran campo de aplicación que abarca.

M A T E R I A L Y M E T O D C S
=====

M A T E R I A L Y M E T O D O S

=====

Los resultados experimentales han sido obtenidos con equipos de determinación de glucosa de varias casas comerciales.

Se han empleado 1 método químico, el de la Orto-Toluidina y varios métodos enzimáticos.

METODO QUIMICO: O-TOLUIDINA

- Método de DUBOWSKI MODIFICADO (18, 19)

Fundamento:

La glucosa directamente del suero o en un filtrado libre de proteindas, al calentar con otro toluidina en ácido acético glacial produce color verde que es estable a temperatura ambiental y se mide colorimétricamente.

Técnica:

Se preparan diversos tubos; en cada tubo se pone 0,1 ml. de la muestra problema. También se prepara un blanco con 0,1 ml. de H₂O destilada y un control con 0,1 ml. de control.

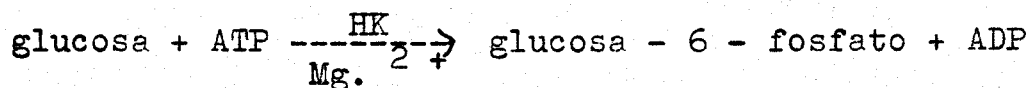
Se añade a todos los tubos 5 ml. de reactivo de orto-toluidina y se mezcla. Se sumergen todos los tubos/ en un baño de agua a 100° C durante 7,5 minutos exactamente. Se sacan del baño y se sumergen en un baño de hielo hasta alcanzar la temperatura ambiente. Se mide la densidad óptica o el porcentaje de transmisión de cada uno de los tubos a 630 nm.

METODOS ENZIMATICOS

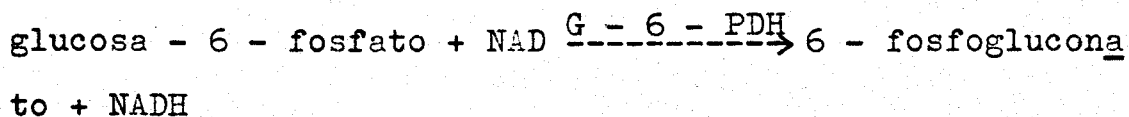
- Método de la HEXOQUINASA-GLUCOSA-6 FOSFATO DESHIDROGENASA (20 - 22)

Fundamento:

La hexoquinasa (HK) cataliza la fosforilación/ de la glucosa del suero por medio de la adenosin - trifosfato (ATP).



A continuación la glucosa - 6 - fosfato se oxida por medio del NAD en presencia de glucosa - 6 - fosfato deshidrogenasa (6 - 6 - PDH)



Ambas reacciones se efectúan estequiométrica--
mente y cuantitativamente. El NADH producido se determi--
na fotométricamente a 340 nm.

Reactivos:

Los reactivos HICEL de glucosa UV constan de -
una pastilla y de líquido diluyente.

Para cada muestra que se tenga que analizar se
disuelve una pastilla de glucosa en 2 ml. de diluyente.

Como se van a efectuar varios análisis, se di--
solverán tantas pastillas como número de análisis tengan
que efectuarse, en 2N ml. de diluyente, siendo N el núme--
ro de pastillas y tomando 2,1 ml. de la solución resul--
tante.

Técnica:

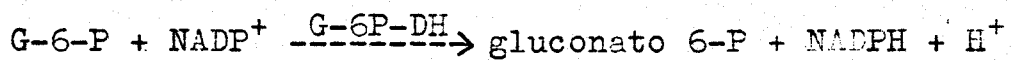
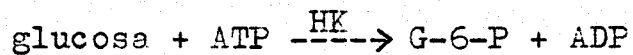
Se preparan diversos tubos; en cada tubo se po--
ne 0,1 ml. de la muestra problema. También se prepara un
blanco con 0,1 ml. de H₂O destilado y un control con 0,1
ml. de control.

Se añade a todos los tubos 2,1 ml. de reactivo
y se mezcla. Se incuban durante 5 minutos a 37°C y se --
lee a 340 nm.

	BLANCO	CONTROL	PROBLEMAS
	0,1 ml. H ₂ O destilada		
		0,1 ml. de control	0,1 ml. de glucosa 100mg/ /100 ml.
REACTIVO	2,1 ml.	2,1 ml.	2,1 ml.

- Método de la HEXOCINASA.- TEST UV (23)

Fundamento del test:



Este método utiliza como coenzima el NADP, a diferencia del anterior que utiliza el NAD.

Técnica:

Pipetear en una cubeta	
Solución 1 (Tampón)	2,50 ml.
Solución de glucosa (100 mg./100ml.)	0,20 ml.
Solución 2 (NADP)	0,10 ml.
Solución 3 (ATP)	0,10 ml.
Mezclar con espátula de plástico y medir la extinción. E1	
Suspensión 4 HK G6P - DH	0,20 ml.
Mezclar y esperar la parada de la reacción y medir. E2	

- Determinación cuantitativa colorimétrica de la glucosa por el Método enzimático HK/G-6-P-DH Micrometado

Fundamento:

Glucose oxidase es un método colorimétrico cuantitativo para la determinación de la glucosa en la sangre. La conversión de glucosa en ácido 6-fosfogluconico por enzimas específicos; HK y G-6-PDH, y la producción de NADPH es una reacción absolutamente específica de este constituyente. La coloración final en la zona del espectro visible es posible por la conjugación del coenzima generado NADPH con el sistema "redox" PMS - INT (meta sulfato de fenacina-cloruro de 2p - iodofenil - 3 - p - nitrofenil - 5 - finil-tetrazolio).

Reactivos:

- 1.- Reactivo enzimático tamponado (ATP, HK, Mg^{++} G-6-PD y NADP). Reconstruir un vial con 10 ml. de agua destilada.
- 2.- Reactivo de color (PMS y INT).
- 3.- CL H 0,1 N.

El reactivo enzimático tamponado se reconstituye directamente con 2ml. de reactivo de color y 8 ml. de agua destilada.

Técnica Simplificada:

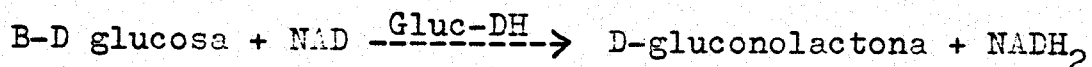
	Blanco	Standard
Combinación de reactivo enzimático y reactivo - de color.	1 ml.	1 ml.
B M a 37° C 3-4 minutos		
Solución de glucosa -- 100 mg.	--	0,02
Mezclar, dejar 10 minutos		
CL H 0,1 N	5 ml.	5 ml.

Retirar los tubos del b.m. Leer 520 nm. frente a blanco de reactivos.

- Método de la GLUCOSA DESHIDROGENASA, PRUEBA UV (24,25)

- Fundamento:

La glucosa - deshidrogenasa (GLUC-DH) cataliza la oxidación de glucosa según la siguiente ecuación:



La adición de mutarrotasa acelera la reacción. la cantidad de NADH_2 formado es proporcional a la concentración de glucosa.

Reactivos:

- 1.- Desproteinizante.
- 2.- Tampón.
- 3.- NAD.
- 4.- Mezcla de enzimas.

Técnica:

Para cada serie de análisis se prepara un blanco de reactivos.

Pipetear en tubos de centrifugar		
	Problema	Blanco de reactivos
Desproteinizante (1)	1,0 ml.	---
Muestra	0,1 ml.	---
Mezclar, centrifugar, pipetear en tubos de ensayo o cubetas		
Sobrenadante exento de proteínas	0,2 ml.	---
Solución reactiva (4)	2,0 ml.	2,0 ml.
Desproteinizante (1)	---	0,2 ml.
Mezclar y al cabo de 7 a 17 minutos, medir los problemas frente al blanco de reactivos.		

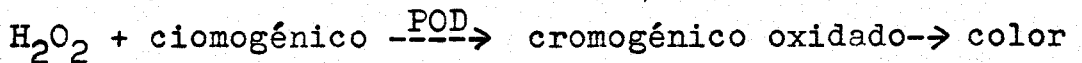
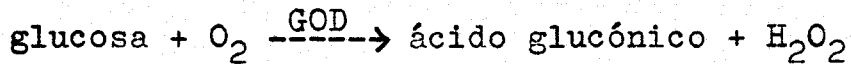
Longitud de onda: 340 nm. ó 365 nm.

- Método de la GLUCOSA - OXIDASA

Fundamento:

La B - D glucosa es transformada cuantitativamente por el enzima glucosa oxidasa (GLD) en ácido glucónico. El agua oxigenada que se forma en igual cantidad reacciona en presencia del enzima peroxidasa (POD) con el cromogénico L₁ - amino fenazonfenol (PAD), formando un derivado quinónico rojo cuya intensidad de color es proporcional a la cantidad de B - D glucosa presente en la muestra de sangre.

Reacciones:



Técnica:

	Blanco	Standard	Problema
Muestra	---	---	0,2 ml.
Glucosa Standard 100 mg/100 ml.	---	0,2 ml.	---
H ₂ O destilada	0,2 ml.	0,2 ml.	---
Reactivo cromogénico	2,5 ml.	2,5 ml.	2,5 ml.

Determinación de Glucosa.- AUTOANALIZADOR BECKMAN

- Método de la Glucosa OXIDASA

Fundamento:

Consiste en medir el consumo de oxígeno (disminución de la presión parcial) a medida que transcurre la reacción, mediante el empleo de un electrodo selectivo de oxígeno.

Los equipos comerciales para la determinación de glucosa han sido suministrados por los siguientes laboratorios: Boehringer, Elvi, Harleco, Hycel, Merck y -- Substancia.

Las determinaciones espectrofotométricas se -- han realizado en un espectrofotómetro UV - V SHIMAZU, -- utilizando cubetas de 1 cm. de paso de luz.

Todos los reactivos utilizados han sido de grado analítico y agua bidestilada.

RESULTADOS Y DISCUSION
=====

T A B L A I
=====

INTERFERENCIA DEL "NOLOTIL" EN LA DETERMINACION DE
GLUCOSA POR EL METODO DE LA O-TOLUIDINA

ADICION	ABSORBANCIA 630 nm.	CONCENTRACION DE GLUCOSA (mg. %)
Ninguna	0,330	100
Nolotil	---	0
" 1/10	0,020	6
" 1/100	0,170	51,5
" 1/1000	0,296	89,6

El experimento se ha realizado añadiendo 0,1 ml de Nolotil (400 mg/ml), a las diluciones acuosas indicados, a la mezcla de la reacción. La determinación de glucosa (100 mg%) se ha realizado según se describe en material y métodos.

T A B L A I I
=====

INTERFERENCIA DEL "NOLOTIL" EN LA DETERMINACION DE LA
HEXOQUINASA - GLUCOSA - 6 FOSFATO DESHIDROGENASA --
(Equipo HYCEL)

ADICION	ABSORBANCIA 340 nm.	CONCENTRACION DE GLUCOSA (mg. %)
Ninguna	1,573	100
Nolotil	1,077	68,4
" 1/10	1,517	96,4
" 1/100	1,559	99,1
" 1/1000	1,571	99,8

El experimento se ha realizado añadiendo 0,1 ml de Nolotil (400 mg/ml), a las diluciones acuosas indicadas, a la mezcla de reacción. La determinación de glucosa (100 mg%) se ha realizado según se describe en material y métodos,

T A B L A I I I

=====

INTERFERENCIA DEL "NOLOTIL" EN LA DETERMINACION DE GLUCOSA
 POR EL METODO DE LA HEXOCINASA (Equipo BOENRINGER)

ADICION	ABSORBANCIA 340 nm.	CONCENTRACION DE GLUCOSA (mg. %)
Ninguna	1,143	100
Nolotil	0,137	11,9
" 1/10	1,159	101,3
" 1/100	1,197	104,7
" 1/1000	1,247	109

El experimento se ha realizado añadiendo 0,1 ml de Nolotil (400 mg/ml), a las diluciones acuosas indicadas, a la mezcla de la reacción. La determinación de glucosa (100 mg%) se ha realizado según se describe en material y métodos.

T A B L A I V

=====

INTERFERENCIA DEL "NOLOTIL" EN LA DETERMINACION DE GLUCOSA
 POR EL METODO ENZIMATICO HK/G-6-P-DH (Equipo SUBSTANCIA)

ADICION	ABSORBANCIA 520 nm.	CONCENTRACION DE GLUCOSA (mg. %)
Ninguna	0,309	100
Nolotil	0,996	322,3
" 1/10	1,082	350
" 1/100	0,821	265,6
" 1/1000	0,452	146,2

El experimento se ha realizado añadiendo 0,1 ml de Nolotil (400 mg/ml), a las diluciones acuosas indicadas, a la mezcla de la reacción. La determinación de glucosa (100 mg%) se ha realizado según se describe en material y métodos.

*T A B L A V
=====

INTERFERENCIA DEL "NOLOTIL" EN LA DETERMINACION DE GLUCOSA
POR EL METODO DE LA GLUCOSA DESHIDROGENASA

ADICION	ABSORBANCIA 340 nm.	CONCENTRACION DE GLUCOSA (mg. %)
Ninguna	0,52	100
Nolotil	1,75	336,5
" 1/10	1	192,3
" 1/100	0,82	157

El experimento se ha realizado añadiendo 0,1 ml de Nolotil (400 mg/ml), a las diluciones acuosas indicadas, a la mezcla de la reacción, La determinación de glucosa (100 mg%) se ha realizado según se describe en material y métodos.

T A B L A V I
=====

INTERFERENCIA DEL "NOLOTIL" EN LA DETERMINACION DE GLUCOSA
POR EL METODO DE LA GLUCOSA OXIDASA (Equipo ELVI)

ADICION	ABSORBANCIA	CONCENTRACION DE GLUCOSA (mg. %)
Ninguna	0,176	100
Nolotil 1/10	0,01	5,68
" 1/50	0,054	30,6
" 1/100	0,077	43,7
" 1/250	0,113	64,2
" 1/500	0,141	80,1
" 1/1000	0,147	83,5

El experimento se ha realizado añadiendo 0,1 ml de Nolotil (400 mg/ml), a las diluciones acuosas indicadas, a la mezcla de la reacción. La determinación de glucosa (100 mg %) se ha realizado según se describe en material y métodos.

T A B L A V I I

=====

INTERFERENCIA DEL "NOLOTIL" EN LA DETERMINACION DE GLUCOSA
 POR EL METODO DE LA GLUCOSA OXIDASA CON AUTOANALIZADOR BECKMAN

ADICION	CONCENTRACION DE GLUCOSA RELATIVA %
Ninguna	100
Nolotil	0
" 1/10	86
" 1/100	97,2
" 1/1000	98,6

El experimento se ha realizado añadiendo 0,1 ml de Nolotil (400 mg/ml), a las diluciones acuosas indicadas, a la mezcla de la reacción. La determinación de glucosa (150 mg %) se ha realizado según se describe en material y métodos.

T A B L A V I I I

=====

EFECTO REDUCTOR DEL "NOLOTIL" SOBRE EL NAD

ADICION	ABSORBANCIA 340 nm.
Ninguna	0,650
Nolotil	1,050

El experimento se ha realizado añadiendo 0,1 ml de Nolotil (400 mg/ml) a una disolución acuosa de NAD y midiendo, posteriormente (25 minutos) la absorbancia a 340 nm.

T A B L A I X
=====

EFECTO REDUCTOR DEL "NOLOTIL" SOBRE EL NADP

ADICION	ABSORBANCIA 340 nm.
Ninguna	0,450
Nolotil	0,720

El experimento se ha realizado añadiendo 0,1 ml de Nolotil (400 mg/ml) a una disolución acuosa de NADP - y midiendo posteriormente (25 minutos) la absorbancia a 340 nm.

T A B L A X
=====

EFEECTO REDUCTOR DEL "NOLOTIL" SOBRE EL SISTEMA METASULFATO DE FERNACINA - CLORURO DE 2 P-IODOFENIL-3 P-NITROFENIL-TE TRAZOLIO

ADICION	ABSORBANCIA 520 nm.
Ninguna	0,025
Nolotil	0,200

El experimento se ha realizado añadiendo 0,1 ml de Nolotil (400 mg/ml) a una disolución acuosa de PMS-INT y midiendo, posteriormente la absorbancia a 520 nm.

T A B L A X I
=====

EFECTO REDUCTOR DEL "NOLOTIL" SOBRE EL ACIDO PICRICO

ADICION	ABSORBANCIA 510 nm.
Ninguna	0,020
Nolotil	0,515

El experimento se ha realizado añadiendo 0,1 ml de Nolotil (400 mg/ml) a una disolución alcalina (NaOH - al 10%) de ácido picrico y midiendo, posteriormente la absorbancia a 510 nm.

R E S U L T A D O S Y D I S C U S I O N

= = = = =

Los resultados recogidos en el presente trabajo ponen de manifiesto que el Nolotil produce in vitro - una fuerte interferencia en los métodos ensayados de determinación de glucosa. Esta interferencia afecta, como veremos posteriormente, tanto a los métodos químicos - - (o-toluidina), como a los métodos enzimáticos (glucosa--oxidasa, hexoquinasa, glucosa-deshidrogenasa, etc.), así como, a los métodos automatizados (autoanalizador de flujo discontinuo de electrodo selectivo de oxígeno, tipo Beckman).

A este respecto, creemos que la interferencia/ in vitro puede ser de gran importancia in vivo debido al hecho comprobado que en las grandes instituciones hospitalarias se presentan con cierta frecuencia resultados - anormales con relación a la determinación de glucosa de muestras biológicas (sangre preferentemente). Estas anomalías se traducen en algunas ocasiones en obtener las llamadas "glucosa-cero", es decir, resultados totalmente extraños e imputables, por tanto, a interferencias de tipo químico o farmacológico. Nuestra observación nos llevó a

relacionar estos resultados disconformes con la administración de Nolotil, razón por la cual hemos creído de interés abordar este estudio.

Como puede apreciarse de los resultados de la TABLA I, el Nolotil inhibe fuertemente el desarrollo de color, cuando la glucosa se determina por el método de la o-toluidina. Esta inhibición es tanto más fuerte cuanto más alta es la concentración de Nolotil en la mezcla de la reacción. El método de la o-toluidina se basa, como ya ha sido analizado, en la condensación de los aldoozúcares (de carácter reductor) con el reactivo en medio acético, para dar una coloración estable y proporcional a la concentración del azúcar. Puesto que los aldoozúcares son reductores y el Nolotil, según nuestra hipótesis de trabajo, también lo es, puede establecerse una interferencia de tipo químico al formarse un derivado de reducción de la o-toluidina.

La interacción del Nolotil en la determinación de glucosa por el método enzimático de la hexoquinasa -- (sistema de la hexoquinasa - glucosa - 6 - P - deshidrogenasa) se presenta en las TABLAS II, III y IV. Para este estudio se han empleado tres tipos de reactivos equivalentes a otras tantas casas comerciales, "Hycel" (TABLA II), "Boehringer" (TABLA III) que miden el incremento

to de absorberencia a 340 nm., como consecuencia de la reducci3n del NAD a NADH y "Substancia" (TABLA IV), que incluye un crom3geno para efectuar la lectura espectrofotom3trica en el visible. Como se puede apreciar en los tres casos, se presenta una seria interferencia, si bien no siguen el mismo patr3n. La que consideramos m3s significativa es la que se produce cuando se usa el equipo de reactivos de los laboratorios "Substancia", que como se puede apreciar manifiesta una fuerte interferencia de tipo positivo, es decir, en presencia de Nolotil se obtiene una concentraci3n de glucosa mayor que la real. La explicaci3n de este hecho la basamos en el car3cter reductor del Nolotil, capaz, como veremos m3s adelante, de reducir el crom3geno empleado en la reacci3n, el sistema PMS-INT (metasulfato de fenacina - cloruro de 2 P-iodofenil - 3 - p-nitrofenil - 5 - fenil-tetrazolio). No obstante, cuando se usan otros equipos reactivos ("Hycel" y "Boehringer") los resultados, en lo que se refiere a la interferencia producida por el Nolotil, son menos definidos e incluso de car3cter opuesto. La explicaci3n a este fen3meno no es f3cil, pues aun cuando el Nolotil es capaz de reducir las formas oxidadas de los piridin-nucle3tidos-NAD y NADP-(v3ase las tablas VIII y IX), sin embargo, no observamos este hecho en el sistema de reacci3n completo de determinaci3n de glucosa, como ser3a de esperar (ver tablas II y III). Quiz3s la explicaci3n debamos bus

carla en el tiempo relativamente largo (25 minutos) que el Nolotil requiere para reducir a los piridin-nucleótidos. Asimismo, hemos puesto de manifiesto que el Nolotil interfiere la analítica de glucosa, al usar la glucosa - deshidrogenasa como reactivo analítico (TABLA V). En este caso se encuentra que la interferencia es de tipo positivo, o sea, mayor concentración de glucosa en relación con el correspondiente patrón. Como el fundamento de la prueba consiste en una deshidrogenación de la glucosa para producir NADH, el Nolotil interfiere por su acción reductora sobre el NAD.

Entre los reactivos más universalmente empleados para la determinación de la glucemia se encuentra la glucosa-oxidasa; reactivo que también se ve afectado por la acción del Nolotil (TABLA VI). En este caso, la interferencia es de tipo inhibitoria, por lo que se sugiere que el Nolotil es capaz de reducir al agua oxigenada - - (producto de la reacción), cuya presencia es fundamental para oxidar, posteriormente al cromógeno característico/ de la reacción completa. Por consiguiente, al reducirse/ el $H_2 O_2$ en presencia de Nolotil no tiene lugar la reacción y por eso la concentración calculada de glucosa es/ sensiblemente inferior a la real.

La TABLA VII indica la interferencia del Nolo-- til en la determinación de glucosa por el método semiauto

mático Beckman con electrodo selectivo de oxígeno. De estos resultados se sugiere que el Nolotil, de carácter -- fuertemente reductor, es capaz de interferir con el oxígeno, sustrayéndolo del medio reaccionante y evitando -- así el desarrollo normal de la reacción.

De los resultados anteriormente expuestos se -- desprende que el Nolotil interfiere en alto grado en la analítica de glucosa, cualquiera que sea el método empleado. Para intentar explicar el mecanismo básico de este fenómeno, nos basamos en el hecho de considerar al Nolotil como un agente reductor, por lo que el mecanismo -- de estas interferencias sería de carácter óxido-reductor.

Para evidenciar esta hipótesis se han realizado los experimentos recogidos en las TABLAS VIII a XI.

Las TABLAS VIII y IX nos presentan el carácter reductor de Nolotil frente a los piridin-nucleótidos -- (NAD y NADP). Como puede apreciarse la absorbencia de -- los piridin-nucleótidos oxidados medida a 340 nm. aumenta sustancialmente en presencia de Nolotil, prueba inequívoca de su reducción por este fármaco.

Por otra parte, en la TABLA X se pone de manifiesto el poder reductor del Nolotil frente al cromógeno PMS-INT, como corresponde al aumento de absorbencia que/

se observa, en presencia de Nolotil, a 520 nm. Resultados similares se obtienen usando el ácido pícrico como oxidante (TABLA XI).

Asímismo, se han ensayado otros oxidantes tales como el ferricianuro, las sales de Cu^{++} , etc., obteniéndose en todos los casos, unos resultados que hablan claramente del poder reductor del Nolotil.

Así pues, de los resultados presentados en el trabajo parece deducirse que la interferencia producida por el Nolotil es de tipo inespecífico (independiente -- del reactivo empleado) y, aparentemente, por un mecanismo físico-químico de carácter redox al comportarse el -- fármaco como un sistema reductor.

En un posterior estudio será observado el análisis del carácter reductor del Nolotil, con el cálculo de su potencial redox, así como, el estudio detallado de otros posibles interferencias del Nolotil en otros análisis del campo de la Bioquímica Clínica.

CONCLUSIONES
=====

C O N C L U S I O N E S

= = = = =

1a.- El Nolotil interfiere en todos los métodos ensayados de determinación de glucosa.

2a.- La interferencia es de tipo inespecífico, es decir, independiente del reactivo empleado.

3a.- El mecanismo de la interferencia es, aparentemente, de tipo redox, al comportarse el Nolotil como un agente reductor.

4a.- Se ha observado que in vivo, es decir, en individuos a los que se ha inyectado Nolotil los datos de glucemia son anormales.

B I B L I O G R A F I A

=====

B I B L I O G R A F I A
=====

- 1.- Folin, O. y Wu, H.: J. Biol. Chem., 38 , 81, 1919.
- 2.- Folin, O. y Wu, H.: J. Biol. Chem., 41 , 367, 1920.
- 3.- Lewis, R.C. y Benedict, S.R.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 11 , 57, 1913.
- 4.- Lewis, R.C. y Benedict, S.R.: J. Biol. Chem., 20, 61, 1915.
- 5.- Folin, O.: J. Biol. Chem., 67 , 357, 1926.
- 6.- Folin, O.: J. Biol. Chem., 82 , 83, 1929.
- 7.- Folin, O. y Svedberg, A.: J. Biol. Chem., 70 , 405, 1926.-
- 8.- Benedict, S.R.: J. Biol. Chem., 76 , 457, 1928.
- 9.- Benedict, S.R.: J. Biol. Chem., 92 , 141, 1931.
- 10.-Benedict, S.R.: J. Biol. Chem., 64 , 207, 1925.
- 11.-Nelson, N.: J. Biol. Chem., 153 , 375, 1944.
- 12.-Brown, M.E.: Diabetes, 10 , 60, 1961.
- 13.-Murray, M.M.: Biochem. J., 18 , 852, 1924.
- 14.-Murray, M.M.: Biochem. J., 19 , 294, 1925.
- 15.- Caraway, W.T. y Kanmeyer C.V.: Clin. Chim Acta., 41, 395, (1972).

- 16.- Nolotil (Revisión Monográfica), Europharma. Madrid 1978.
- 17.- Litter, M.: Farmacología, El Ateneo, Buenos Aires, 1975.
- 18.- Dubowski, K. M.; Clin. Chem., 8 , 215, 1962.
- 19.- Dubowski, K. M.: Clin. Chem., 8 , 592, 1962.
- 20.- Wright, W. R. , Rainwater, J.C. and Tolle, L.D.: - Clin. Chem., 17 , 1010, 1971.
- 21.- Dippe, S. and Jones, R.: Clin. Res., 20 , 237, 1972.
- 22.- Powell, J.B. and Djuh, Y. Y.: Am. J. Clin. Pathol; 56 , 8, 1971.
- 23.- Schmidt, F.H.: Klin. Wschr., 39 , 1961.
- 24.- Banauch, D. , Brummer, W. , Ebeliug, W., Metz, W., Riudfrey, W., Laug, W., Leybold, K. y Rick, W.: Z. Klin. Chem. Klin. Biochem., 13 , 101, 1975.
- 25.- Clucose Analyzer (Operatiug Manual), Beckman Instruments, CALIFORNIA., 1973.