



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

MICROTECNICA DIRECTA PARA LA DETERMINACION

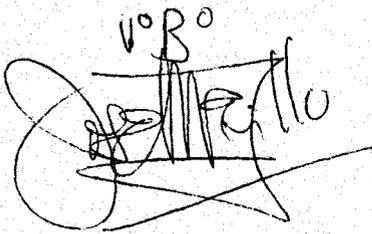
DE ACIDO URICO EN FLUIDOS BIOLÓGICOS

Sevilla, Septiembre de 1980

MICROTECNICA DIRECTA PARA LA DETERMINACION

DE ACIDO URICO EN FLUIDOS BIOLÓGICOS

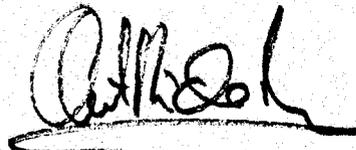
EL CATEDRÁTICO:

^{vº Bº}


PROF. Dr. D. J.M. Trillo de Leyva

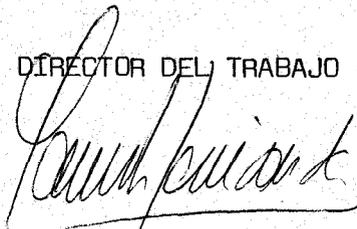
Trabajo presentado como tesina

por Antonio Rider Pérez para aspirar
al grado de Licenciatura en Farmacia.



Fdo: Antonio Rider Pérez

EL DIRECTOR DEL TRABAJO



Fdo: Camilo Fernandez Espina

Sevilla, Septiembre de 1980



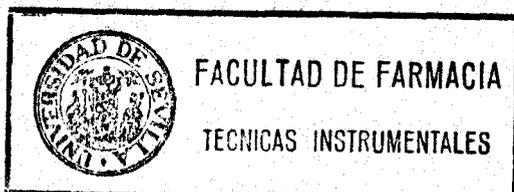
UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA
TECNICAS INSTRUMENTALES
SEVILLA (ESPAÑA)

D. CAMILO FERNANDEZ ESPINA, Profesor Agregado Interino de Técnicas Instrumentales de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICO:

Que D. ANTONIO RIDER PEREZ, ha realizado bajo mi dirección un trabajo de investigación bajo el Título: "Microtecnica directa para la determinación de ácido úrico en fluidos biológicos", y que dicho trabajo reúne todas las condiciones científicas para optar por el Grado de Licenciatura.

Sevilla, Septiembre de 1.980



EL DIRECTOR

Quiero hacer constar mi agradecimiento al Profesor Dr. D. José Maria Trillo, Catedrático Director del Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Sevilla por su gentileza en apadrinar esta tesina.

Igualmente mi mas sincero agradecimiento al Dr. D. Camilo Fernandez Espina por su dirección, su constante apoyo y entrega en la realización del presente trabajo.

A mi compañero de trabajo, Rafael Candau Garcia por su gran aportación de ideas, su desinteresada ayuda y apoyo en la elaboración del trabajo.

INDICE

	<u>Pag.</u>
I. OBJETO	1
II. INTRODUCCION.....	3
1. Impotancia fisiopatológica de la determinación de ácido úrico	4
2. Antecedentes bibliográficos de los métodos analíticos empleados en la determinación de ácido úrico	14
III. PARTE EXPERIMENTAL	18
1. Instrumental.....	19
2. Condiciones de trabajo.....	20
2.1. Reactivos.....	20
2.2. Procedimiento.....	23
IV. RESULTADOS EXPERIMENTALES.....	25
1. Concentración del ácido fosfotúngstico en la mezcla cromógena.....	26
1.1. Efectos de la concentración del ácido fosfotúngstico en la sensibilidad y desa- rrollo del color	26
1.2. Efectos de la concentración del ácido fosfo túngstico en la sensibilidad y pH de la mez	

cla final de la reacción..... 32

2. Concentración del detergente en la mezcla cromógena... 38

3. Concentración del Tampón..... 40

 3.1. Efectos de las distintas concentraciones
 del tampón en la sensibilidad de la reacción.. 40

 3.2. Efectos de la concentración del tampón en
 el pH y sensibilidad del ensayo..... 57

V. CARACTERISTICAS DEL METODO 61

 1. Espectro del cromóforo..... 62

 2. Desarrollo y Estabilidad del color..... 64

 3. Lineabilidad 64

 4. Precisión 70

 5. Exactitud..... 77

 6. Interferencias 82

 6.1. Anticoagulantes..... 82

 6.2. Hemolisis..... 85

 6.3. Proteínas..... 88

	<u>Pag.</u>
6.4. Glucosa.....	88
VI. DISCUSION DE LOS RESULTADOS.....	91
VII. CONCLUSIONES.....	96
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	99

I. OBJETO

Hasta ahora los metodos colorimétricos empleados en la determinación de ácido úrico se basan en que el ácido úrico en solución alcalina reduce el ácido fosfowolfrámico a un colorante azul con la necesaria precipitación de las proteínas de la muestra. Esta desproteínización exige el empleo de dos reactivos más la centrifugación y el decantado del sobrenadante, operaciones que complican y encarecen la determinación de este parámetro en los laboratorios clínicos.

Por tanto, el objeto de nuestro trabajo ha sido el estudio y puesta a punto de una nueva técnica analítica que basándose en la clásica reacción de FOLIN y DENIS (1912) evita la desproteínización previa con lo que la dosificación de ácido úrico en medios biológicos se simplifica sin afectar la calidad de los resultados analíticos.

II. INTRODUCCION

II.1. IMPORTANCIA FISIOPATOLOGICA DE LA DETERMINACION DE

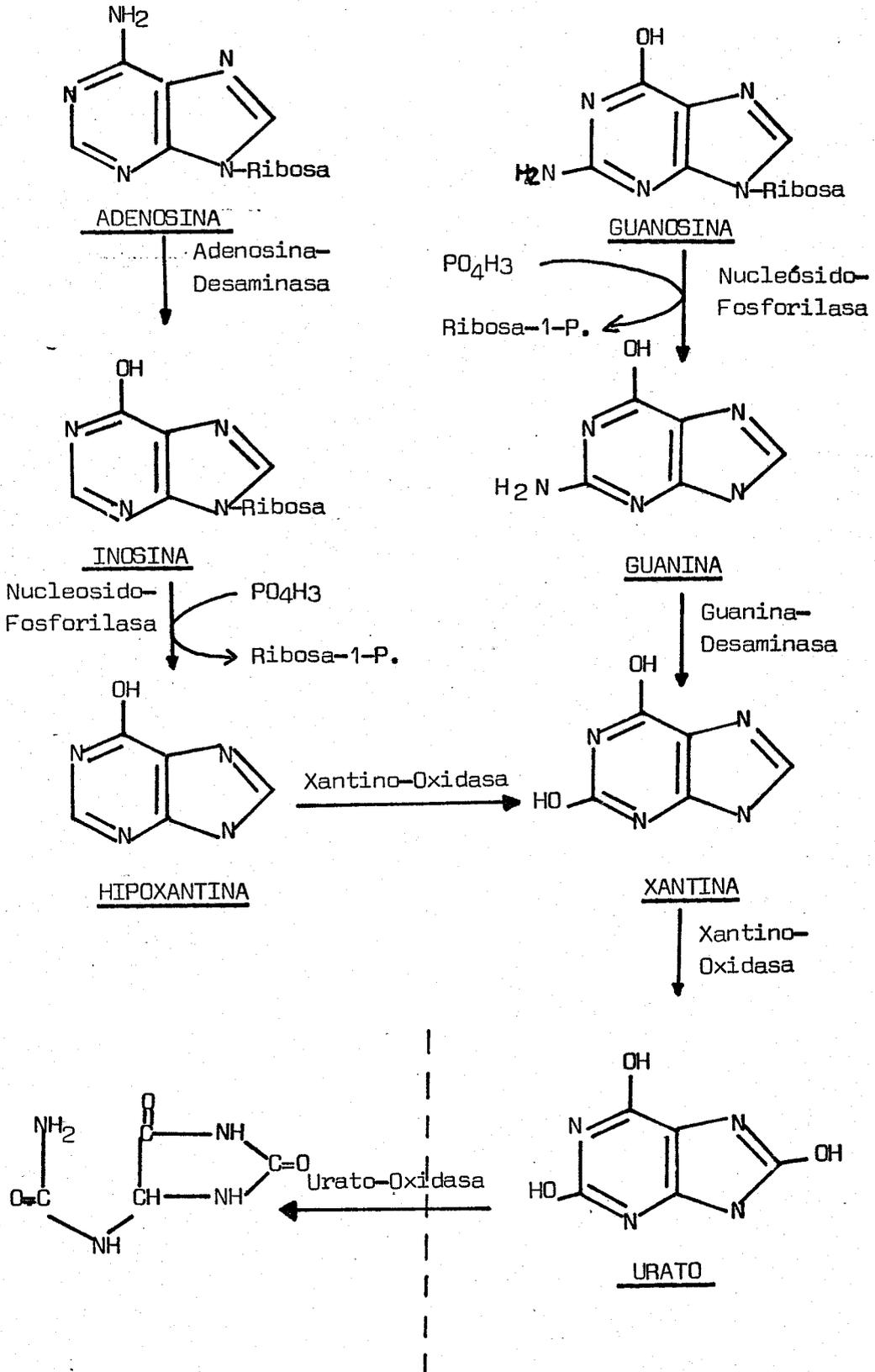
ACIDO URICO

El ácido úrico (2,6,8-trioxipurina) es el producto purínico más oxidado, siendo en la especie humana el producto terminal del metabolismo de las purinas. En algunos seres vivos menos desarrollados el ácido úrico es transformado a alantoína por la enzima uricasa (WACKER, W.E., (1970) y MERTZ, D.P., (1971)).

La concentración de ácido úrico en el organismo humano está por ello muy ligado a las nucleoproteínas, de manera que éstas por hidrólisis dan lugar a las bases purínicas (adenina, guanina, hipoxantina) las cuales pasan a ácido úrico por sucesivas transformaciones. Existe un ácido úrico exógeno y otro endógeno. El primero producido por desaminación y oxidación de las purinas alimenticias. El endógeno procede del metabolismo de las purinas, o sea, de los propios A.N. y nucleótidos (Fig. 1; CANTAROW y SCHEPARTZ (1967)).

La formación del ácido úrico como producto final del metabolismo purínico se expone esquemáticamente en la Fig. 2 (SEEGMILLER, J.E. (1974) y SORENSEN, L.B. (1969)).

FIG. 1. CATABOLISMO DE LOS NUCLEOSIDOS PURINICOS



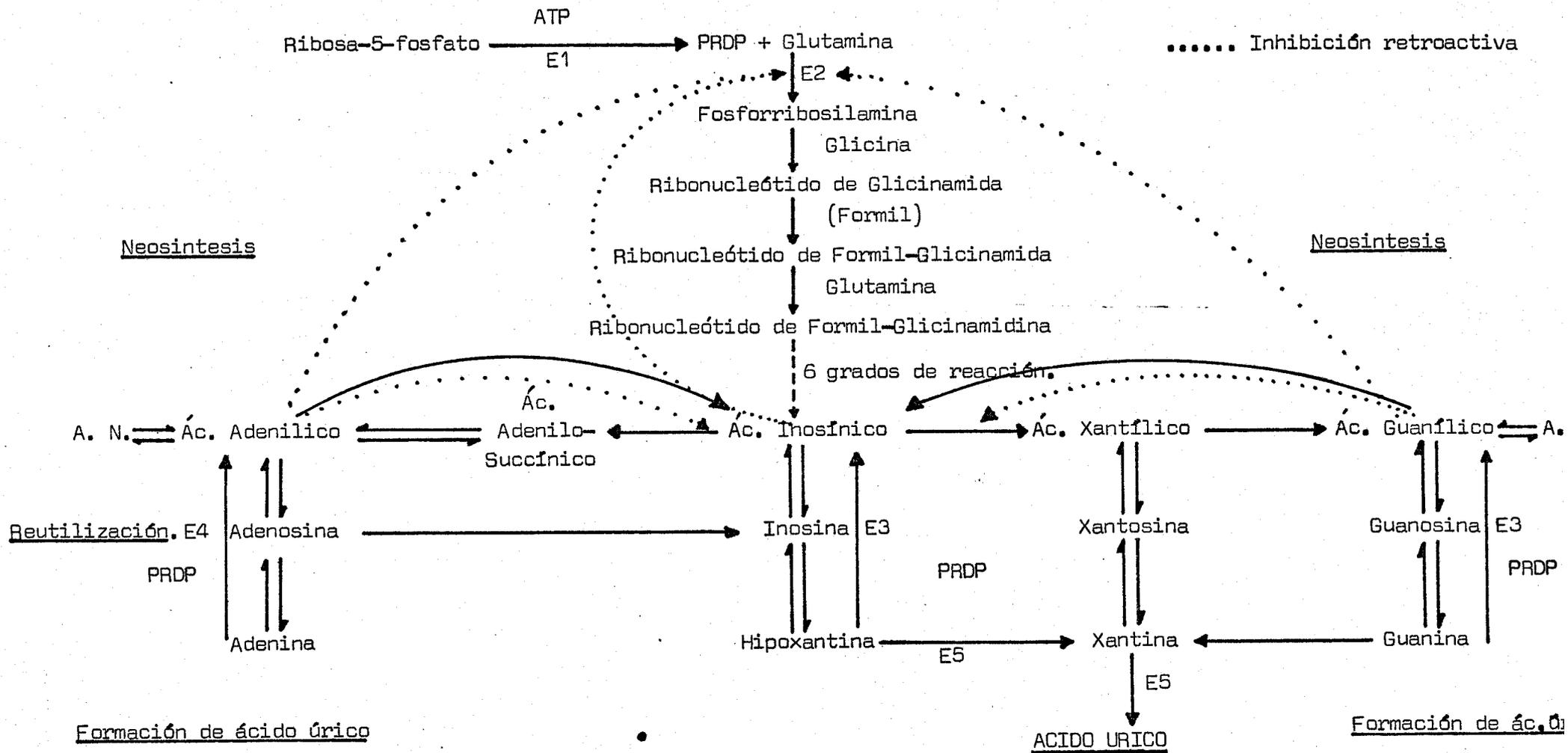


FIG. 2. Metabolismo de las purinas y formación de ácido úrico (según SEEGMILLER [1974] y SORENSEN [1969]). PRDP 5-fosforribosil-1-difosfato. E1 Fosforribosil-difosfato-sintetasa. E2 Amido-fosforribosil-transferasa. E3 Hipoxantina/guanina-fosforribosil-transferasa (HG-PRT). E4 Adenina-fosforribosil-transferasa. E5 Xantina-oxidasa.

Las purinas proceden en parte de la alimentación ó de los tejidos, por degradación de las nucleoproteínas a A.N. y finalmente a nucleótidos (catabolismo del ácido nucleico). En parte se sintetizan también, sobre todo en el hígado (neosíntesis), a partir de sustancias precursoras (glicina, glutamina, aspartato, grupos formilo).

El primer paso específico de la neosíntesis es la formación de fosforribosilamina a partir de 5-fosforribosil-1-difosfato (PRDP) y glutamina. Esta reacción irreversible es catalizada por la amido-fosforribosiltransferasa (fosforribosil-difosfato-amidotransferasa). El primer compuesto formado en los pasos siguientes con el anillo purínico es el ácido inosínico, ribonucleótido que constituye la sustancia inicial para la formación de los demás ribonucleótidos: ácido xantílico, ácido guanílico y ácido adenílico.

Por medio de nucleósido-5-fosfatasas y fosfatasas inespecíficas, los diversos ribonucleótidos se escinden a nucleótidos, a partir de los cuales la purina-nucleosidasa libera las bases purínicas(Fig.1).

Los ribonucleótidos pueden volver a formarse por condensación de las bases purínicas con PRDP (reutilización).

La síntesis de los nucleótidos de purina está bajo control retroactivo: el producto final influye sobre su propia velocidad de formación, inhibiendo la actividad de la enzima que cataliza el primer paso de la síntesis. De este modo, en la neosíntesis la amidofosforribosil-transferasa es inhibida por los ácidos adenilico, inosínico y guanilico, y en la reutilización los ribonucleotidos inhiben las correspondientes fosforribosil-transferasas. Además los ácidos adenilico y guanilico inhiben su propia formación a partir de ácido inosínico.

En el plasma a pH 7,4 está ionizado el 98 % del ácido úrico (Fig.3); el resto está como ácido libre (por eso es mas correcto el termino "uratemia" que el de "uricemia"). La solubilidad del ácido libre es mucho menor que la sal sódica. El valor de pH disminuye a lo largo de las vias urinarias, por lo cual aumenta la porción de ácido úrico libre difícilmente soluble y disminuye la de iones uratos; sin embargo la solubilidad del ácido úrico es aproximadamente dos ó tres veces superior que la solubilidad en agua (SEEGMILLER, J.E. (1974)).

El urato se filtra a través del glomérulo y la mayoría es reabsorbido por los tubulos proximales. Aproximada-

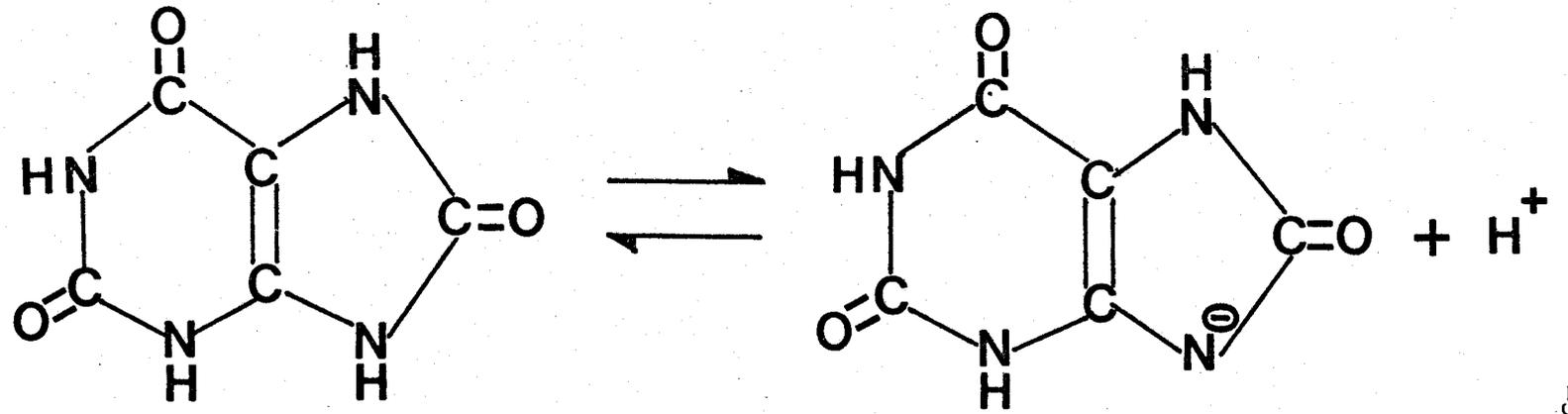


FIG. 3. DISOCIACION DEL ACIDO URICO (izqda) A URATO (drcha).

mente el 80 % del ácido úrico presente en la orina procede de la secreción en el tubulo distal (GUTMAN, A.B., (1965)).

La función fisiológica del ácido úrico es poco conocida. Se sabe que es poco soluble en los líquidos orgánicos y por tanto potencialmente peligroso en los tejidos por la formación de cristales. Y por otra parte sabemos que con su eliminación se pierde un compuesto que fué sintetizado con gran consumo de energía.

El ácido úrico no sólo se transforma en el plasma sino que también se incorpora a los eritrocitos. Esta incorporación guarda relación con la concentración del mismo en el plasma (LANG y col. (1975)).

Los valores de referencia del ácido úrico para la mayoría de los países europeos pueden considerarse como límites superiores de 7,0 mg/dl en el varón y 6,0 mg/dl en la mujer antes de la menopausia (CHRISTEN, D.P., (1971)). Factores fisiológicos y patológicos pueden variar la concentración de ácido úrico en el organismo. Las variaciones usuales en la composición de los alimentos no influyen grandemente sobre el nivel del ácido úrico. DUFF y col. (1968) han estudiado los V.N. para otros grupos étnicos. Así, en los

indigenas de las islas del Pacifico los niveles normales son superiores a los de la raza blanca. La ingestión de grasas y tambien en la inanición, aumenta el nivel del ácido úrico, porque en ambos casos se aumenta el ácido acetyl-acético y el ácido beta-hidroxi-butírico que disminuyen la eliminación renal del úrico (MACLAGAN y ROMAN (1967)). En una sobrecarga de purinas, que se degradan a ácido úrico, suben los niveles séricos al igual que la eliminación renal, en función de la dosis, pero a las mismas dosis la repercusión de la sobrecarga de ADN es aproximadamente sólo la mitad de la de ARN. (ZOLLNER y col. (1972)).

Tambien influye el ejercicio fisico, de manera que despues de un trabajo pesado la tasa de ácido úrico en suero aumenta por disminucción de la eliminación renal debido a la formación de lactato. Se sabe que el nivel de ácido úrico tiene relación con influencias de tipo fisiológico, siquicas y socilógicas. Así en caso de obesidad hay tendencia a dar valores mas altos. Tambien se corresponde su mayor concentración con la concentración de hemoglobina en sangre total. (ACHESON y O'BRIEN (1966)). Tambien es sa-

bido la influencia de ciertos medicamentos sobre la uricemia. Así los salicilatos a pequeñas dosis, son hiperuricemiantes, y estos mismos a grandes dosis (5g ó más en 24 horas), la probenecida y sustancias derivadas de las cumarinas disminuyen la uricemia.

Los factores patológicos, normalmente se dan por aumento de la concentración de ácido úrico en sangre. Esto ocurre en la gota donde en la crisis aguda de la enfermedad se encuentra siempre un claro aumento del ácido úrico plasmático, así como fiebre, leucocitosis moderada y aumento de la V.S.G. También hay aumento de ácido úrico en la hiperuricemia familiar; en la leucemia, policitemia donde hay destrucción de nucleos celulares como también ocurre durante la radioterapia (ó citostáticos). En la insuficiencia renal avanzada, aunque aquí el aumento de la uricemia ocurre mas tarde que la uremia y creatinemia. En el embarazo suele aumentar hasta los 10mg/dl probablemente por causa renal. En las anémias perniciosas, en la inanición y en la cetosis donde parece que ocurre una dis-minución de la eliminación renal.

El control terapéutico de la hiperuricemia se lleva a cabo por los medicamentos; así existen medicamentos

uricosúricos como la fenilbutazona y los salicilatos donde parece que disminuye la fijación de uratos a las proteínas por lo que se facilita la filtración glomerular. Otros son inhibidores de la xantino-oxidasa (como el alopurinol), enzima necesaria en el metabolismo del ácido úrico como la formación de xantina e hipoxantina, precursores del ácido úrico.

Otros son uricolíticos como la administración parenteral de la enzima uricasa que oxida el ácido úrico a alantoina.

De todo lo expuesto hasta ahora podemos ver que el ácido úrico es uno de los parametros mas frecuentemente solicitados en los laboratorios clinicos y que su determinación necesita de un metodo rápido, sencillo, facilmente automatizable, al alcance del pequeño laboratorio y de una precisión tolerable.

II.2. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS DE LOS METODOS ANALITICOS
EMPLEADOS EN LA DETERMINACION DE ACIDO URICO

FOLIN O. y DENIS W. (1912) estudian los compuestos fosfotúngstico y fosfomolibdico como reactivos de color en la determinación de ácido úrico y compuestos de hidroxibenceno. El ácido fosfotúngstico producía un color azul en solución alcalina con ciertas sustancias principalmente ácido úrico, fenol, tirosina, ácido tánico, timol, resorcinol, vainillina, floroglucinol y otras sustancias de ca racter proteico. De esta manera los autores detectaban 1 par te de ácido úrico en 500.000 de agua.

Mas tarde tambien FOLIN y DENIS (1917) aplicaban este reactivo de fosfotúngstico para la determinación colorimétrica de ácido úrico en sangre. En esta determinación las proteínas eran precipitadas por ebullición en ácido acético N. La muestra así preparada se trataba con el reactivo de ácido úrico y solución de carbonato sódico. Desde entonces los metodos colorimétricos originales de determinación de ácido úrico se basaban en el empleo de ácido fosfotungstico y carbonato sódico.

OPAL E. HEPLER, M.D. y MARY M. STOSKOPF (1951), prescinden del carbonato e introducen el cianuro sódico en solución al 15 % con un álcali; ésta solución se la añadian a una solución de urea para intensificar el color y mejorar la exactitud.

Otros autores sustituyeron el silicato por el cianuro obteniéndose más éxito, y algunos métodos que se modificaron con estos reactivos fueron aceptados en muchos laboratorios.

Sin embargo CARAWAY, W.T., (1955) indica que los métodos para determinar el ácido úrico utilizando el cianuro poseen grandes desventajas entre las cuales cita el que las soluciones de cianuro son venenosas y relativamente inestables. La reacción final tiende a dar turbideces y las curvas de calibrado son difíciles de reproducir. Además se precisa de una técnica cuidadosa para precipitar las proteínas.

El método de CARAWAY utiliza los siguientes reactivos:

- Ácido fosfotúngstico.
- Carbonato sódico 10 %.
- Ácido sulfúrico 0,66 N.
- Tungstato sódico 10 %.

La técnica a seguir es la siguiente:

a) Desproteínización:

A 1,0 ml de suero, u orina diluida al 1:10 le añade 8,0 ml de agua destilada, 0,5 ml de ácido sulfúrico 0,66 N y 0,5 ml de tungstato sódico al 10 %. Y centrifuga durante 5 minutos a 2.500 r.p.m.

b) Técnica propiamente dicha:

Del sobrenadante toma 5,0 ml, le añade 1,0 ml de carbonato sódico y deja reposar 10 minutos. Por último añade 1,0 ml de ácido fosfotúngstico y lee a partir de treinta minutos.

M. SOBRINHO-SIMÕES (1.965) propone una nueva modificación en la que utiliza una solución de tungstato-hidroxilamina sustituyendo al carbonato sódico. Sin embargo esta modificación no mejora el método del carbonato-fosfotúngstico propuesto por CARAWAY y es éste método el utilizado hasta ahora.

El reactivo fosfotúngstico de FOLIN fué probado con diferentes sustancias y se encontró que reacciona solamente con aquellos compuestos fenólicos monohidricos que tengan un grupo amino en el anillo bencénico (FOLIN O. 1912).

Sin embargo la naturaleza química del compuesto formado entre el ácido úrico y el fosfotúngstico parece ser compleja y hasta ahora aún no ha sido determinada.

Nosotros introducimos en nuestro método un detergente que evita la desproteínización junto al reactivo original de fosfotúngstico utilizado por FOLIN en 1.912. No se conocen antecedentes bibliográficos sobre un método de de terminación de ácido úrico donde se elimine el paso de despro te inización ó dialisis previa a la reacción propiamente dicha.

III. PARTE EXPERIMENTAL

III.1. INSTRUMENTAL: APARATOS Y MATERIALES

En las medidas experimentales se han utilizado los siguientes instrumentos y materiales:

Todas las medidas se realizaron a una longitud de onda de 680 nm utilizandose un blanco de reactivos en un espectrofotómetro marca BAUSCH & LOMB modelo Spectronic 80 con lectura lineal de absorbancias. Para las medidas se han utilizado cubetas de plástico desechables marca GREITNER.

La preparación de las muestras problema para eliminar las proteínas interferentes en el método de CARAWAY fueron realizadas a 2.500 r.p.m. y para las reacciones fueron empleados tubos de vidrio marca CORNING.

Así mismo se utilizaron pipetas y micropipetas automáticas marca FINNPIPETTE equipadas con puntas de plástico desechables.

Para las medidas de pH fué utilizado un phmetro marca BECKMAN modelo G calibrado previamente con una disolución tampón de pH conocido próximo al de la medida.

III.2. CONDICIONES DE TRABAJO

2.1. REACTIVOS

Todos los reactivos utilizados fueron reactivos G.R. de E. MERCK.

Así mismo los reactivos tampón y el detergente se conservan en frascos de plástico sin que les afecte la luz. En cambio el reactivo de ácido fosfotúngstico debe ser conservado en frasco de vidrio de color topacio.

Acido Fosfotúngstico

El reactivo de ácido fosfotúngstico lleva la misma composición del reactivo de FOLIN y DENIS (1912) que estos autores describieron. A saber:

Tungstato sódico	0,303 M.
Sulfato de Litio	0,312 M.
Acido Fosfórico	1,396 M.

Se prepara disolviendo 100 g de tungstato sódico libre de molibdato ($\text{Na}_2 \text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) en 800 ml de agua destilada. Añadir 80 ml de ácido fosfórico al 85 % y llevar a reflujo lentamente al menos durante dos horas. Dejar enfriar a temperatura ambiente y diluir hasta 1000 ml con agua destilada en matraz aforado.

Luego añadir y disolver 40 g de Sulfato de litio ($\text{Li SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Este reactivo es estable indefinidamente a temperatura ambiente si se conserva en frasco de color topacio. El pH final es de $2,75 \pm 0,25$. La áidez del ácido es importante en la reacción.

Tampón de Carbonato sódico-Trietanolamina (TEA)

Las concentraciones molares utilizadas son las siguientes:

Carbonato sódico 0,377 M.

Trietanolamina 0,301 M.

Se prepara disolviendo 40 g de carbonato sódico y 40 ml de TEA en agua destilada. Disolver y llevar hasta 1000 ml de agua destilada en matraz aforado. El pH final es de $11,50 \pm 0,10$.

Dodécylhydrogenosulfato, sal sódica (SDS)

$\text{C}_{12} \text{H}_{25} \text{Na O}_4\text{S}$ (P.M. 288,38)..... 0,138 M.

Disolver 40 g de SDS en agua destilada y llevar hasta 1000 ml en matraz aforado. Al disolver el SDS se hará lentamente, calentando y sin formar espuma. El pH final es de $7,40 \pm 0,10$.

Mezcla Cromógena

Pipetear 1,0 ml de ácido fosfotúngstico en un tubo de ensayo y añadir 5,0 ml de SDS. Esta mezcla prepa-

rada momentos antes de efectuar la reacción es útil para cuatro ensayos dado que en cada ensayo se utiliza 1,5 ml. Sin embargo la mezcla puede ser preparada y conservada a temperatura ambiente al menos cuatro meses. Es importante no conservar ésta mezcla en frigorífico pues no es estable y se forman precipitados.

Patrón de Acido Úrico

En nuestros ensayos se han empleado soluciones patrones comercializados de ácido úrico de 6,0 y 12,0 mg/dl de laboratorios Knikerbocker; así como soluciones patrones concentrados de 100 mg/dl también de los mismos laboratorios, los cuales se diluían para obtener concentraciones finales deseadas.

2.2. PROCEDIMIENTO

Para la determinación de ácido úrico en fluidos biológicos por el método propuesto partimos de un reactivo de trabajo que llamamos mezcla cromógena formada por 1,0 ml de ácido fosfotúngstico y 5,0 ml de reactivo diluyente (SDS).

Pipeteamos 200 μ l de agua destilada en un tubo rotulado como B (blanco), 200 μ l de patrón de ácido úrico de concentración conocida al tubo rotulado como P (patrón); y 200 μ l de la muestra problema al tubo rotulado con X (problema). Luego se añade 1,5 ml del reactivo tampón a cada tubo y se mezcla y deja reposar de tres a cinco minutos a temperatura ambiente. Finalmente se pipetea 1,5 ml de la mezcla cromógena a cada tubo. Mezclamos y dejamos en reposo. Leemos a partir de los veinte minutos. El color es estable 60 minutos.

La concentración de ácido úrico de la muestra problema se obtiene de la siguiente manera:

a) Trabajando frente a patrón: En este caso la concentración de ácido úrico de la muestra problema se obtiene multiplicando la concentración de ácido úrico del patrón por la

relación de las extinciones del problema y del control:

$$\frac{E \text{ problema}}{E \text{ patrón}} \times \text{Concentración patrón} = \text{mg/dl}$$

b) Estableciendo la correspondiente curva de calibrado a partir de soluciones patrones de 2,4,6,8,10 y 12 mg/dl. A éstas concentraciones les corresponden sendas absorbancias que son representadas gráficamente. De esta manera a la absorbancia de la muestra problema le corresponde la concentración indicada en la gráfica.

IV. RESULTADOS EXPERIMENTALES

IV.1. CONCENTRACION DEL ACIDO FOSFOTUNGSTICO EN LA MEZCLA

CROMOGENA

1.1 EFECTOS DE LA CONCENTRACION DEL ACIDO FOSFOTUNGSTICO EN LA SENSIBILIDAD Y DESARROLLO DEL COLOR

En el metodo propuesto nosotros utilizamos un ácido fosfotúngstico que diluimos con SDS para obtener una mezcla cromógena que nos dé una sensibilidad y desarrollo de color adecuados. Para estudiar qué dilución de ácido era la idónea hicimos una serie de diluciones de éste con soluciones de SDS al 2,4 y 6 % (p/v), y de esta manera tambien vimos la concentración mas adecuada de SDS en el diluyente. El ácido fosfotúngstico se diluyó desde 2 a 10 veces con las tres soluciones de SDS. Las experiencias fueron realizadas con "pools" de sueros para poder estudiar la capacidad surfactante del detergente. Los resultados obtenidos se encuentran en las tablas I, II y III. En ellas vemos la absorbancia a los veinte minutos y la estabilidad del color formado en la hora siguiente.

En la Tabla I, donde utilizamos el diluyente al 2 %, observamos una mayor sensibilidad cuando el ácido está diluido cinco veces, al mismo tiempo que ofrece la

mayor estabilidad durante la hora siguiente a la formación del cromóforo. También comprobamos que los tubos donde el ácido está más concentrado (diluciones 1:2, 1:3) aparecen ligeras turbideces que desaparecen a los pocos minutos de formada la reacción.

En la Tabla II, donde la concentración de diluyente usada es del 4 %, se ve que la mayor sensibilidad se encuentra en las mezclas cromógenas diluidas cinco y seis veces, y que simultáneamente presentan una mayor estabilidad del color desarrollado. También comprobamos una ligera turbidez que desaparece más tarde en los tubos de mayor concentración de ácido (diluciones 1:2, 1:3).

En la Tabla III donde la concentración de SDS utilizada fue de 6 % se corroboraron los resultados antes expuestos.

En estas experiencias pudimos ver que la dilución de ácido fosfotúngstico capaz de producir una mayor sensibilidad son las mezclas diluidas cinco, seis y siete veces. Por tanto el ácido diluido cinco veces presenta ya las mejores condiciones finales a la reacción tanto en lo que se refiere a la solubilización de las proteínas

(por el agente surfactante), sensibilidad y estabilidad del complejo coloreado.

TABLA I

Efectos de la concentración del ácido fosfotúngstico
en el desarrollo del color.

DILUCION DEL ACIDO FOSFOTUNGSTICO				
	20 minutos	30 minutos	50 minutos	80 minutos
2-veces	0,220	0,225	0,225	0,220
3-veces	0,215	0,225	0,225	0,220
4-veces	0,215	0,220	0,220	0,210
5-veces	0,220	0,220	0,220	0,215
6-veces	0,205	0,210	0,210	0,200
7-veces	0,205	0,210	0,210	0,200
8-veces	0,200	0,205	0,205	0,200
9-veces	0,200	0,205	0,200	0,195
10-veces	0,190	0,200	0,195	0,190

Muestra ensayada: "pools" de sueros.

Concentración del diluyente: SDS al 2 %.

TABLA II

Efectos de la concentración del ácido fosfotúngstico
en el desarrollo del color.

DILUCION DEL ACIDO FOSFOTUNGSTICO	ABSORBANCIAS			
	20 minutos	30 minutos	50 minutos	80 minutos
2-veces	0,225	0,230	0,230	0,220
3-veces	0,225	0,230	0,220	0,215
4-veces	0,225	0,230	0,225	0,210
5-veces	0,230	0,230	0,230	0,225
6-veces	0,230	0,230	0,230	0,220
7-veces	0,225	0,230	0,225	0,210
8-veces	0,220	0,230	0,230	0,220
9-veces	0,220	0,220	0,220	0,210
10-veces	0,215	0,220	0,215	0,200

Muestra ensayada: "pools" de sueros.

Concentración del diluyente: SDS al 4 %.

TABLA III

Efectos de la concentración del ácido fosfotúngstico
en el desarrollo del color.

DILUCION DEL ACIDO FOSFOTUNGSTICO	ABSORBANCIAS			
	20 minutos	30 minutos	50 minutos	80 minutos
2-veces	0,210	0,210	0,220	0,210
3-veces	0,230	0,220	0,230	0,220
4-veces	0,230	0,220	0,235	0,220
5-veces	0,240	0,240	0,240	0,235
6-veces	0,220	0,230	0,230	0,220
7-veces	0,220	0,220	0,220	0,200
8-veces	0,215	0,220	0,230	0,215
9-veces	0,210	0,215	0,220	0,210
10-veces	0,210	0,210	0,220	0,210

Muestra ensayada: "pools" de sueros.

Concentración del diluyente: SDS al 6 %.

1.2. EFFECTOS DE LA CONCENTRACION DEL ACIDO FOSFOTUNGSTICO
EN LA SENSIBILIDAD Y PH DE LA MEZCLA FINAL DE LA
REACCION

Para estos estudios fueron utilizadas mezclas cromógenas de ácido fosfotúngstico y diluyente en diluciones del ácido desde dos a diez veces, y anotamos la absorbancia a los veinte minutos, así como el pH. Esas experiencias fueron realizadas con patrones acuosos de ácido úrico con una concentración de 5 mg/dl (concentración media de referencia del ácido úrico en el suero humano).

En la Tabla IV, donde el diluyente está a una concentración del 2 % vemos que la máxima absorción se obtiene en las mezclas donde el ácido está diluido cinco, seis y siete veces y que las variaciones de pH a éstas diluciones son de 10,24 , 10,39 y 10,46 respectivamente. En la Tabla V (el diluyente está a una concentración del 4 %), la mayor sensibilidad aparece ya a la dilución 1:4 hasta 1:6 y el pH es de 10,10 , 10,23 y 10,33. Y en la Tabla VI (diluyente concentrado al 6 %), la mayor sensibilidad se obtiene a la dilución 1:3 con un pH que varía desde 10,00 hasta 10,42 en la mezcla diluida siete veces.

Así mismo pudimos comprobar también que en las reacciones donde el pH estaba por encima de 10,50 la sensibilidad del ensayo descendía bruscamente y que las mezclas de mayor sensibilidad se correspondían con un pH desde 10,00 hasta 10,40 (Fig. 4).

TABLA IV

Efectos de la concentración del ácido fosfotúngstico en la sensibilidad y pH final de la reacción.

DILUCION DEL ACIDO FOSFOTUNGSTICO	ABSORBANCIA A LOS 20 MINUTOS	pH FINAL
2-veces	0,205	8,60
3-veces	0,215	9,40
4-veces	0,215	9,85
5-veces	0,220	10,24
6-veces	0,220	10,39
7-veces	0,220	10,46
8-veces	0,200	10,65
9-veces	0,200	10,66
10-veces	0,195	10,70

Muestra ensayada: patrón de ácido úrico con 5 mg/dl.

Concentración del diluyente: SDS al 2 %.

TABLA V

Efectos de la concentración del ácido fosfotúngstico en la sensibilidad y pH final de la reacción.

DILUCION DEL ACIDO FOSFOTUNGSTICO	ABSORBANCIA A LOS 20 MINUTOS	pH FINAL
2-veces	0,210	8,60
3-veces	0,210	9,50
4-veces	0,220	10,10
5-veces	0,220	10,23
6-veces	0,220	10,40
7-veces	0,210	10,48
8-veces	0,205	10,55
9-veces	0,200	10,58
10-veces	0,200	10,62

Muestra ensayada: patrón de ácido úrico con 5 mg/dl.

Concentración del diluyente: SDS al 4 %.

TABLA VI

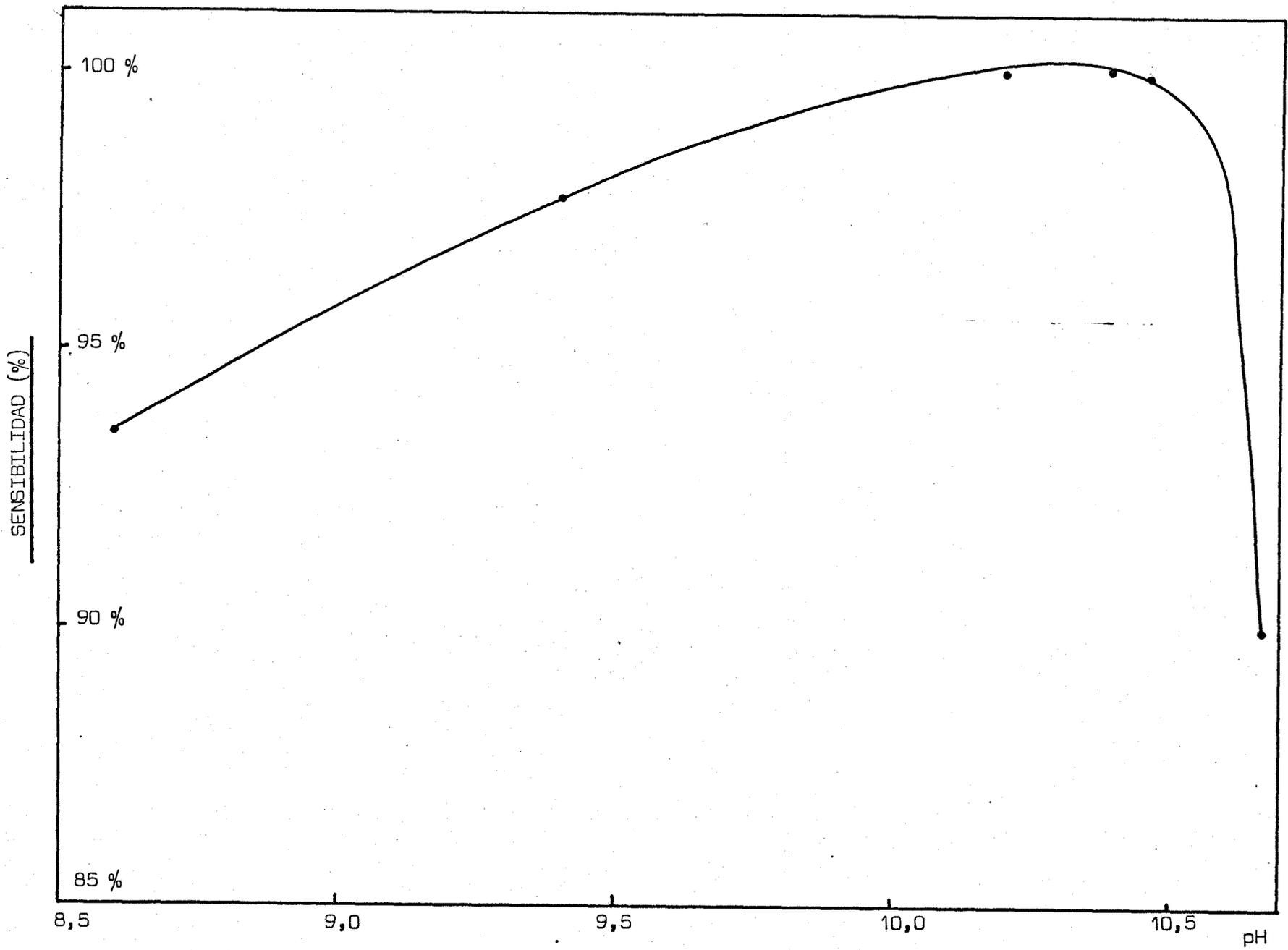
Efectos de la concentración del ácido fosfotúngstico en la sensibilidad y pH final de reacción.

DILUCION DEL ACIDO FOSFOTUNGSTICO	ABSORBANCIA A LOS 20 MINUTOS	pH FINAL
2-veces	0,210	9,44
3-veces	0,220	10,00
4-veces	0,220	10,10
5-veces	0,220	10,22
6-veces	0,220	10,36
7-veces	0,220	10,42
8-veces	0,210	10,49
9-veces	0,205	10,54
10-veces	0,195	10,63

Muestra ensayada: patrón de ácido úrico con 5 mg/dl.

Concentración del diluyente: SDS al 6 %.

FIG. 4. Influencia del pH en la sensibilidad del ensayo.



IV.2. CONCENTRACION DEL DETERGENTE EN LA MEZCLA CROMOGENA

Las experiencias que realizamos para estudiar la concentración de ácido fosfotúngstico en la sensibilidad del ensayo fueron hechas con tres soluciones de Dodecilo hidrogenosulfato (sal sódica) (SDS) en agua destilada al dos, cuatro y seis por ciento. Con ellas pretendimos estudiar la concentración de ácido fosfotúngstico que ofrecía mayor sensibilidad (yá estudiada), y por otra parte estudiar el efecto de las concentraciones (2,4 y 6 %) de SDS en el ensayo. Pudimos comprobar que en los ensayos donde el SDS estaba al 2 % aparecían turbideces que tardaban mas tiempo en desaparecer que cuando los ensayos se realizaban con SDS al 4 y 6 %. Así mismo, en los ensayos donde el SDS estaba al 6 % no se apreciaron turbideces incluso en los tubos donde el ácido estaba mas concentrado (1:2, 1:3); Sin embargo nosotros elegimos en el método propuesto el diluyente que contenía el SDS a una concentración del 4 % porque aunque aparecen unas ligeras turbideces, éstas desaparecen muy rapidamente y en la dilución de ácido fosfotúngstico al 1:5, la absorbancia y la estabilidad de color eran aceptables cómo hemos comprobado en apartados antes

estudiados. Por consiguiente en el método propuesto utilizamos el diluyente al 4 % porque la capacidad solubilizadora de las proteínas es notable así como la sensibilidad y estabilidad de color de las experiencias realizadas.

IV.3. CONCENTRACION DEL TAMPON

3.1. EFFECTOS DE LAS DISTINTAS CONCENTRACIONES DEL TAMPON

EN LA SENSIBILIDAD DE LA REACCION

En este apartado estudiamos la influencia que tiene la concentración de carbonato sódico y T.E.A. conjuntamente en la sensibilidad y desarrollo de color del método propuesto. Para ello se utilizó carbonato sódico al 2 % (p/v) y le fuimos añadiendo T.E.A. al 2, 4 y 6 % (v/v). De esta manera obtuvimos tres soluciones tampón con un 2 % de carbonato sódico y 2, 4 y 6 % de T.E.A. que dieron una sensibilidad y comportamiento diferentes en los ensayos. En la Tabla VII aparecen los resultados que son reflejados en las gráficas de la Fig. 5.

En la Tabla VIII, Fig. 6 representamos los valores y gráficas que muestran el comportamiento del método cuando se usaron soluciones tampón que contenían un 4 % (p/v) de carbonato sódico en los tres casos, y un 2, 4 y 6 % (v/v) de T.E.A.

Y en la Tabla IX, Fig. 7 aparece representado el diferente comportamiento de la reacción cuando se utilizaron tampones con un 6 % de carbonato sódico y un 2, 4

y 6 % (v/v) de T.E.A.

Las experiencias fueron realizadas con soluciones patrones de ácido úrico con una concentración de 5 mg/dl.

El estudio de las graficas de la Fig. 5 entre sí pudo revelar que los ensayos dónde se utiliza el tampón compuesto por un 2 % de carbonato sódico y un 2 % de T.E.A. ofrece una mayor sensibilidad y estabilidad de color.

Igualmente en las gráficas de la Fig. 6 se observa un mejor comportamiento de la reacción cuando se usaba el tampón compuesto por un 4 % de carbonato sódico y un 4 % de T.E.A. Por ultimo las gráficas de la Fig.7 muestran que la curva que indica una mayor sensibilidad corresponde a los ensayos donde el tampón estaba compuesto por un 6 % de carbonato sódico y un 2 % de T.E.A. Sin embargo apreciamos claramente una mala estabilidad del color formado en ésta reacción.

En la Fig.8 representamos las tres gráficas correspondientes a las mejores condiciones analíticas de las figs.5, 6 y 7. Como ya se indicó el ensayo donde fué usado el tampon compuesto por un 4 % de carbonato sódico y un 4 % de T.E.A. era el más adecuado a pesar de que el ensayo dónde se usó el

tampón de concentración 6 % de carbonato sódico y 2 % de T.E.A. obtenía una buena sensibilidad a los veinte minutos; Sin embargo ésta última reacción tenía una mala estabilidad del color formado. Y en el ensayo donde se usó la solución tampón que contenía un 2 % de carbonato sódico y un 2 % de T.E.A. la estabilidad es idónea pero la sensibilidad dejaba mucho que desear.

El estudio de la influencia de las distintas concentraciones del tampón en la reacción también se hizo utilizando "pools" de sueros con el fin de ver el comportamiento de las proteínas de la muestra y el resto de los constituyentes séricos. Los resultados aparecen reflejados en las Figs. 9, 10 y 11, y comparadas en la Fig. 12 donde se corroboraron las conclusiones anotadas en las experiencias realizadas con patrones acuosos de ácido úrico. Igualmente las absorbancias obtenidas en función del tiempo en éstas experiencias hechas con "pools" de sueros aparecen tabuladas en las Tablas X, XI y XII.

TABLA VII

Efectos de la concentración del tampón en el desarrollo del color.

CONCENTRACION DE T.E.A. (% v/v)	ABSORBANCIAS				
	A LOS 5 MINUTOS	A LOS 20 MINUTOS	A LOS 35 MINUTOS	A LOS 50 MINUTOS	A LOS 80 MINUTOS
2	0,175	0,190	0,190	0,190	0,190
4	0,170	0,180	0,180	0,175	0,170
6	0,160	0,170	0,165	0,160	0,160

Muestra ensayada: patrón acuoso con 5 mg/dl de ácido úrico.

Concentración de carbonato sódico : 2 %.

FIG. 5. Variación de la absorbancia con el tiempo cuando usamos tres tampones diferentes.

- Tampon I: 2 % carbonato sódico. 2 % T.E.A.
- Tampon II: 2 % carbonato sódico. 4 % T.E.A.
- △ Tampon III: 2 % carbonato sódico. 6 % T.E.A.

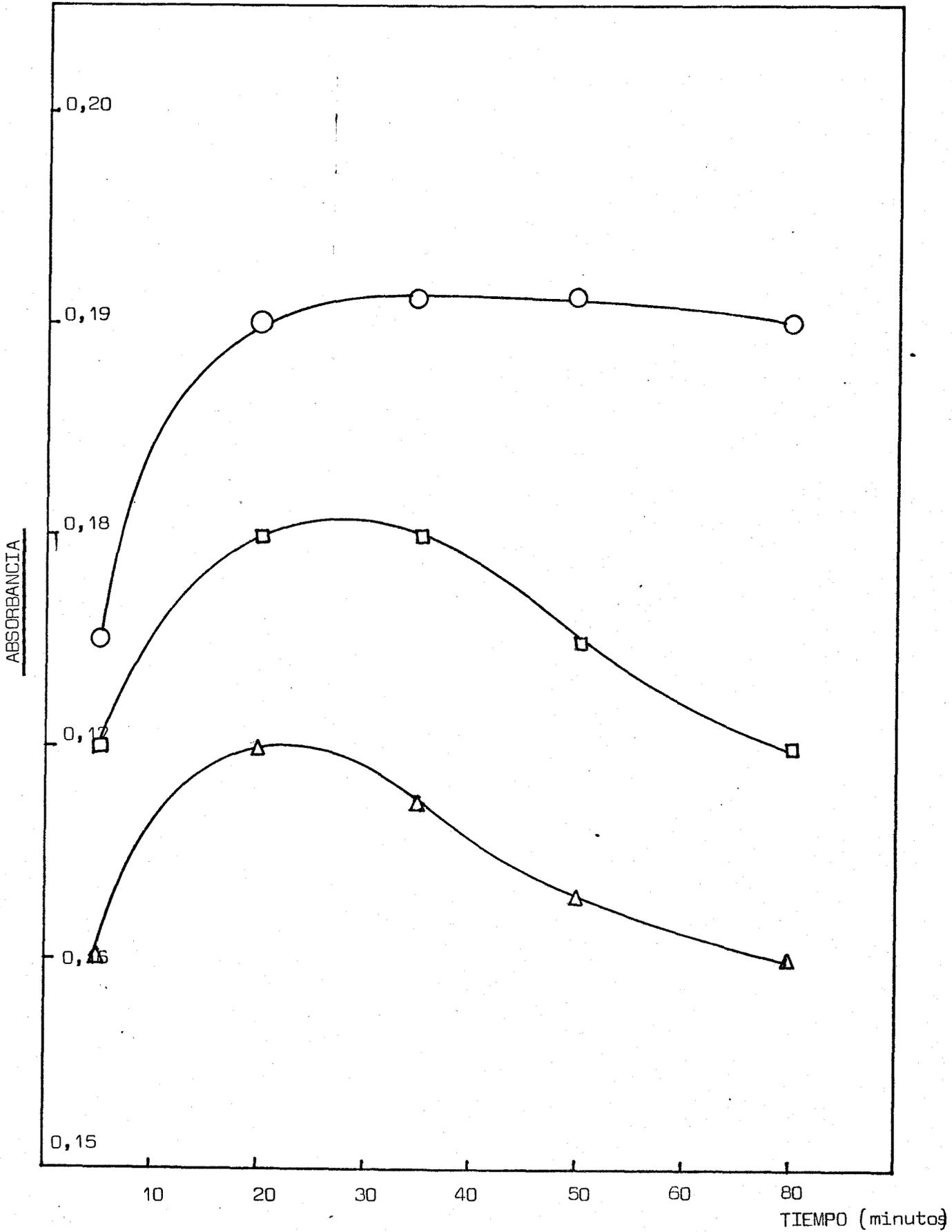


TABLA VIII

Efectos de la concentración del tampón en el desarrollo del color.

CONCENTRACION DE T.E.A. (%v/v)	ABSORBANCIAS				
	A LOS 5 MINUTOS	A LOS 20 MINUTOS	A LOS 35 MINUTOS	A LOS 50 MINUTOS	A LOS 80 MINUTOS
2	0,205	0,215	0,210	0,200	0,190
4	0,220	0,230	0,230	0,230	0,225
6	0,200	0,210	0,200	0,190	0,180

Muestra ensayada: patrón acuoso con 5 mg/él de ácido úrico.

Concentración de carbonato sódico: 4 %.

FIG. 6. Variación de la absorbancia con el tiempo usando tres tampones diferentes.

- Tampon I: 4 % carbonato sódico, 2 % T.E.A.
- Tampon II: 4 % carbonato sódico, 4 % T.E.A.
- △ Tampon III: 4 % carbonato sódico, 6 % T.E.A.

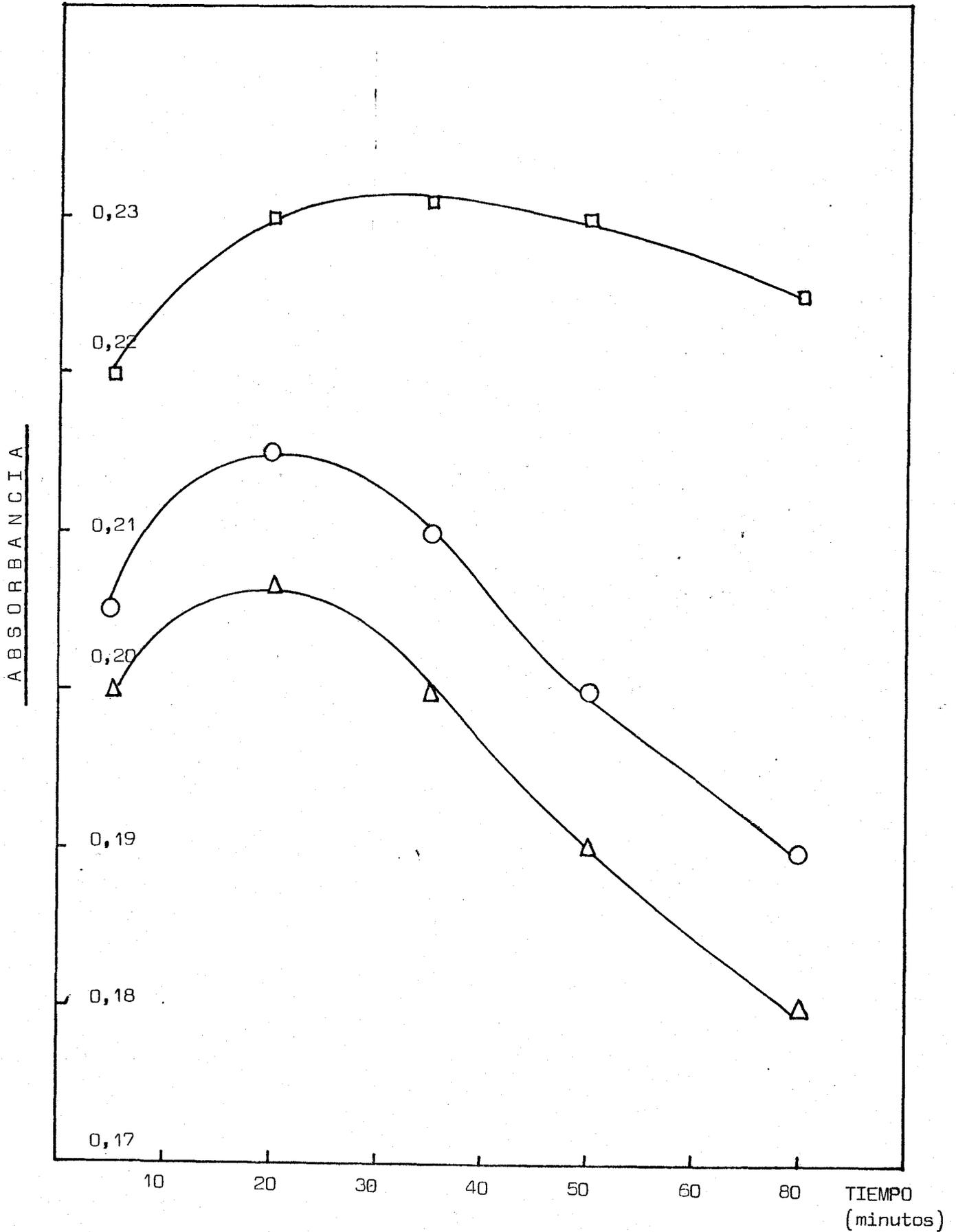


TABLA IX

Efectos de la concentración del tampón en el desarrollo del color.

CONCENTRACION DE T.E.A. (% v/v)					
	A LOS 5 MINUTOS	A LOS 20 MINUTOS	A LOS 35 MINUTOS	A LOS 50 MINUTOS	A LOS 80 MINUTOS
2	0,220	0,230	0,220	0,210	0,195
4	0,210	0,215	0,210	0,200	0,180
6	0,205	0,220	0,215	0,205	0,190

Muestra ensayada: patrón acuoso con 5 mg/dl de ácido úrico.

Concentración de carbonato sódico: 6 %.

FIG.7. Variación de la absorbancia con el tiempo usando tres tampones diferentes.

○ Tampon I: 6 % carbonato sódico. 4 % T.E.A.

□ Tampon II: 6 % carbonato sódico. 6 % T.E.A.

△ Tampon III: 6 % carbonato sódico. 2 % T.E.A.

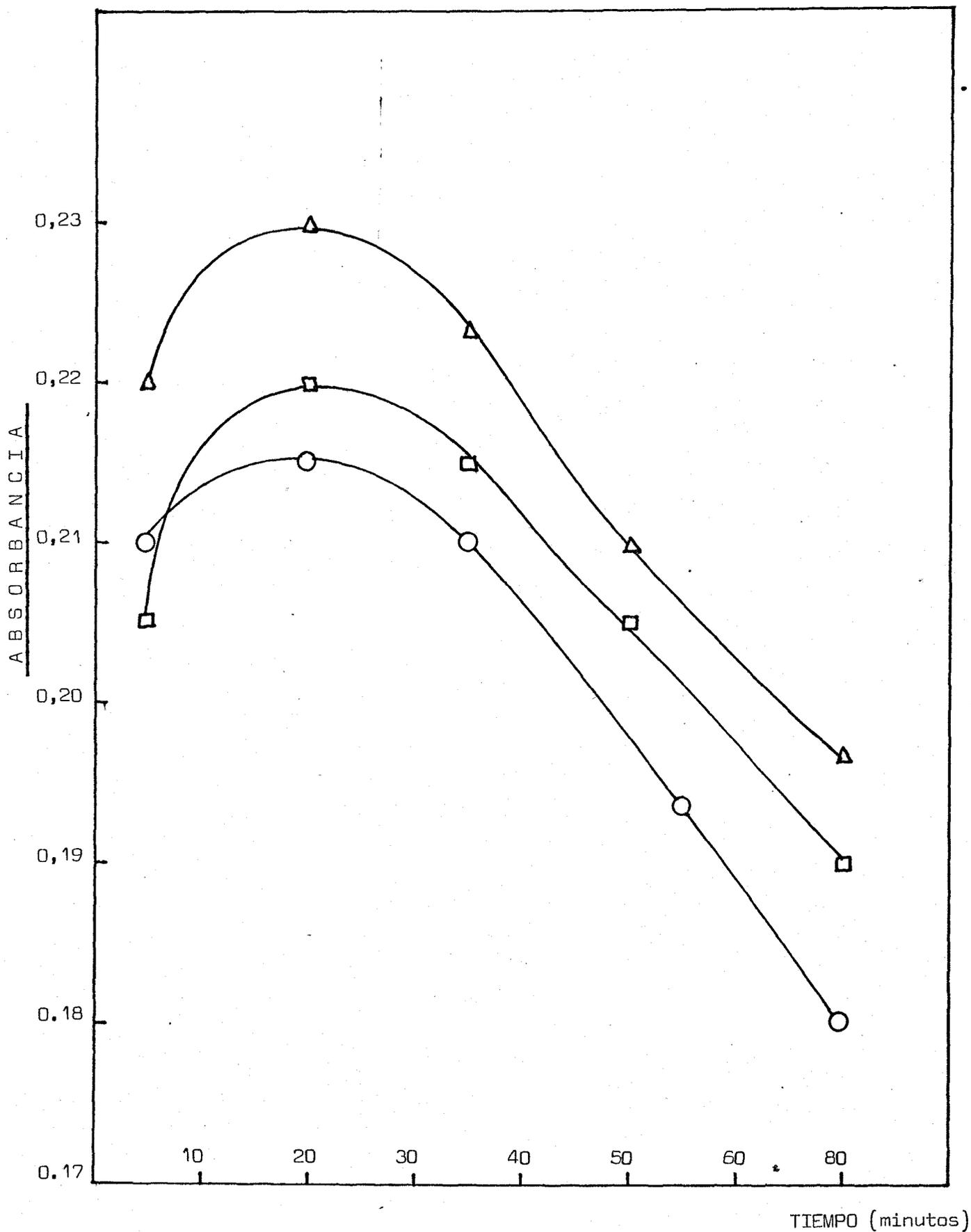


FIG. 8. Variación de la absorbancia con el tiempo usando tres tampones diferentes.

- Tampon I: 2 % carbonato sódico. 2 % T.E.A.
- Tampon: II: 4 % carbonato sódico. 4 % T.E.A.
- △ Tampon III: 6 % carbonato sódico. 2 % T.E.A.

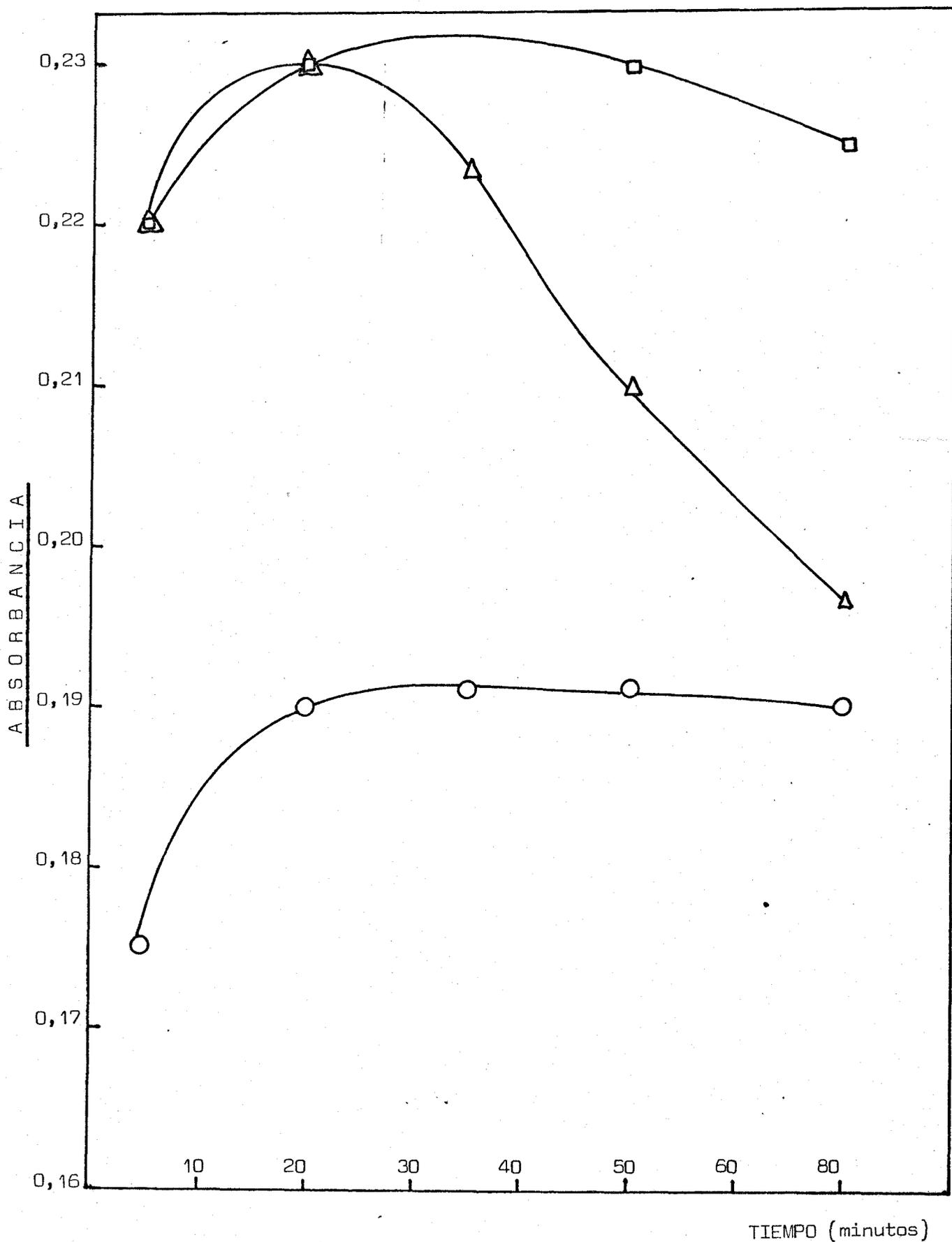


TABLA X

Efectos de la concentración del tampón en el desarrollo del color.

CONCENTRACION DE T.E.A. (%v/v)					
	A LOS 5 MINUTOS	A LOS 20 MINUTOS	A LOS 35 MINUTOS	A LOS 50 MINUTOS	A LOS 80 MINUTOS
2	0,195	0,225	0,230	0,230	0,230
4	0,175	0,200	0,215	0,210	0,210
6	0,180	0,210	0,220	0,210	0,205

Muestra ensayada: "pools" de sueros.

Concentración de carbonato sódico: 2 %.

FIG. 9. Variación de la absorbancia con el tiempo en un "pools" de sueros usando tres tampones diferentes.

- Tampon I: 2 % carbonato sódico. 2 % T.E.A.
- △ Tampon II: 2 % carbonato sódico. 6 % T.E.A.
- Tampon III: 2 % carbonato sódico. 4 % T.E.A.

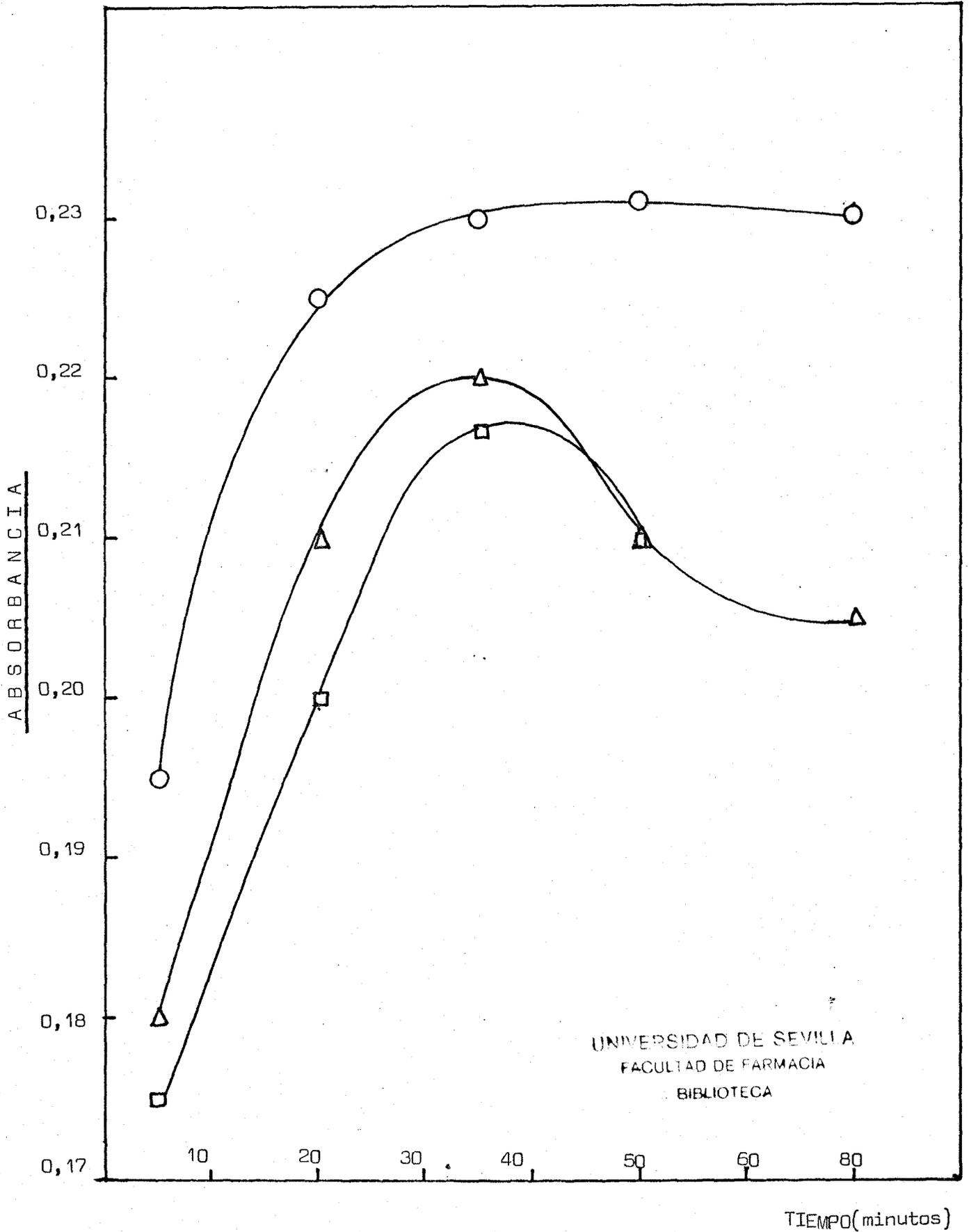


TABLA XI

Efectos de la concentración del tampón en el desarrollo del color.

CONCENTRACION DE T.E.A. (%v/v)	ABSORBANCIAS				
	A LOS 5 MINUTOS	A LOS 20 MINUTOS	A LOS 35 MINUTOS	A LOS 50 MINUTOS	A LOS 80 MINUTOS
2	0,200	0,245	0,255	0,245	0,225
4	0,210	0,240	0,250	0,245	0,225
6	0,210	0,235	0,245	0,240	0,230

Muestra ensayada: "pools" de sueros.

Concentración de carbonato sódico: 4 %.

FIG.10. Variación de la absorbancia con el tiempo en un

"pools" de sueros usando tres tampones diferentes.

○ Tampon I: 4 % carbonato sódico. 2 % T.E.A.

△ TAMPÓN II: 4 % carbonato sódico. 4 % T.E.A.

□ TAMPÓN III: 4 % carbonato sódico. 6 % T.E.A.

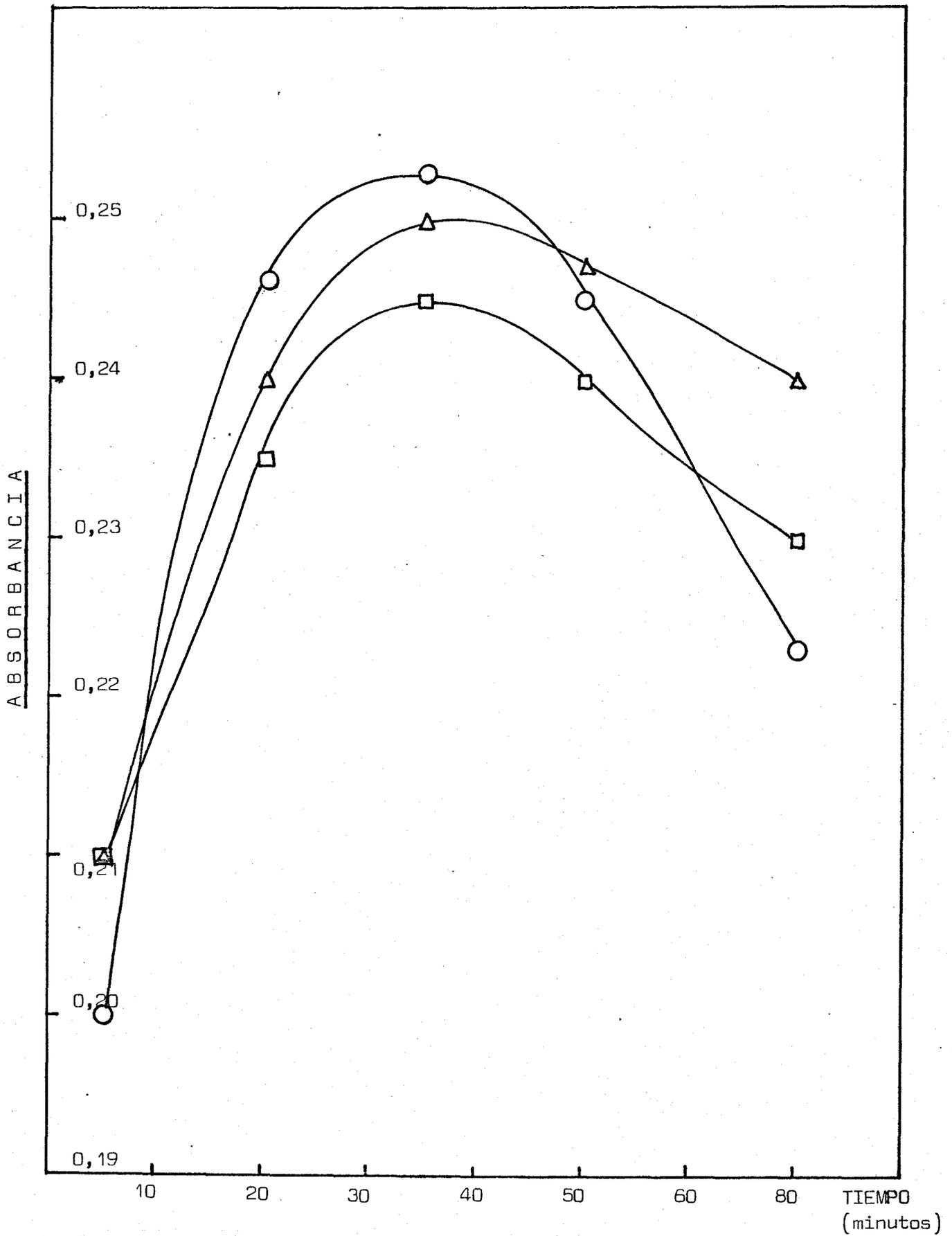


TABLA XII

Efectos de la concentración del tampón en el desarrollo del color.

CONCENTRACION DE T.E.A. (%v/v)	ABSORBANCIAS				
	A LOS 5 MINUTOS	A LOS 20 MINUTOS	A LOS 35 MINUTOS	A LOS 50 MINUTOS	A LOS 80 MINUTOS
2	0,245	0,280	0,285	0,275	0,270
4	0,240	0,270	0,280	0,270	0,260
6	0,230	0,260	0,260	0,250	0,245

Muestra ensayada: "pools" de sueros.

Concentración de carbonato sódico: 6 %.

FIG. 11. Variación de la absorbancia con el tiempo en un "pools" de sueros usando tres tampones diferentes.

- Tampon I: 6 % carbonato sódico, 2 % T.E.A.
- △ Tampon II: 6 % carbonato sódico, 4 % T.E.A.
- Tampon III: 6 % carbonato sódico, 6 % T.E.A.

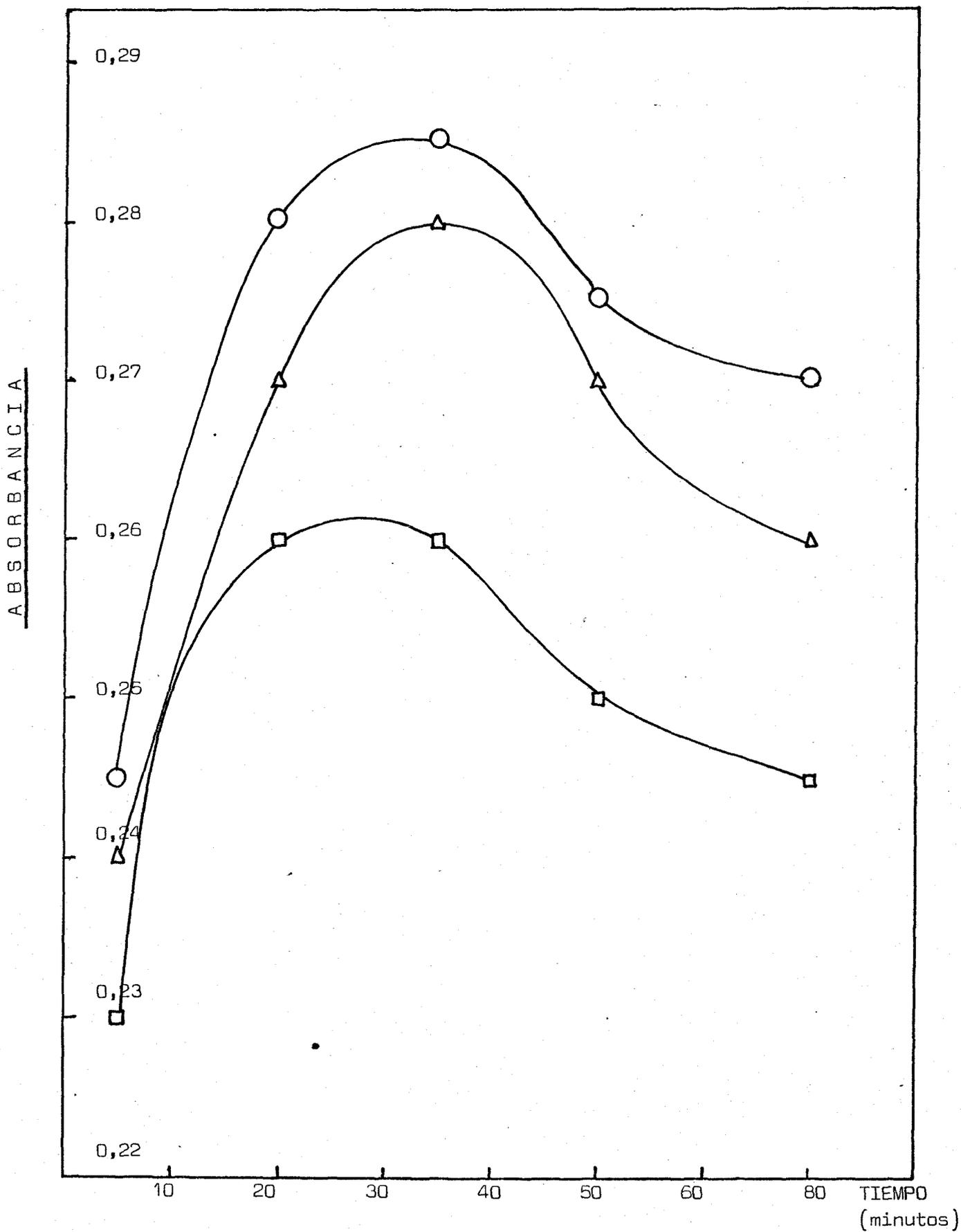
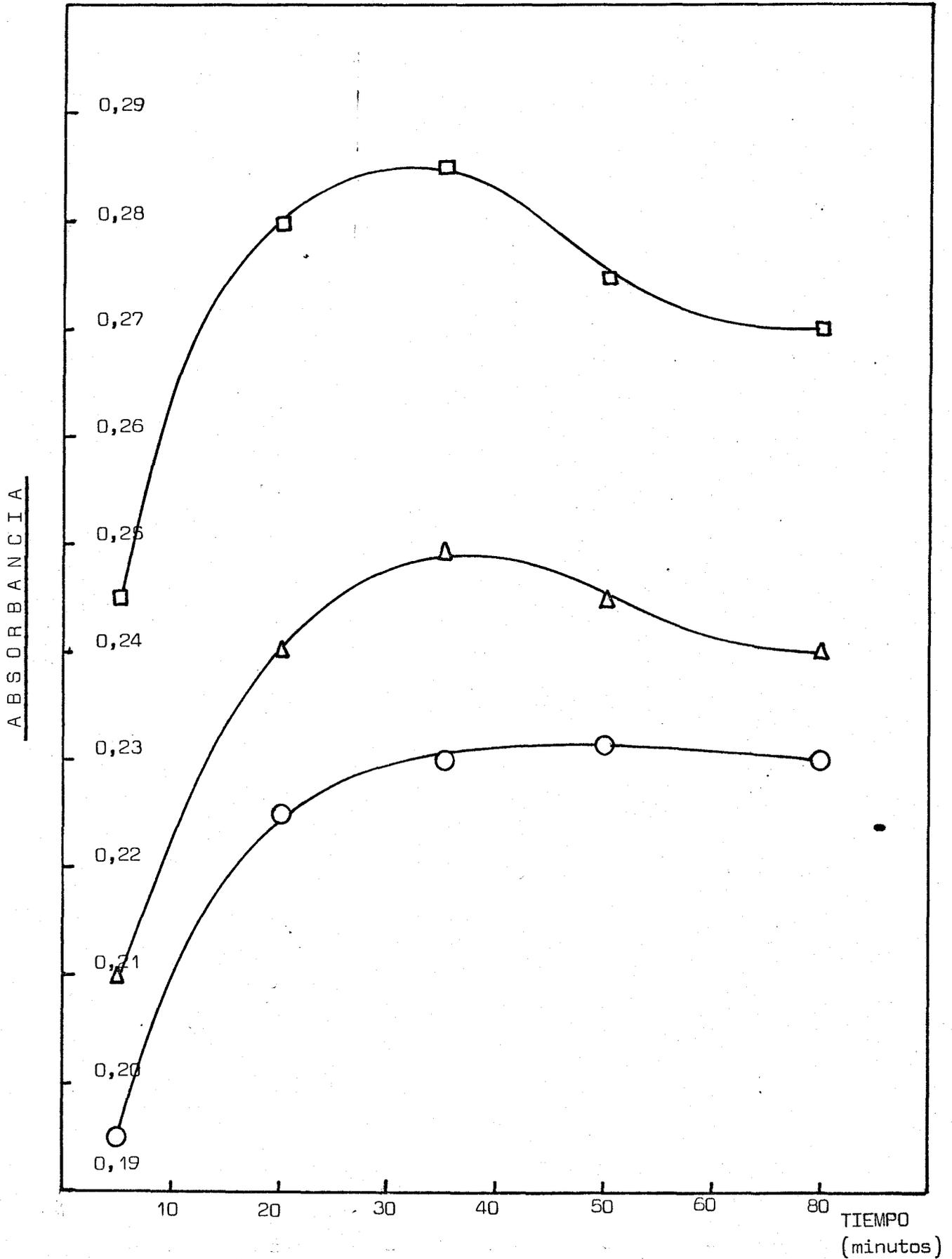


FIG. 12. Variación de la absorbancia con el tiempo en un "pools" de sueros usando tres tampones diferentes.

- Tampon I: 2 % carbonato sódico. 2 % T.E.A.
- △ Tampon II: 4 % carbonato sódico. 4 % T.E.A.
- Tampon III: 6 % carbonato sódico. 2 % T.E.A.



3.2. EFFECTOS DE LAS DISTINTAS CONCENTRACIONES DEL TAMPON
EN EL PH Y SENSIBILIDAD DE LA REACCION

Para estudiar la influencia que tiene la distinta concentración del tampón en la sensibilidad de la reacción y su relación con el pH final de la mezcla del ensayo, fuimos anotando la absorbancia y el pH durante ochenta minutos a intervalos de 5, 20, 35, 50 y 80 minutos. Los valores que obtuvimos aparecen en la Tabla XIII y representados en la Fig. 13. Como se vé, la mayor sensibilidad de los ensayos corresponden a valores de pH entre 10,15 y 10,40. Cuando el pH sube de 10,40 la absorbancia desciende, sobre todo en el intervalo de 10,50 a 10,60 en el que la sensibilidad descendía bruscamente, motivo por el cual el ensayo que se realizó con el tampón que contiene un 6 % de carbonato sódico y un 2 % de T.E.A. ofrecía mala estabilidad del color formado. También puede anotarse que cuando el pH baja de 10,00, la absorbancia obtenida es menor aunque el color formado era estable (gráfica que representa el ensayo en el cual se usó el tampón compuesto por un 2 % de carbonato sódico y 2 % de T.E.A.).

De todo ello deducimos:

a) Que en los ensayos donde se utilizaba el tampón formado por un 2 % de carbonato sódico y un 2 % de T.E.A., la capacidad amortiguadora no era suficiente para obtener una buena sensibilidad y llevar la reacción a un pH entre 10,00 a 10,40.

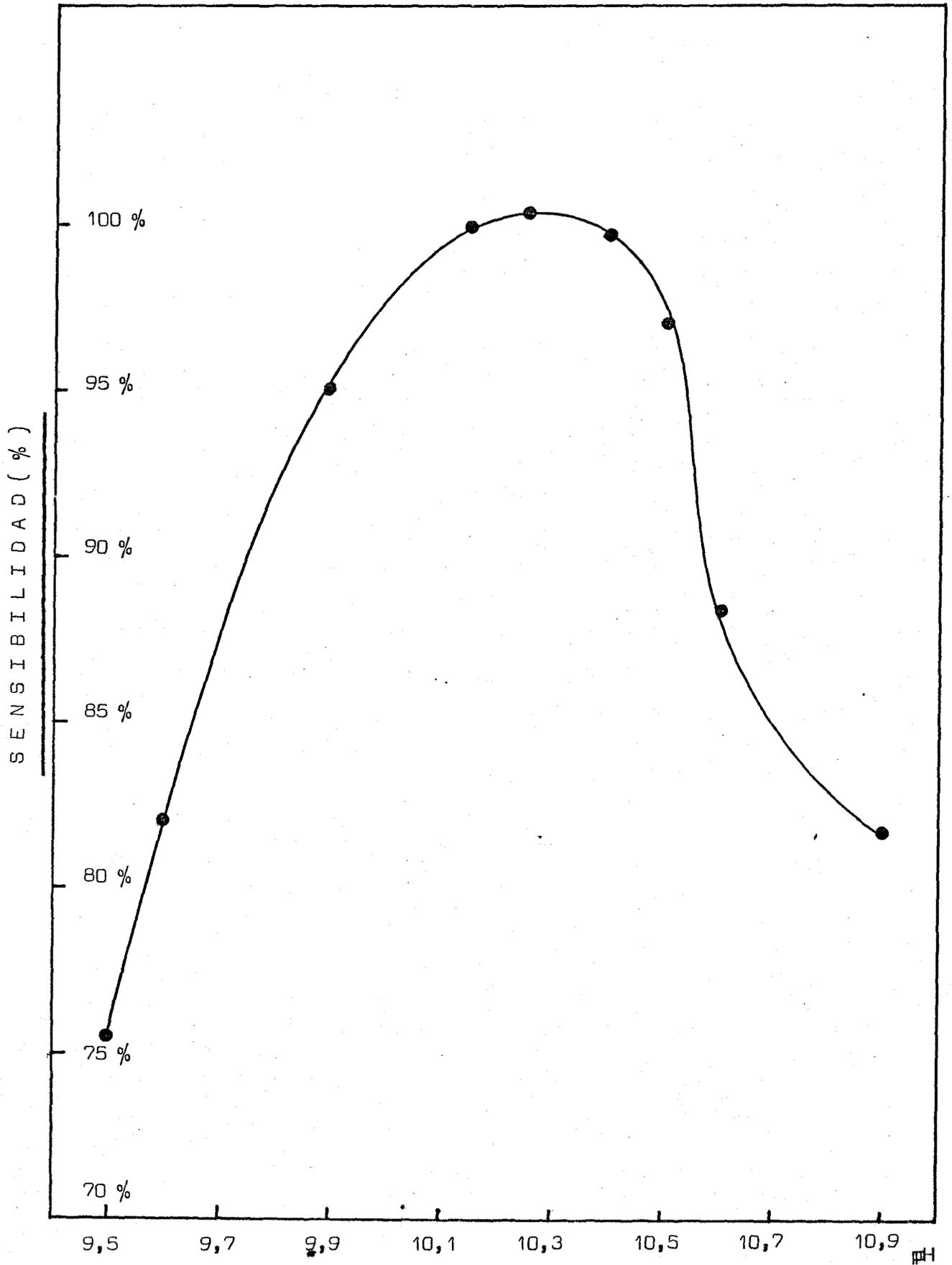
b) Que la capacidad amortiguadora del tampón idónea es aquella donde la composición del tampón es de 4 % de carbonato sódico y 4 % de T.E.A.; y que cuando se aumenta la concentración de ambos constituyentes la elevación del pH por encima 10,40 va en detrimento de la estabilidad del color formado.

TABLA XIII

Relación entre el pH y la absorbancia de los ensayos con 3 soluciones tampones diferentes.

CONCENTRACION DEL TAMPON		A LOS 5 MINUTOS		A LOS 20 MINUTOS		A LOS 35 MINUTOS		A LOS 50 MINUTOS		A LOS 80 MINUTOS	
CARBONATO SODICO (% p/v)	T.E.A. (% v/v)	D.O.	pH	D.O.	pH	D.O.	pH	D.O.	pH	D.O.	pH
2	2	0,175	9,50	0,190	9,60	0,191	9,62	0,191	9,62	0,190	9,60
4	4	0,220	9,90	0,23	10,15	0,232	10,25	0,230	10,41	0,225	10,52
6	2	0,220	10,35	0,23	10,40	0,222	10,51	0,210	10,60	0,200	10,70

FIG.13. Influencia del pH en la sensibilidad del ensayo.



V. CARACTERISTICAS DEL METODO

V.1. ESPECTRO DEL CROMÓFORO

Para ver a qué longitud de onda presentaba el máximo de absorción el cromóforo formado, se hizo un barrido espectral de longitudes de onda comprendidas entre 450 hasta 800 nm. La reacción fue realizada con un patrón de ácido úrico de 6 mg/dl.

El espectro de absorción fue realizado en un Espectrofotómetro Ultravioleta-Visible BECKMAN modelo 25 de doble haz. Y las condiciones instrumentales fueron las siguientes:

Expansión de escala: 0,5 A.

Velocidad del papel: 1 pulgada/minuto.

Velocidad de barrido: 50 nm/minuto.

Cómo se observa en la Fig.14 la banda de absorción del complejo coloreado está entre 735 y 750 nm, con el máximo a 740 nm; sin embargo para las medidas se eligió una longitud de onda de 680 nm por las siguientes razones:

a) El rango espectral de la mayoría de los espectrofotómetros usados en los laboratorios clínicos, sólo alcanzan hasta los 700 nm.

b) A esta longitud de onda la sensibilidad del método era la idónea para que a las uricemias encontradas habitualmente, le correspondieran lecturas de absorbancias comprendidas en el

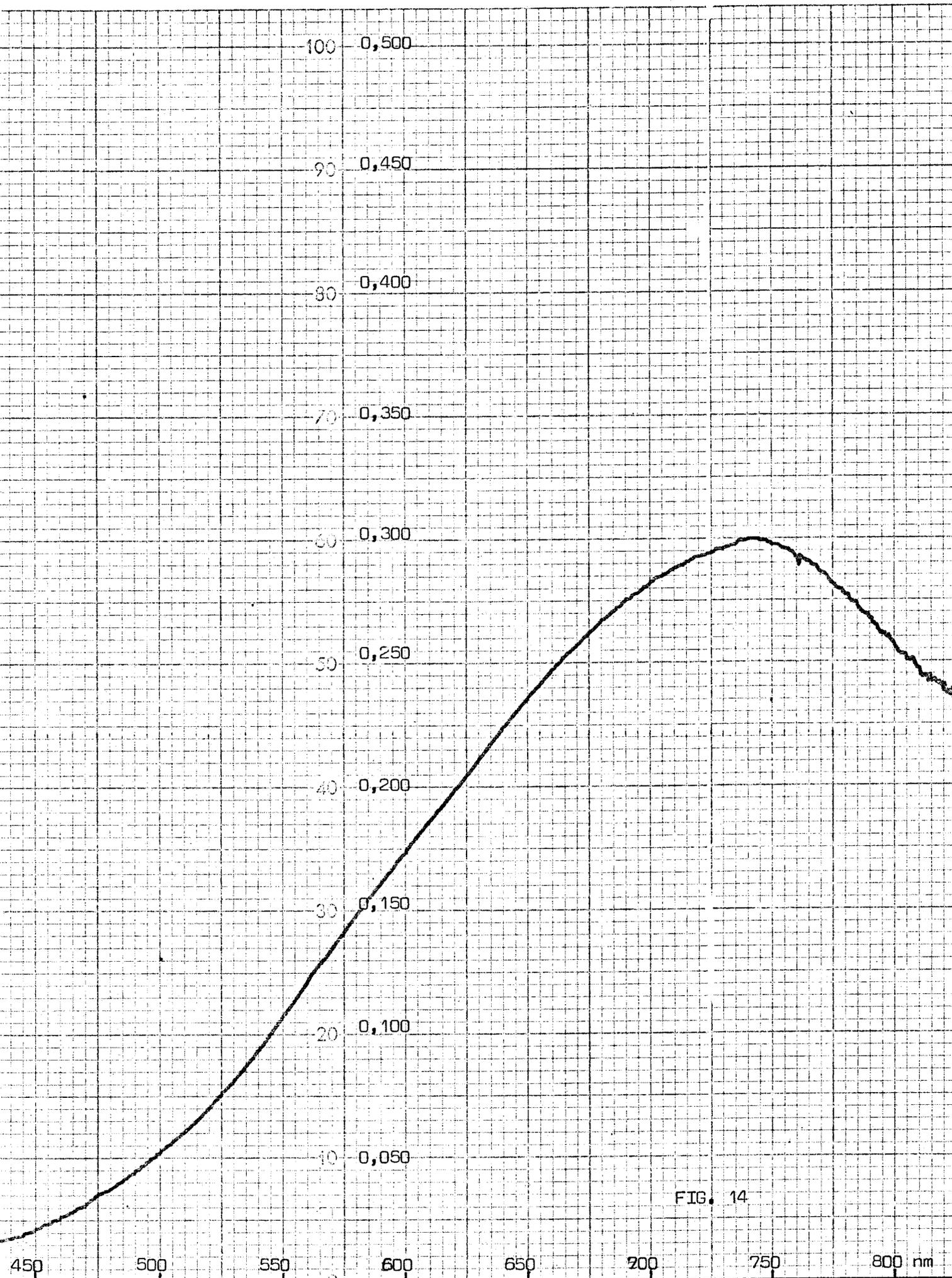


FIG. 14

intervalo de menor error relativo (d^c/c) de cocentración.

V.2. DESARROLLO Y ESTABILIDAD DEL COLOR

Nuestro método fue ensayado para estudiar el desarrollo y estabilidad del color formado. La reacción se procesó con soluciones patrones acuosas de 5 mg/dl y en otros casos con soluciones patrones acuosas de 6 mg/dl. Los resultados obtenidos aparecen en las Tablas XIV y XV. Pudimos comprobar que ya a los veinte minutos se obtenía el máximo desarrollo de color y que éste era estable durante una hora, con pequeñas variaciones no significativas de la absorbancia. En la Fig. 15 representamos los resultados obtenidos en uno de los ensayos procesados con un patrón de ácido úrico de 5 mg/dl.

V.3. LINEABILIDAD

La lineabilidad del método fue evaluada preparando curvas de calibrado con patrones de ácido úrico de concentraciones desde 1,0 hasta 12,0 mg/dl. En unos ensayos fueron usados patrones de concentraciones de 2,4,6,8,10 y 12 mg/dl, y en otros casos se usaron patrones concentrados de 100 mg/dl que se diluyeron para obtener las concentraciones

deseadas. Las absorbancias fueron medidas a intervalos iguales de tiempo y al ser representadas graficamente apareció una línea recta como representamos en la Fig. 16. Pudimos comprobar que nuestro método es lineal hasta 12,0 mg/dl.

TIEMPO EN MINUTOS	5	10	15	20	30	40	60	80
ABSORBANCIAS	0,210	0,230	0,240	0,250	0,250	0,250	0,250	0,245

TIEMPO EN MINUTOS	5	10	15	20	30	40	60	80
ABSORBANCIAS	0,220	0,235	0,245	0,250	0,250	0,255	0,250	0,250

TABLA XIV

Desarrollo y Estabilidad de color en dos ensayos con un patron de ácido úrico que contenía una concentración de 5 mg/dl.

TIEMPO EN MINUTOS	5	10	15	20	30	40	60	80
ABSORBANCIAS	0,260	0,270	0,280	0,290	0,290	0,295	0,290	0,290

TIEMPO EN MINUTOS	5	10	15	20	30	40	60	80
ABSORBANCIAS	0,260	0,270	0,280	0,300	0,300	0,300	0,300	0,300

TABLA XV

Desarrollo y Estabilidad de color en dos ensayos con un patron
que contenia una concentración de ácido úrico de 6 mg/dl.

FIG.15. Desarrollo y Estabilidad de color con un patrón de ácido urico de 5 mg/dl

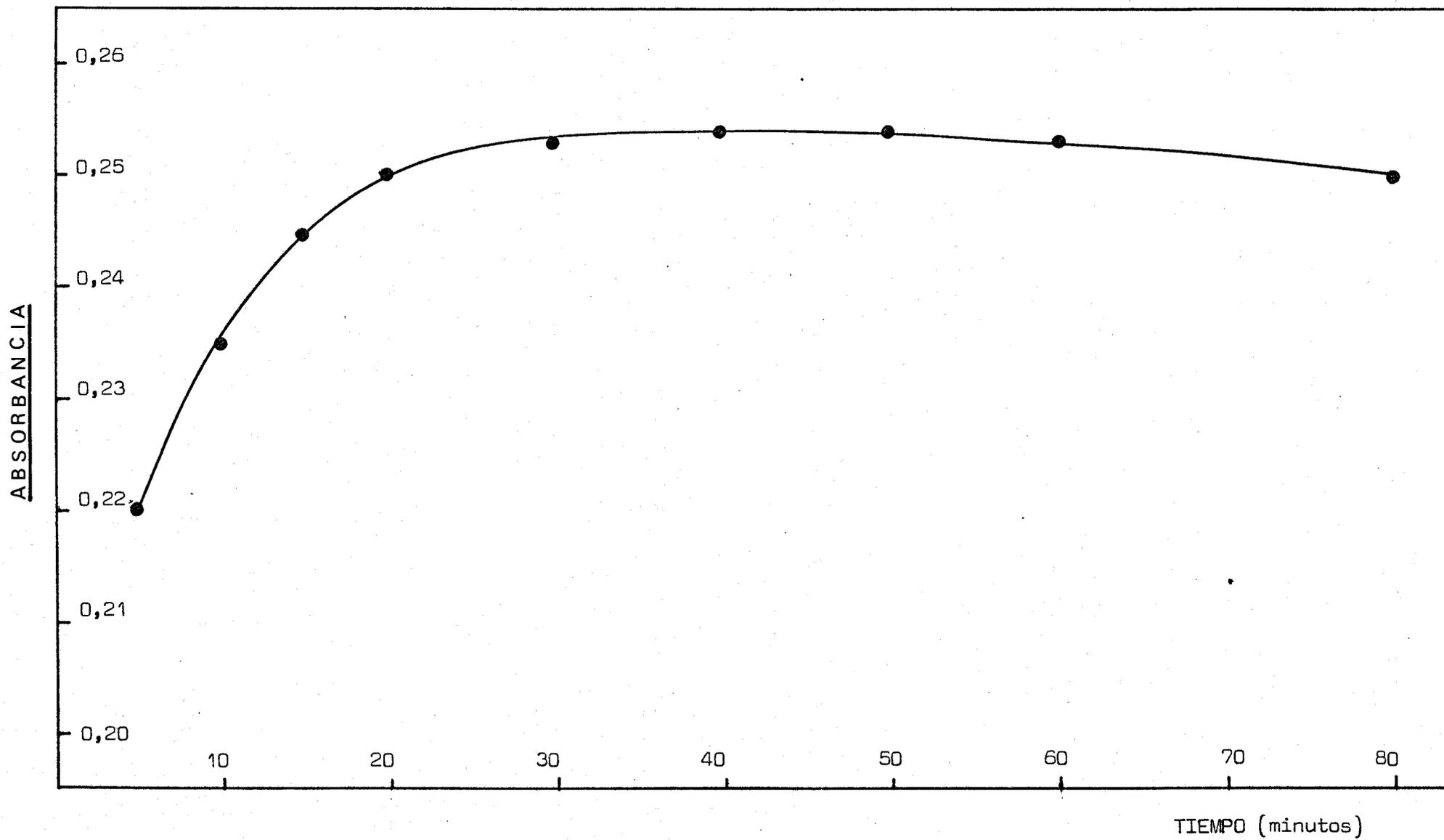
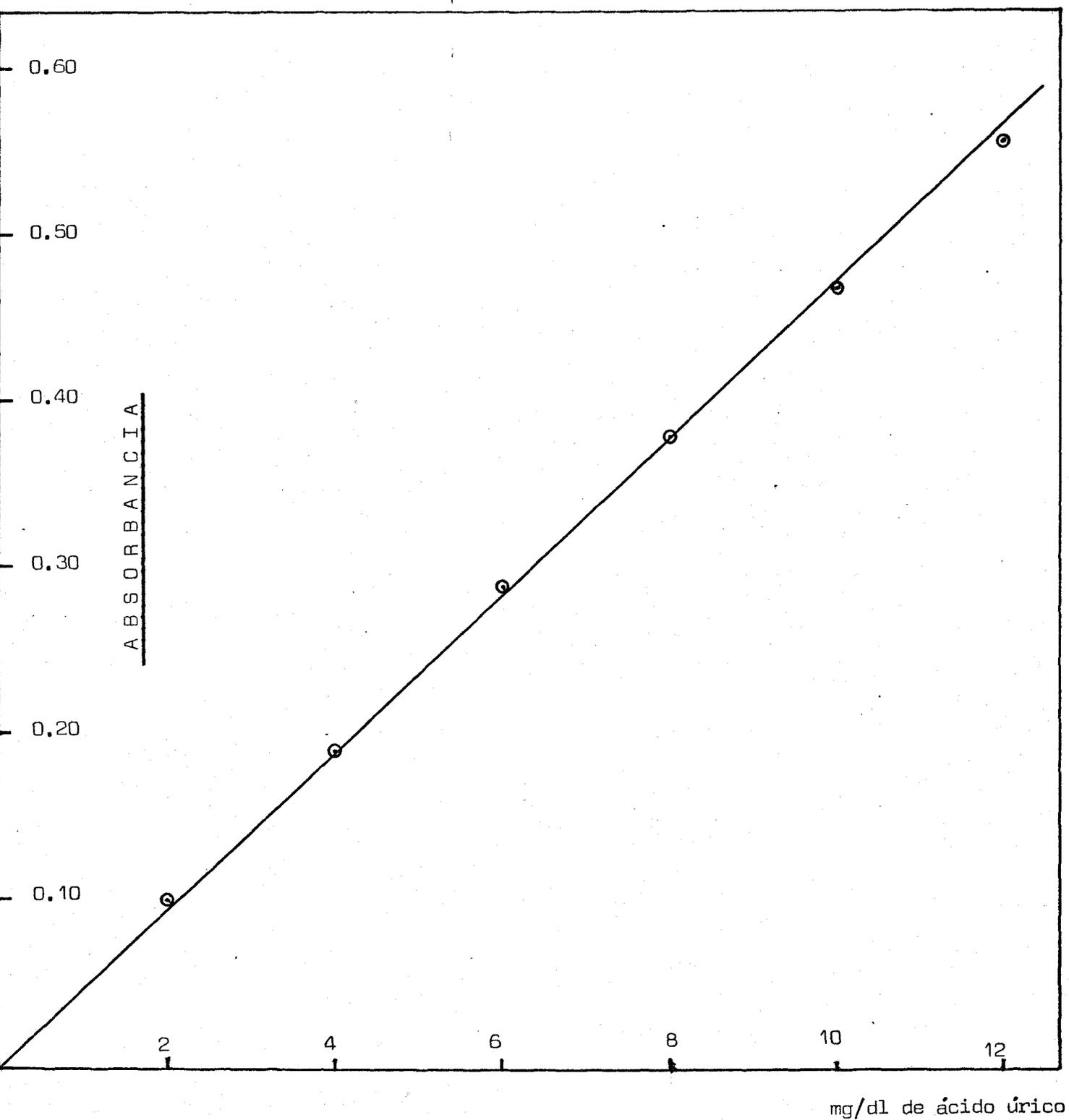


FIG. 16. Lineabilidad del metodo propuesto en ensayos con patrones acuosos de acido urico.



mg/dl de ácido úrico

V.4. PRECISION

La precisión intra-ensayo fué determinada ensayando dos "pools" de sueros de baja y alta concentración de ácido úrico, en series de 140 y 136 para el "pool" I y "pool" II respectivamente. En el "pool" I donde las series fueron de 140, la cifra média de ácido úrico fué de 2,18 mg/dl, la desviación estándar de 0,06 mg/dl y el coeficiente de variación fué 2,75 %. En el "pool" II se realizaron series de 136 con una media de concentración de ácido úrico de 7,90 mg/dl, una desviación estándar de 0,076, y un coeficiente de variación de 0,96 % (Tabla XVI).

La reproducibilidad día a día fué evaluada y comparada con los métodos de Caraway, Henry modificado y el método de la uricasa-fenol-aminofenazona (uricasa-F.A.F.), con "pools" de sueros de concentración media. Para ello el suero fué dividido en porciones de 200 ul, conservándose los viáles a -20°C. Durante 40 días consecutivos fué analizada cada alicuota por nuestro método, y los métodos yá señalados. Los resultados estadísticos de concentración media, desviación estandar y coeficiente de variación de los diferentes métodos, aparecen reflejados en la Tabla XVII, encontrándose todos ellos dentro de los valores permisibles.

TABLA XVI

Precisión intra-ensayo de nuestro método en la
determinación de ácido úrico.

PARAMETROS	"POOL" I	"POOL" II
n	140	130
\bar{X} (mg/dl)	2,18	7,90
D.S. (mg/dl)	0,06	0,076
C.V. (%)	2,75	0,96

TABLA XVII

Reproducibilidad día a día de nuestro método y otros métodos existentes en el mercado, determinada con "pools" de sueros de concentración media.

PARAMETROS	METODO PROPUESTO	CARAWAY	HENRY MOD.	URICASA- E.A.F.
n	40	40	40	40
\bar{X} (mg/dl)	4,77	4,70	5,20	4,72
D.S.(mg/dl)	0,13	0,19	0,14	0,069
C.V. (%)	2,70	4,00	2,70	1,47
limites ^s _i	5,03 4,50	5,08 4,32	5,47 4,92	4,86 4,60

FIG. 17. Reproducibilidad del método propuesto determinada día a día.

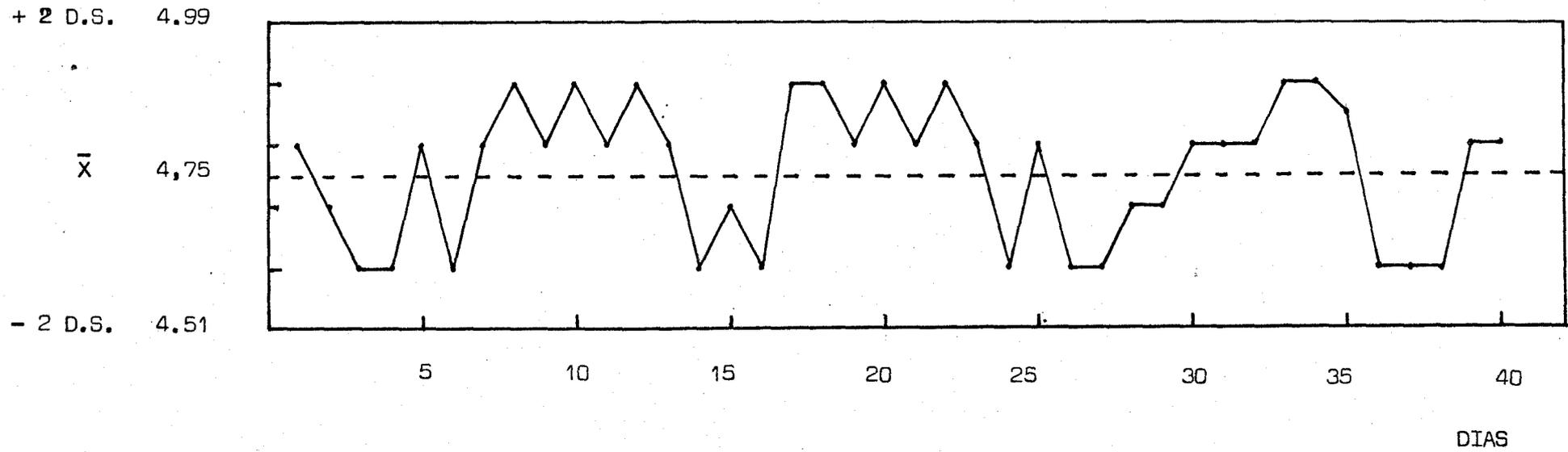


FIG.18. Reproducibilidad del método de Caraway determinada día a día.

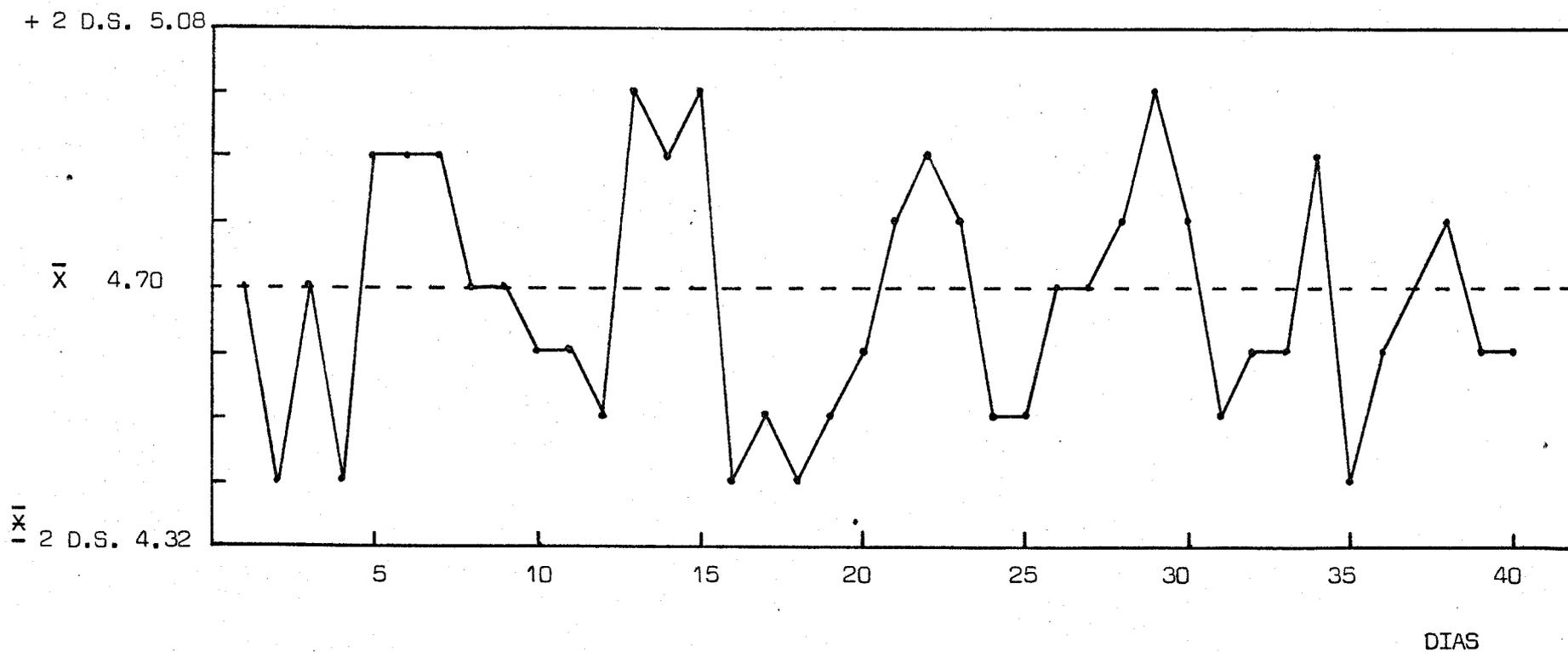


FIG. 19. Reproducibilidad del método de Henry modificado determinada día a día.

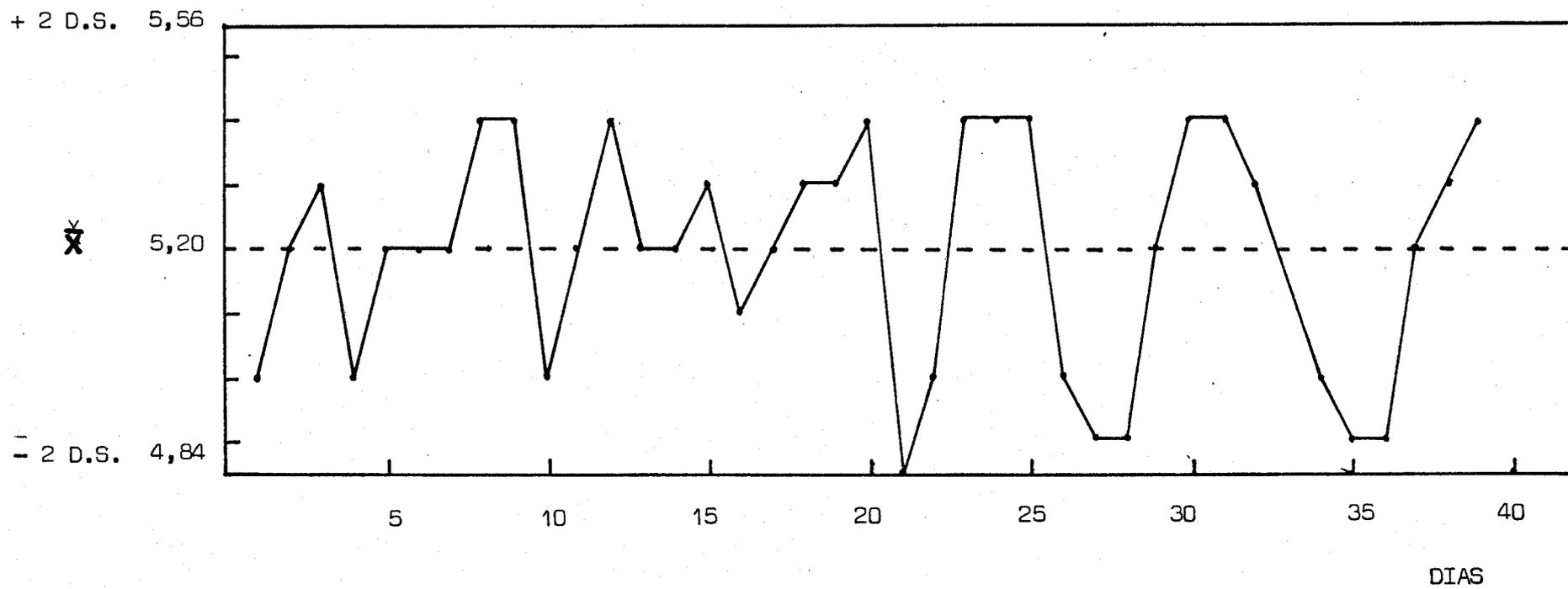
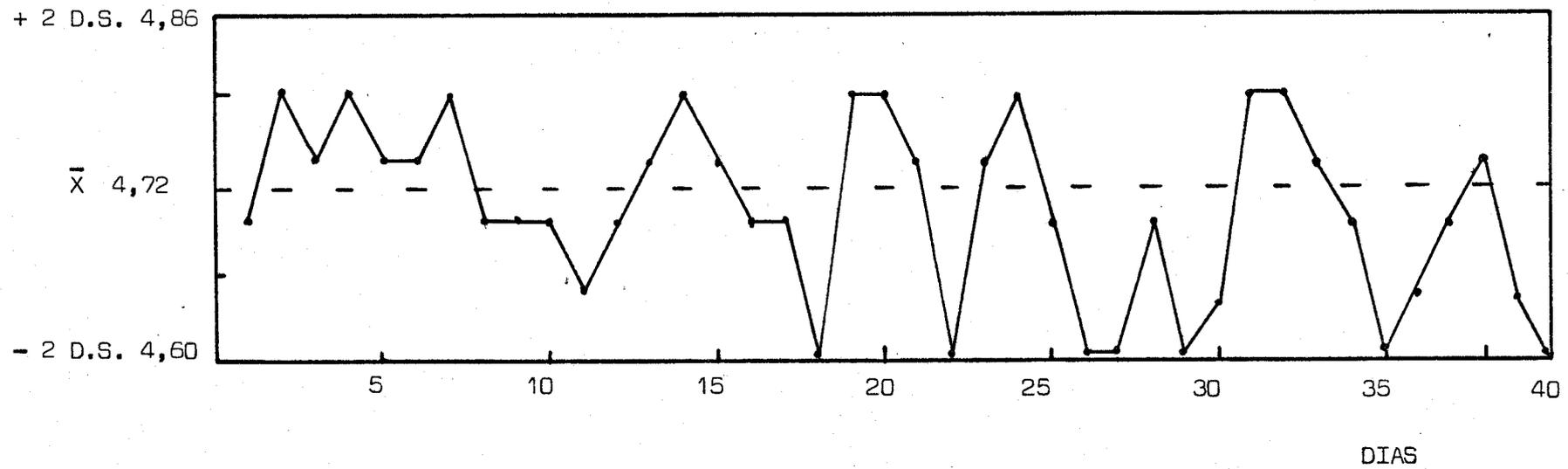


FIG. 20. Reproducibilidad del método de la Uricasa-F.A.F. determinada día a día.



Las representaciones gráficas de los controles diarios, aparecen en las figuras 17, 18, 19 y 20; y se observa que los valores se mantienen comprendidos entre ± 2 D.S.

V.5. EXACTITUD

En los estudios de correlación, nosotros comparamos el método propuesto con el método de Caraway, Henry modificado y el método de la Uricasa-fenol-aminofenazona. Para ello determinamos el ácido úrico en el suero de 100 pacientes que contenían una concentración de ácido úrico entre 2,0 y 10,5 mg/dl. La correlación entre nuestro método y el de Caraway arrojó una curva de regresión lineal de: $y = 1,04 x + 0,006$; donde el coeficiente de correlación fué de : $r = 1,0034$; $\bar{X} = 5,036$ e $\bar{y} = 5,24$; siendo \bar{X} la concentración media de ácido úrico de los 100 sueros ensayados para el método de Caraway; e \bar{y} es la concentración media obtenida con nuestro método.

La comparación de nuestro método con el de Henry mod. tuvo una ecuación: $y = 0,968 x + 0,113$; $r = 1,003$; $\bar{y} = 5,24$ mg/dl (concentración media de ácido úrico para nuestro método) y $\bar{X} = 5,30$ mg/dl (concentración media para el método de Henry), siendo $n = 100$.

Y por último la correlación encontrada entre nuestro método y el de la Uricasa-F.A.F. fué la siguiente para $n=100$:

$$y = 1,093 + 0,72 \cdot x ; r = 0,986 ;$$

y la concentración media de ácido úrico por el método de la Uricasa-F.A.F. fué de $\bar{y}=4,38$, siendo $\bar{X}= 4,56$. Los resultados aparecen representados en las gráficas de las figuras 21, 22 y 23.

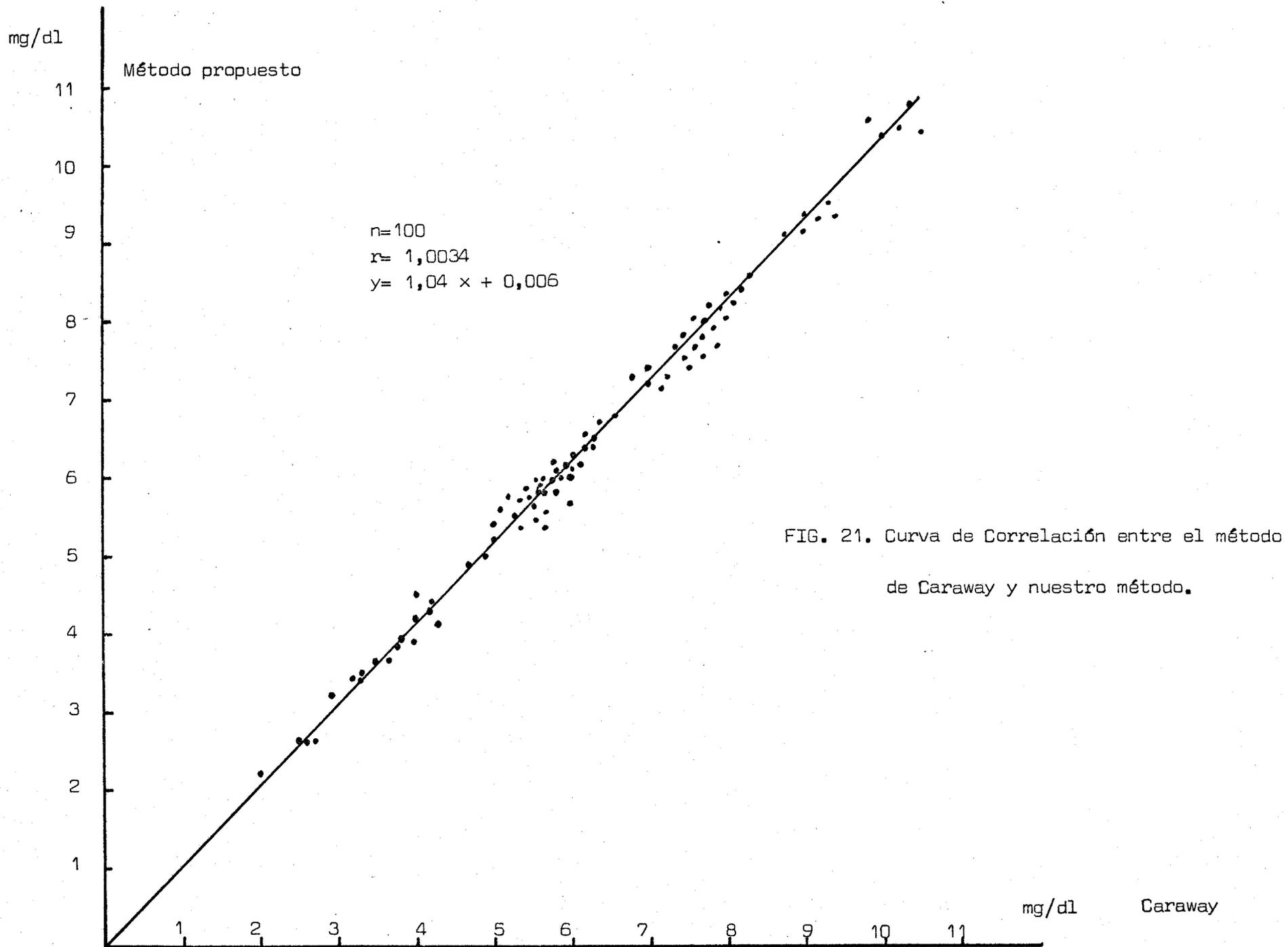


FIG. 21. Curva de Correlación entre el método de Caraway y nuestro método.

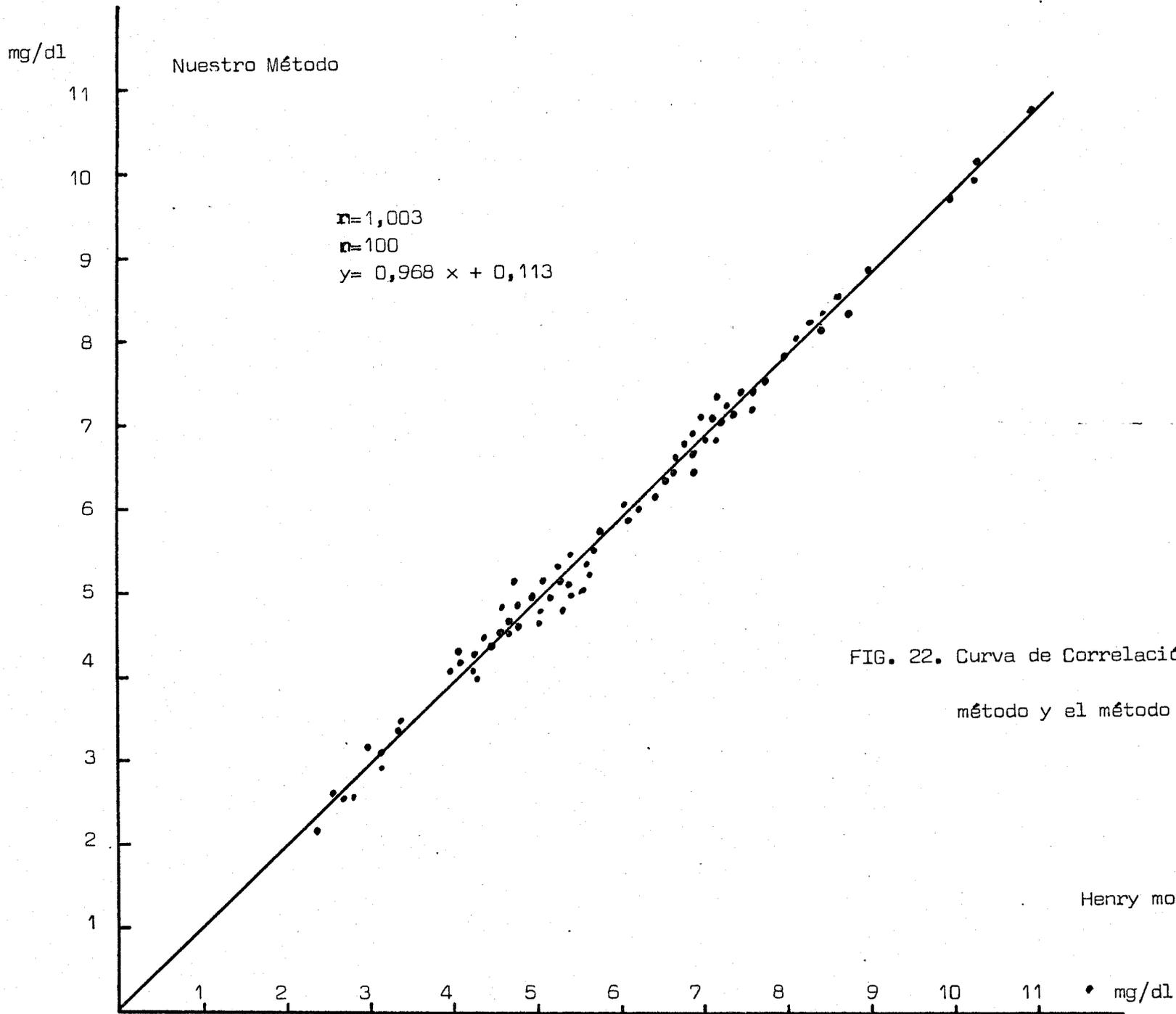


FIG. 22. Curva de Correlación entre nuestro método y el método de Henry mod.

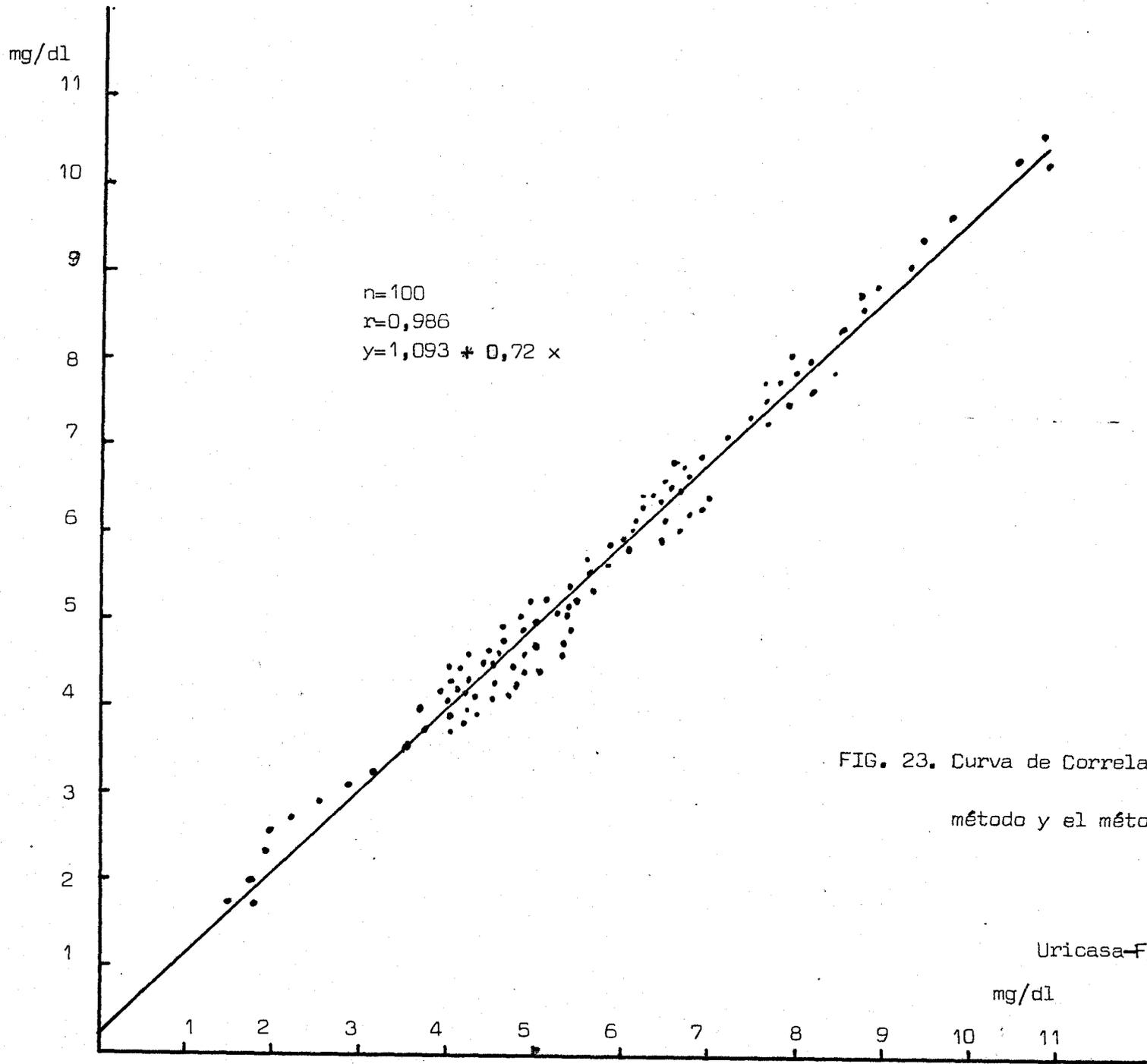


FIG. 23. Curva de Correlación entre nuestro método y el método de la Uricasa-F.A.F.

V.6. INTERFERENCIAS

Los errores que producen ciertas sustancias presentes, normal ó anormalmente, en los sueros sometidos a análisis de rutina de ácido úrico, fueron examinados con nuestro método. Se estudiaron las posibles interferencias de anticoagulantes, proteínas del suero, la hemolisis, glucosa y lipemia.

6.1. INTERFERENCIAS DE ANTICOAGULANTES

Citrato sódico.- Obtuvimos suero y plasma de un mismo paciente, y le fuimos determinando el ácido úrico por duplicado con nuestro método. El plasma fué obtenido añadiéndole citrato sódico a la sangre recién extraída a una concentración de 0,7 g/dl de sangre total. Se utilizó para éstas experiencias muestras de 18 pacientes, suficientes para demostrar que el citrato sódico empleado como anticoagulante en las extracciones de sangre, no interfiere en nuestro método. Los resultados aparecen representados en la Tabla XVIII.

Heparina.- Realizamos las mismas experiencias sin obtener varia ción alguna en la concentración de ácido úrico. Los resultados aparecen en la Tabla XIX y la heparina se utilizó a una concentra ción de 0,2 g/dl de sangre total.

TABLA XVIII

Interferencias del citrato sódico en la determinación de ácido urico por el método propuesto.

MUESTRAS ENSAYADAS	ACIDO URICO (mg/dl)	
	SUERO	PLASMA (citrato)
1	3,9	3,9
2	6,2	6,2
3	4,7	4,7
4	5,2	5,2
5	4,6	4,6
6	3,3	3,3
7	7,1	7,1
8	7,0	7,0
9	6,5	6,5
10	5,8	5,8
11	2,9	2,9
12	4,7	4,7
13	8,0	8,0
14	4,5	4,5
15	4,3	4,3
16	4,8	4,8
17	5,1	5,1
18	6,0	6,0

Nota: El citrato sodico se utilizó a una concentración de 0,7 g/dl para la obtención de plasma.

TABLA XIX

Interferencias de la heparina en la determinación de ácido urico por el método propuesto.

MUESTRAS ENSAYADAS	ACIDO URICO (mg/dl)	
	SUERO	PLASMA (heparina)
1	4,7	4,7
2	6,6	6,6
3	5,2	5,2
4	5,6	5,6
5	5,0	5,0
6	4,8	4,8
7	5,1	5,1
8	6,8	6,8
9	7,1	7,1
10	7,0	7,0
11	2,9	2,9
12	4,2	4,2
13	3,3	3,3
14	5,3	5,3
15	6,8	6,8
16	4,9	4,9
17	4,7	4,7
18	3,9	3,9

Nota: La heparina se utilizó a una concentración de 0,2 g/dl para la obtención de plasma.

Mezcla de Oxalatos.- Así mismo se efectuaron las determinaciones de ácido úrico utilizando la mezcla de oxalatos como agente anti-coagulante para la obtención de plasma. Los resultados reflejados en la Tabla XX muestran ligeras variaciones que no se traducen en grandes errores en la determinación del ácido úrico. Y por lo tanto podemos decir que la mezcla de oxalatos tampoco interfiere en nuestro método.

Etilen-Diamino-Tetra-Acético y Fluoruro potásico.-

En este caso, las reacciones hechas con plasma obtenido con éste anticoagulante dieron una turbidez con precipitado que impidió la lectura. Por lo tanto el EDTA-FK interfiere en nuestro método.

6.2. INTERFERENCIAS DE LA HEMOLISIS

Esta posible interferencia fué estudiada añadiéndole a un suero distintas concentraciones de hemoglobina, y luego se determinó el ácido úrico por nuestro método. En la Tabla XXI aparece la influencia de la concentración de hemoglobina (expresada en grados de hemolisis) en la determinación del ácido úrico por el método que proponemos. Se vé que hasta un grado de hemolisis (0,1 g/dl de hemoglobina), nuestro método es tolerable, pero a partir de 0,5 g/dl de hemoglobina (dos grados de hemolisis) aparecen desviaciones importantes. Sin embargo es importante resaltar que a éste grado de hemolisis interfieren todas las pruebas existentes en los laboratorios clínicos.

TABLA XX

Interferencias de la mezcla de oxalatos en la determinación de ácido urico por el método propuesto.

MUESTRAS ENSAYADAS	ACIDO URICO (mg/dl)	
	SUERO	PLASMA (mezcla oxalatos)
1	5,4	5,5
2	7,4	7,5
3	5,4	5,4
4	5,8	5,7
5	5,6	5,7
6	6,3	6,5
7	7,0	7,2
8	3,9	3,9
9	4,2	4,2
10	7,3	7,5
11	6,2	6,2
12	3,7	3,7
13	8,3	8,5
14	6,0	6,0
15	4,3	4,1
16	6,2	6,2
17	5,3	5,4
18	5,7	5,8

Nota: La mezcla de oxalatos se utilizó a una concentración de 0,3 g/dl para la obtención de plasma.

TABLA XXI

Interferencias de la hemolisis en el metodo propuesto.

GRADO DE HEMOLISIS	HEMOGLOBINA (g/dl)	AC. URICO (mg/dl)
0	0	4,6
1+	0,1	4,6
2+	0,5	4,9
3+	2,0	5,4

6.3. INTERFERENCIAS DE LAS PROTEINAS

Se seleccionaron sueros a los que le añadimos albúmina bovina hasta obtener un contenido total de proteínas de 8,0 , 8,6 , 9,4 , 10,0 y 11,2 g/dl (determinado por el método del biuret), y le determinamos el ácido úrico por nuestro método. En todos los casos, los enturbiamientos iniciales producidos desaparecieron (antes de cinco minutos) rápidamente, redisolviéndose las proteínas y la concentración de ácido úrico no sufrió variación hasta un valor de 11,2 g/dl de proteínas totales, cifra que no se encuentra en el suero de un paciente. En la Tabla XXII expresamos estos resultados.

6.4. INTERFERENCIA DE LA GLUCEMIA

Estudiamos la interferencia de la glucosa en sangre, en distintos sueros a los que se añadió glucosa hasta obtener concentraciones de 64, 160, 280 y 400 mg/dl. La glucemia fue determinada por el método de la glucosa-oxidasa. Estas experiencias fueron extendidas a 20 sueros y se vio que incluso en concentraciones de hasta 400 mg/dl no hubo variación en la concentración de ácido úrico (Tabla XXIII).

TABLA XXII

Interferencias de las proteínas del suero en la determinación de ácido urico por el método propuesto.

POOLS DE SUEROS	PROTEINAS TOTALES (g/dl)	ACIDO URICO (mg/dl)
1	8,0	6,0
2	8,6	6,0
3	9,4	6,0
4	10,0	6,0
5	11,2	5,8

Nota: Las proteínas totales fueron determinadas por el método del biuret.

TABLA XXIII

Interferencias de la glucemia en la determinación de ácido urico por el método propuesto.

POOLS DE SUEROS	GLUCEMIA (mg/dl)	ACIDO URICO (mg/dl)
1	64	5,7
2	160	5,7
3	280	5,7
4	400	5,7

Nota: La glucosa fué determinada por el método de la glucosa-oxidasa.

VI. DISCUSION DE LOS RESULTADOS

A la vista de los resultados obtenidos en las experiencias del apartado anterior, llegamos a los resultados siguientes:

La dificultad principal para dar con un buen método de determinación de ácido úrico estriba en dos puntos principales:

a) Encontrar un buen detergente cuya acción surfactante sea lo suficientemente eficaz para evitar la precipitación de las proteínas de la muestra, sin detrimento de la sensibilidad de la reacción y estabilidad del color formado.

b) Encontrar una solución tampón capaz de llevar la mezcla de la reacción a un pH final entre 10,20 y 10,40, y al mismo tiempo que no perjudique el desarrollo del color formado.

El detergente es utilizado para diluir el ácido fosfotúngstico y la mejor concentración para éste cometido es al 4 % en agua destilada. Así mismo, el detergente debe estar con el ácido fosfotúngstico a una proporción de 1:5, para encontrar unas óptimas condiciones analíticas.

De la misma manera, y a la vista de los resultados obtenidos, el tampón debe estar formado por un 4 % de carbonato sódico (p/v) y un 4 % de T.E.A. (v/v). Esta concentración es la idónea para que la mezcla final de la reacción se mantenga en un

pH entre 10,20 y 10,40, que es el rango ideal para obtener el 100 % de sensibilidad de la reacción.

La composición del ácido fosfotúngstico guarda las mismas relaciones que mantiene el ácido fosfotúngstico formado por FOLIN y DENIS (1912).

El método es fácil de realizar, se procesa en sólo dos pasos y guarda unas características equiparables al método enzimático de la Uricasa-fenol-aminofenazona. Así mismo, es asequible al pequeño laboratorio por el bajo coste, fácil manejo e instrumental poco sofisticado. A los veinte minutos ya el desarrollo de color es completo y el color es estable una hora más tarde. Por otra parte, el método es lineal hasta 12,0 mg/dl.

Al analizar la precisión y exactitud del método propuesto comparado a la de otros métodos existentes en el mercado, los resultados han sido satisfactorios y las diferencias no son significativas entre ellos. Al analizar la precisión intra-ensayo del método para un "pool" I de concentración media baja, $\bar{X} = 2,18$ mg/dl, la desviación estandar obtenida fué de 0,06 mg/dl y el coeficiente de variación de 2,76 %. Y cuando analizamos un "pool" II de concentración media elevada, $\bar{X} = 7,90$ mg/dl, la desviación estandar fué de 0,076 mg/dl y el coeficiente

de variación de 0,96 %.

Al analizar la reproducibilidad del método y comparado con otros métodos, se vió que el método de menor desviación estandar es el método de la Uricasa-F.A.F. con una desviación estandar de 0,069 mg/dl, y el de mayor desviación estandar fué el de Caraway con 0,19 mg/dl; igualmente, el coeficiente de variación del método de Caraway fué el más alto, con un 4 % y el de menor coeficiente de variación fué el de la Uricasa-F.A.F. con 1,47 %. Nuestro método arrojó un coeficiente de variación de 2,7 %. Por esto, podemos decir que el método propuesto posee una desviación estandar y un coeficiente de variación mas que satisfactorias para un método colorimétrico, y de mejores condiciones estadísticas al método de Caraway e incluso al de Henry modificado. El método que mostró mayores desviaciones fué el de Caraway, probablemente debido a la desproteínización, que lleva consigo una pérdida de ácido úrico que va ligado a las proteínas.

De todo lo expuesto se vé claramente que el método de la Uricasa-F.A.F. arrojó los resultados mas satisfactorios, sin embargo dentro de los métodos quimicos, el método propuesto tuvo unos resultados muy similares al de la Uricasa-F.A.F. y de mejores resultados estadísticos a los métodos quimicos comparados.

En los estudios de correlación se vió que el coeficiente de correlación con el método de Henry fué de $r=1,003$; con el de Caraway de $r=1,0034$, y el coeficiente de correlación con el método de la Uricasa-F.A.F. fué de $0,986$. Se vió claramente que los métodos químicos mantenían una relación muy estrecha entre ellos.

Por último, señalar que el método propuesto puede ser determinado tanto en suero como en plasma obtenido con citrato sódico, heparina u oxalato; sin embargo no debe de utilizarse la mezcla de EDTA-FK. La hemólisis interfiere a un grado muy alto, o sea para concentraciones de hemoglobina muy altas; y las proteínas (que son donde verdaderamente interfieren los métodos químicos) son redisueltas y no interfieren hasta concentraciones de $10-11$ mg/dl. Así mismo la glucemia no interfiere el método.

VII. CONCLUSIONES

1. Proponemos un micrométodo directo, sin desproteínización, para la determinación de ácido úrico en fluidos biológicos.
2. La precisión del método propuesto, indicada por el coeficiente de variación es satisfactoria, siendo de 2,75 % para el "pool" I de baja concentración, y 0,96 % para el "pool" II de alta concentración, en determinaciones intra-ensayo; y de 2,70 % cuando fué determinada día a día.
3. El método propuesto cumple la ley de Beer hasta una concentración de ácido úrico de 12,0 mg/dl de suero ó plasma.
4. El máximo de color es obtenido a los veinte minutos y es estable durante 60 minutos después.
5. En la precisión determinada día a día indicada por el coeficiente de variación, se muestra nuestro método con una precisión entre el método de la Uricasa-F.A.F. con un coeficiente de variación de 1,47 % , y el de Caraway que es de 4,0 %, siendo el coeficiente de variación del método propuesto de 2,7 %, al igual que el método de Henry.

6. El método puede ser determinado tanto en suero como en plasma sin que interfieran los anticoagulantes normalmente utilizados.
7. Los coeficientes de correlación con los métodos químicos ($r=1,0034$ con el de Caraway, y $r=1,003$ con el de Henry) indicaron que el método se muestra más exacto a estos que al método enzimático de la Uricasa-F.A.F., sin embargo las diferencias de concentración de ácido úrico con éste método no fueron significativas.
8. El método propuesto se muestra más sencillo a los métodos químicos convencionales, siendo éste de fácil manejo, bajo coste y de instrumentación poco sofisticada.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- ACHESON y O'BRIEN, Lancet, 2, 777 (1966)
- CANTAROW y SCHEPARTZ, Biochem., 4 edic., Philadelphia, 1967.
- CARAWAY, W.T., Amer. J.Clin. Path. 25 (7) 840-845 (1955)
- CARAWAY, W.T., Stand. Meth. of Clin. Chem., 4 , 239 (1963)
- CHRISTEN y col., Europ. J. Biochem., 12, 3 (1971)
- DUFF y col., Arthr. and Rheum., 11, 184 (1968)
- FOLIN O., J. Biol. Chem. 12 239-43 (1912)
- FOLIN O. y DENIS W., J.Biol. Chem. 13, 469 (1912)
- FOLIN y Wu en "Quimica Clinica.Bases y Principios"
R.J. Henry. Ed. Jim. Barcelona, 1969.
- GENER-SEGUI, J. colab.: Lab. Knickerbocker (1976)
- GUTMAN, A.B., Arthr. and Rheum., 8, 665 (1965)
- HENRY, R.J. and colab., J. Clin. Path. 28 , 158 (1957)
- LANG y col., Klin. Wschr., 53, 261 (1975)
- MACLACHLAN y RODNAN, Amer. J. Med., 42, 38 (1967)
- MERTZ, D.P., Gicht, Thieme, Stuttgart, 1971
- OPAL E., HEPLER y M. STOSKOPF., Amer. J. Clin. Pathol., 22 , 72-76
(1952)

SEEGMILLER, J. E., en BONDY y ROSENBERG (eds), 7ª ed.,

Saunders, Filadelfia, 655, 1974

SOBRINHO-SIMÕES., J. Labor. Clin.Med., 65, 665 (1965)

SORENSEN, L. B., Advanc. intern. Med., 15, 177 (1969)

WACKER, W.E., New Engl. J.Med., 283, 151 (1970)

ZOLLNER,N., en LANG y col. (eds), Berlin, 81, 1973