

APARTADO III

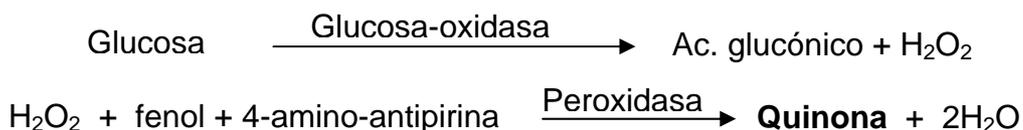
DETERMINACIONES COLORIMÉTRICAS ESPECÍFICAS DE COMPUESTOS: DETERMINACIÓN DE GLUCOSA (MÉTODO GLUCOSA - OXIDASA). DETERMINACIÓN DE NITRITO (MÉTODO DE LA SULFANILAMIDA:N-NEDA)

(Emilio Fernández, Aurora Galván, Isaac Túnez)

3(III). PROTOCOLO A REALIZAR

3(III).1. Determinación de glucosa (método glucosa - oxidasa)

Está basado en el esquema indicado a continuación. La glucosa oxidasa oxida a la glucosa originando ácido glucónico y H₂O₂. El peróxido de hidrógeno liberado reacciona con un cromógeno (fenol/4-aminoantipirina) por la reacción de Trinder, para dar una quinona que absorbe entre 492 y 550 nm. La intensidad de color producida es directamente proporcional a la concentración de glucosa.



Puede analizarse por este método cualquier muestra: suero libre de hemólisis, plasma, líquido cefalorraquídeo, orina, un hidrolizado de muestras de hígado para valorar glucógeno etc.

1. Paso primero: Pipetear en tubos marcados como: blanco, estándar y muestras, los reactivos indicados (composición en Anexo). Incluir tantos tubos de muestras como se considere conveniente. Añadir en último lugar el reactivo para comenzar la reacción.

<u>Reactivos</u>	<u>Blanco</u>	<u>Estándar</u>	<u>Problema</u>
Estándar (glucosa, 100 mg/dL)	---	20 µL	---
Muestra	---	---	20 µL
Reactivo	2 mL	2 mL	2 mL

2. Paso segundo: Incubar, 15 min a 37 °C ó 30 min a temperatura ambiente.

3. Paso tercero: Ajustar el espectrofotómetro a cero de absorbancia (DO) a la longitud de onda de 500 nm y utilizando el tubo blanco, y leer los tubos restantes.

3(III).2. Determinación de nitrito (método de la sulfanilamida:N-NEDA)

En medio ácido, el nitrito reacciona con la sulfanilamida para producir una sal de diazonio, la cual reacciona a su vez con el dicloruro de N-naftol-1-etilendiamino (N-NEDA), una amina aromática, para dar lugar a un compuesto rosa fucsia de intensidad proporcional a la concentración de nitrito.

1. Paso primero: Preparar 8 tubos de acuerdo a la siguiente tabla: blanco, seis con diferentes concentraciones de nitrito y un último tubo con la muestra.

La composición de los reactivos (Sulfanilamida y N-NEDA) y de KNO₂ se muestran en el Anexo.

Tubo n°	Reactivos					Resultados	
	KNO ₂	Muestra	H ₂ O	Sulfa	N-NEDA	KNO ₂ mmol/tubo	Absorb. a 540 nm
Blanco	-	-	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL	0	0
1	0,1 mL	-	0,9 mL	1,0 mL	1,0 mL	10	-
2	0,2 mL	-	0,8 mL	1,0 mL	1,0 mL	20	-
3	0,4 mL	-	0,6 mL	1,0 mL	1,0 mL	40	-
4	0,6 mL	-	0,4 mL	1,0 mL	1,0 mL	60	-
5	0,8 mL	-	0,2 mL	1,0 mL	1,0 mL	80	-
6	1,0 mL	-	-	1,0 mL	1,0 mL	100	-
M	-	1,0 mL	-	1,0 mL	1,0 mL	-	-

2. Paso segundo: Leer la absorbancia de los tubos a 540 nm, haciendo previamente el cero de absorbancia en el espectrofotómetro con el tubo blanco.

4(III).1. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4(III).1. Determinación de glucosa (método glucosa - oxidasa)

Con los valores de absorbancia (DO) del estándar y de los tubos problema se puede calcular la concentración de glucosa en la muestra.

$$\text{Conc. problema} = \frac{\text{DO problema} \times \text{concentración estándar}}{\text{DO estándar}}$$

Valores normales:

Suero o plasma: 70 - 110 mg/ dL

L.C.R.: 50 - 70 mg/ dL

Orina: No contiene, en condiciones fisiológicas normales.

4(III).2. Determinación de nitrito (método de la sulfanilamida:N-NEDA)

1. Paso primero: Representar la recta de calibrado con los datos de absorbancia y las correspondientes concentraciones de nitrito.

2. Paso segundo: Calcular el coeficiente de extinción molar y,

3. Paso tercero: Calcular la concentración de nitrito del tubo problema M

La detección de nitrito se basa en que en el medio ácido de la reacción se forma ácido nitroso, el cual reacciona con la amina N-NEDA y ésta ya modificada (sal de diazonio) reacciona con la sulfanilamida con formación del cromóforo que se detecta a 540 nm.

La capacidad de reaccionar el ácido nitroso con aminas (grupos amino de proteínas y bases nitrogenadas) ha limitado la adición de nitrito a embutidos como conservante.

ANEXO (APARTADO III): MEDIOS, SOLUCIONES Y MATERIAL BIOLÓGICO EMPLEADO

Glucosa oxidasa	12.000 UI/L
Peroxidasa (POD)	660 UI/L
4-amino-antipirina (4AP)	0,4 mmol/L
Fenol	0,63 mmol/L
Tampón fosfato pH 7,4	100 mmol/L

Reactivo de sulfanilamida	5 g de sulfanilamida en 500 mL de solución ácida formada por 100 mL de HCl concentrado y 400 mL de agua destilada. Guardar en frasco topacio.
Estándar de KNO ₂	0,1 mM
Reactivo de N-NEDA	dicloruro de N-naftol-1-etilendiamino 100 mg/500 mL agua

6. BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

D.J. Holme, H. Peck (1983) Espectroscopía. En: "Bioquímica Analítica". Editorial Acribia (Zaragoza, España), pp. 34-83. *Teoría y práctica de las técnicas espectroscópicas*.

González de Buitrago JM (1985): Fotometría. En González de Buitrago JM (ed): "Técnicas de Laboratorio Clínico", 1ª ed. Editorial Alhambra (Madrid, España), pp. 82-109.

González de Buitrago JM (1998): Técnicas espectrométricas. En González de Buitrago JM, Arilla E, Rodríguez-Segade M, Sánchez A (eds): "Bioquímica Clínica", 1ª ed. Editorial McGraw-Hill Interamericana (Madrid, España), pp. 7-16.

Khazanie P (1995): Espectrofotometría. En Anderson SC, Cockayne (eds): "Química Clínica", 1ª ed. Editorial Interamericana McGraw-Hill (México D.F., México), pp. 74-93.

Stryer L, Berg JM, Tymoczko JL (2003) Investigación en proteínas. En: "Bioquímica", 5ª ed. Editorial Reverté (Barcelona, España), pp. 77-116. *Muestra la evolución de las técnicas de investigación en proteínas, comenzando por la detección de la actividad de una enzima mediante espectrofotometría*.