

Tesis de Posgrado

Valoración colorimétrica de urea en líquidos biológicos

Martini, Pedro Domingo Hugo

1956

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Martini, Pedro Domingo Hugo. (1956). Valoración colorimétrica de urea en líquidos biológicos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0903_Martini.pdf

Cita tipo Chicago:

Martini, Pedro Domingo Hugo. "Valoración colorimétrica de urea en líquidos biológicos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1956. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0903_Martini.pdf

-----OO-----

"VALORACION COLORIMETRICA DE UREA EN LIQUIDOS BIOLOGICOS"

por

PEDRO DOMINGO HUGO MARTINI

T E S I S

para optar al título de

DOCTOR EN QUIMICA

(orientación Química Analítica)

-- --o-----

efectuó un estudio bibliográfico y recopilación de las técnicas para determinación colorimétrica directa de urea.-

los métodos estudiados se seleccionó el que emplea como reactivo la diamilmonoxima, por presentar una aplicación práctica directa debido a su sencillez y exactitud.-

la técnica elegida se le introdujeron modificaciones en cuanto a la composición de las soluciones testigo y reactivos y al proceso analítico basadas en el estudio práctico realizado a los efectos de adaptarla al dosaje de urea en sangre y orina.-

los resultados obtenidos mediante las modificaciones tendientes a aumentar la sencillez y exactitud del método fueron satisfactorios.- Puede decirse que la técnica analítica propuesta reúne las condiciones necesarias, como demuestra el estudio estadístico efectuado, para ser considerada en igualdad de condiciones con otras aceptadas unánimemente por su exactitud, pero ejecución más laboriosa.-

realizó un estudio estadístico de los resultados analíticos obtenidos con la técnica propuesta y con la de la ureasa. Se llega así a la conclusión que las diferencias observadas en los valores numéricos carecen de significación estadística.-

efectuó el estudio de otro método de valoración colorimétrica de la urea basado en la reacción entre ésta y el furfural o sus derivados (en particular acetato de furfural), proponiéndose una técnica para dosaje de urea en orina.-

-----OO-----

Martini

BIBLIOTECA CENTRAL
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
Y NATURALES

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

-----o-----
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

"VALORACION COLORIMETRICA DE UREA EN LIQUIDOS BIOLOGICOS"

por

PEDRO DOMINGO HUGO MARTINI

T E S I S

para optar al título de

DOCTOR EN QUIMICA

(orientación Química Analítica)

-----o-----

65677

Buenos Aires

993

1 9 5 6

993

VALORACION COLORIMETRICA DE UREA

EN LIQUIDOS BIOLOGICOS

Al Dr. Pedro V. Mazzocco

Padrino de Tesis:

Dr. Ventura Morera

Deseo expresar mi agradecimiento al Dr. Ventura Morera, Profesor Titular de Análisis Biológicos por haber tomado bajo su dirección el presente trabajo.--

A él debo la sugerencia de este estudio, una orientación constante a lo largo del mismo, y el aporte valioso de sus experiencias personales en lo relativo a las reacciones entre furfural y urea.--

También deseo agradecer a la Dra. Rosa M. Ferro, Profesor Adjunto de Análisis Biológicos sus valiosas indicaciones en lo relativo al estudio estadístico de los resultados analíticos obtenidos.--

PARTE GENERAL

Reacciones de coloración de la urea	1
Reacciones de coloración empleando furfural y derivados.....	3
Reacciones de coloración empleando metil furilo de oxiclóruo de fósforo	9
Determinación colorimétrica empleando p-Dimetilaminobenzaldehido.	15
Determinación colorimétrica de la urea empleando resorcina	18
Reacciones de coloración de la urea empleando ácido fosfotúngstico	22
Determinación colorimétrica de la urea empleando ácido sulfanílico	24
Determinación colorimétrica de la urea empleando diacetilo	28
Determinación colorimétrica de la urea empleando diacetilmonoxima.	31
Determinación colorimétrica de la urea empleando alfa. Isonitroso-propiofenona	37

PARTE EXPERIMENTAL

Método de la diacetilmonoxima	43
Influencia de la acidez del medio	46
Influencia de la concentración de oxidante	49
Influencia del tiempo en la densidad óptica de la reacción	50
Influencia de la longitud de onda	51
Reproductibilidad de los ensayos	52
Cumplimiento de la ley de Lambert-Beer	53
Comparación de los valores obtenidos	56
Estudio estadístico	62
Preparación de un testigo artificial estable	66
Preparación de diacetilmonoxima	69
Reacción colorimétrica de la urea con el furfural y sus derivados.	72
Determinación colorimétrica de la urea por medio del furfural	74
Determ. colorimétrica de la urea por medio del acetato de furfural.	76
Preparación del diacetato de furfural	78
Método del diacetato de furfural aplicado a la valoración de urea en orina	79
Comparación de resultados	80
CONCLUSIONES	81

PARTE GENERAL

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

REACCIONES DE COLORACION DE LA UREA

Empleando como punto de referencia el reactivo de coloración, las distintas reacciones colorimétricas para la identificación cualitativa y la determinación cuantitativa de la urea pueden reunirse en los siguientes grupos:

- 1.- Furfural y derivados.-
- 2.- Metil furilo y oxiclورو de fósforo.-
- 3.- para-Dimetilaminobenzaldehido.-
- 4.- Resorcina.-
- 5.- Acido fosfotúngstico.-
- 6.- Acido sulfanílico.-
- 7.- Diacetilo.-
- 8.- Diacetilmonoxima.-
- 9.- alfa-Isonitrosopropiofenona.-

Si generalizamos el tema, cabe incluir en él las reacciones indirectas de dosaje colorimétrico, o sea la nesslerización previa hidrólisis o acción enzimática sobre la urea, para transformarla en derivado amoniacal. Vamos a considerar a continuación, en forma general, las reacciones de coloración según los grupos en los cuales se las ha clasificado.-

REACCIONES DE COLORACION EMPLEANDO

FURFURAL Y DERIVADOS

REACCIONES DE COLORACION EMPLEANDO FURFURAL Y SUS DERIVADOS

Históricamente, parece deberse a Schiff (1) la primera reacción de este tipo. La realizaba tratando un cristal de urea con una o dos gotas de solución acuosa recientemente preparada de furfural, agregando inmediatamente una gota de HCl concentrado (d. 1,10).-

Se nota lentamente la aparición de una gama de colores que pasa del amarillo al rojo violáceo, pasando por tonos intermedios.-

Werner (2) opina que esta reacción no es digna de confianza y que con furfural puro puede fallar totalmente.-

Ganassini (3) opina que en presencia de acetona la reacción es más segura, considerando a ésta como un componente activo en la reacción; consigue así un reactivo de cierta eficacia que posee la siguiente composición: furfural 5 gotas, acetona 2 ml., agua 2 ml., HCl concentrado 1 ml..-

Cuando este reactivo se agrega a un cristal de urea se desarrolla gradualmente una coloración rojo violácea que pronto se hace intensamente púrpura.-

Foulder (4) menciona el método ideado por Nakashima y Maruaka (5) para la determinación de urea en orina. Este método está basado en la producción de un color azul violado al poner urea en presencia de furfural recientemente destilado y del Cl_2Sn en solución en HCl al 30 %.-

Los autores, en un estudio de la función de la urea en esta reacción, concluyen que ella induce rápidamente y a baja temperatura una reacción que, en su ausencia, puede producirse a la temperatura de ebullición.-

Esta conclusión está basada en los siguientes hechos:

- a) El furaldehído da un color rojo al hervir con HCl al 30 %. En presencia de urea ese mismo color aparece debajo del punto de ebullición.-
- b) El furaldehído, calentado con una solución de Cl_2Sn en HCl produce colores que varían entre el rojo violáceo y el azul violeta.-

El tono azulado aumenta con el aumento de la concentración de Cl_2Sn . El mismo cambio de color tiene lugar más rápidamente en presencia de urea.-

- c) Por estacionamiento a la temperatura ambiente una mezcla de fural-

dehido y Cl_2Sn en HCl cambia lentamente al azul negro y deposita un residuo negro. El mismo cambio es mucho más rápido en presencia de urea.-

En la reacción de Nakashima y Maruaka, la intensidad del color final es proporcional a la concentración de urea. La función de la urea, por consiguiente, no está del todo de acuerdo con la de un catalizador.

Esta prueba para urea puede ser usada para identificar guanidina con iguales resultados.-

Obermer y Milton (6 y 7) presentan la misma reacción en un método cuantitativo muy estudiado y simplificado para dosaje de urea en orina.-

La técnica publicada por dichos autores hace uso de la acción catalítica de la urea sobre la reacción entre el cloruro estañoso y el furfuraldehido en presencia de un ácido mineral.-

Una experiencia de mas de 10.000 análisis en 4 años los ha llevado a confirmar la exactitud del método y a simplificarlo.-

La técnica original indicaba el uso de un densitómetro fotoeléctrico, baño helado y cuidadosas precauciones.-

El método modificado por esos autores presenta las siguientes ventajas:

- a) Es más rápido, dado que las condiciones son menos rígidas. La reacción se efectúa a temperatura ambiente en lugar de hacerlo a 0°C .
- b) Es adecuada para la mayor parte de los laboratorios de rutina, dado que ha sido adaptada al fotómetro o colorímetro usuales.-

Los autores presentan una serie de notas sobre la reacción de coloración, que pasamos a detallar a continuación.-

Según sus experiencias, el cloruro estañoso disuelto en HCl de densidad 1,14 produce coloración con el furfural.-

El color pasa de una opalescencia púrpura a un precipitado negro.

La adición de un coloide protector inhibe ambos, la opalescencia y el precipitado, y aumenta la intensidad del componente azul del color.

En presencia de urea, el color se desarrolla a mucha menor temperatura, y aún a 0°C . Además, la intensidad de coloración es proporcional a la cantidad de urea, cumpliendo la ley de Lambert y Beer.-

La reacción parece continua, pero puede ser detenida en cualquier momento introduciendo un buffer en la mezcla de reacción para detener la

acción del ácido mineral; para ello se usa el acetato de sodio.-

Esto deja una gran cantidad de iones acetato en solución y el color cambia de un intenso púrpura a un pardo dorado. Este segundo cambio no es instantáneo y la variación es regida todavía por la temperatura.-

Los autores investigaron el posible efecto de los otros constituyentes de la orina sobre la reacción, empleándolos en concentraciones muy en exceso sobre las normales.-

Se ensayaron las siguientes sustancias, aisladamente, y en soluciones de urea, en los porcentajes mencionados a continuación: sales de amonio 15; creatinina 0,5; creatina 0,1; fosfato de sodio 1,5; glucosa 5; peptona (recientemente preparada) 1,5; acetona 1; cloruro de calcio 2; cloruro de magnesio 1; cloruro de sodio 5; guanidina 1; ácido úrico 0,25; glicocola 10; cistina, tirosina y triptofano, soluciones saturadas en solución 0,1 N. de NaOH; sales biliares 0,1.-

Estas sustancias, tanto aisladamente como en mezclas con urea, no produjeron cambios de color, con excepción de la guanidina al 1 % que aumentó el color en la misma proporción que 0,05 % de urea. Dado que la guanidina nunca está presente en la orina en concentraciones superiores al 0,1 % esta interferencia es prácticamente de poca significación pues introduce un error experimental despreciable, del orden de 0,01 %.-

Si existe albúmina en orina debe ser eliminada, porque forma un precipitado al agregar la mezcla ácida.-

La desproteínización se realiza con la siguiente técnica: agregar 0,5 ml. de solución de acetato básico de plomo al 5 % y 0,5 ml. de ácido acético al 10 % a 2 ml. de orina en un tubo de centrifuga. Dejar unos minutos y centrifugar. Para eliminar el exceso de catión plomo, se agrega 0,5 ml. de solución de sulfato de sodio al 10 % a 2 cc. del líquido sobrenadante de la centrifugación.-

Centrifugar de nuevo y determinar la urea en el líquido sobrenadante, corrigiendo los cálculos para un factor de dilución 15/8.-

Cuando el HCl es añadido a una orina fuertemente pigmentada el color amarillo resultante tiende a dar valores altos en la determinación. Este error es eliminado por los autores colocando un filtro verde Wra-tten No. 74 en el fotómetro.-

Alternativamente, la orina puede ser tratada con carbón adsorbente.

Se ha probado que el tratamiento con pequeñas cantidades de carbonato de urea en medio ácido no produce coadsorción de urea.-

Técnica de Obermer y Milton

El siguiente método es especialmente adaptable al análisis en el que se tienen de seis o más orinas. Los autores encuentran que dos soluciones de urea, al 1 y 3 % respectivamente son adecuadas para los fines mencionados.-

Aunque son necesarios dos períodos de tiempo de media hora cada uno para el desarrollo del color, el tiempo empleado en las manipulaciones es breve. Por ello el método se compara favorablemente en cuanto a sencillez con el usual del hipobromito.-

Es particularmente adaptable a pequeños animales de experimentación que eliminan solo reducidas cantidades de orina.-

La orina (0,2 ml.) se vierte por medio de una pipeta en un tubo de ensayo pequeño y se agrega 1 ml. de solución de Cl_2Sn al 10 % en alcohol concentrado (esta solución no es muy estable y se debe conservar en refrigeración cuando no esté en uso). Luego se agrega 0,3 ml. de una mezcla preparada disolviendo 0,3 ml. de furfural en 7 ml. de ácido acético glacial, llevando a 21 ml. con solución de goma ghatti al 5 %.-

El contenido del tubo se mezcla y se deja estar a la temperatura ambiente durante 30 minutos; no es necesario atenerse estrictamente a este período de tiempo, pues la solución tipo se somete al mismo tratamiento que la desconocida. Si la temperatura del ambiente es inferior a 10°C el tiempo puede aumentarse hasta los 45 minutos. Si es superior a los 20°C . debe disminuirse a 20 minutos.-

Al término de este período de tiempo, se desarrolla un intenso color púrpura.-

Se agregan luego 4 ml. de una mezcla de tres partes de solución de acetato de sodio al 30 % y una parte de solución de goma ghatti al 5 %.-

El contenido del tubo se mezcla y se deja estar por un período preliminar de 30 minutos. Durante este tiempo el color cambia del púrpura intenso al verde parduzco y luego al pardo dorado.-

La intensidad del color se compara en un colorímetro común con una solución tipo de urea sometida al mismo tratamiento o bien se

lee en un fotocolorímetro expresándola en términos de coeficiente de extinción o densidad óptica.-

El método ha sido comparado con el del xanthidrol gravimétrico y los resultados se relacionan muy favorablemente.-

Los límites de exactitud del método dependen enteramente de la precisión con que pueden efectuarse las comparaciones.-

Con un colorímetro, la exactitud del método es de $\pm 2\%$ en los casos normales, pero de $\pm 5\%$ cuando la concentración de urea es del orden del 0,5 %.

La exactitud es superior a la de la técnica del hipobromito, que en los mejores casos no alcanza a $\pm 7\%$.-

BIBLIOGRAFIA.-

- 1.- SCHIFF H. A reaction for urea. Ber. 10, 773 - 776 (1877).-
- 2.- WERNER E.A. The chemistry of urea. Monografías de bioquímica. Longsman Green Co. (1923).-
- 3.- GANASSINI D. Schiff's reaction for detection of carbamide. Chem. Zentr. 11. 473 (1919).-
- 4.- FOULDER J.H. Two new colour test for hexoses. J. Biol. Chem. 99, 207-211 (1932-33).-
- 5.- NAKASHIMA Y. y MARUAKA K. Deutsch. Arch. Klin. Med. 143, 318 (1924).
- 6.- OBERMER E. y MILTON R. Diagnostica e tecnica di Laboratorio, XII, Sept. 25 (1934).-
- 7.- OBERMER E. y MILTON R. The Analyst. 63, 423 - 424 (1938).-
- 8.- GANASSINI D. A proposito della reazione di Schiff per la ricerca dell'urea. Boll. Chim. Farm. 59, 3 (1920).-

REACCIONES DE COLORACION EMPLEANDO METIL FURILO
Y OXICLORURO DE FOSFORO

REACCIONES DE COLORACION EMPLEANDO METIL FURILLO
Y OXICLORURO DE FOSFORO

El punto de partida de estos ensayos reside en los trabajos de Anton y Gostling (1 y 2). En ellos estudian la preparación y propiedades del bromo y cloro metil furaldehido ($\text{Br}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{O}\cdot\text{C}_4\text{H}_2\cdot\text{C}\cdot\text{HO}$. y $\text{Cl}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{C}_4\text{H}_2\cdot\text{c}\cdot\text{HO}$.). Estos derivados según los autores, son fáciles de obtener por acción de los ácidos halogenados secos sobre los hidratos de carbono, en particular la celulosa.-

Técnica de preparación del bromo metil furaldehido

500 cc. de una solución preparada saturando éter etílico seco con H seco a 15°C . se vuelca sobre 100 g. de levulosa cristalizada y la mezcla se agita y enfría si es necesario, pues puede desarrollarse una acción violenta después de unos minutos.-

Luego de dejar la mezcla durante 12-24 horas en reposo, toma un color púrpura oscuro; se agita con solución saturada de CO_3Na_2 en pequeñas cantidades por vez y luego con CO_3Na_2 anhidro o seco hasta que la acción sea alcalina al tornasol.-

La solución etérea se decanta y el residuo se extrae repetidamente con éter etílico.-

Todos los extractos etéreos se juntan y secan sobre Cl_2Ca durante 12 o más horas. La mayor parte del éter se destila a presión reducida.-

El aceite marrón rojizo resultante se toma con una pequeña porción de éter seco y se filtra si es necesario para eliminar trazas de una sustancia negra insoluble.-

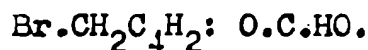
Esta solución se deja evaporar en vaso abierto y cristalizan prismas de color amarillo anaranjado.-

La cristalización puede ser acelerada por agitación o adición de un poco de petróleo liviano.-

El rendimiento es de 20 a 25 g. Los cristales se disuelven fácilmente en éter, cloroformo, alcohol, benceno y muy poco en éter de petróleo liviano. Cristaliza bien de cualquiera de esos solventes, siendo el éter de petróleo el mejor para purificarlo.-

El punto de fusión es $59,5-60,5^\circ\text{C}$.

El producto obtenido es el ω - bromo metil furfural:



Otra técnica de preparación es la siguiente: 10 g. de un hidrato de carbono se cubren con 250 ml. de cloroformo que se saturó a 0°.C. con BrH seco. La mezcla se vierte en un frasco cuya tapa esté asegurada por ganchos; se coloca por dos horas en un baño de agua a ebullición.

Luego se deja unas horas y se trata con carbonato de sodio (primero en solución concentrada y luego anhidro y sólido). Se filtra y luego se seca la solución con Cl_2Ca anhidro.-

Se destila el cloroformo hasta consistencia siruposa y se pasa a un cristizador, donde se hace cristalizar el producto por siembra.-

Incluso, para la preparación del ω - bromometil furfural se puede utilizar papel de filtro, algodón, celulosa, etc.-

De los hidratos de carbono que se utilizaron para la preparación de este compuesto, el único a partir del cual se produce cristalización espontánea es la levulosa. En los demás casos debe provocarse por siembra.-

Cuando el bromometil furfural, disuelto en un solvente apropiado, se calienta con plata metálica finamente dividida, el bromo es eliminado y resulta un producto cristalino.-

Otros metales, como el Zn, Na, Mg, parecen no tener casi ninguna acción para ello.

El primer experimento fué hecho por los autores con Ag precipitada por el método del sulfito usando tolueno como solvente y calentando la mezcla en tubos cerrados durante varias horas a 140°C.-

Por este método se obtuvo solo muy pequeña cantidad del producto cristalino; empleando en cambio, Ag reducida del $ClAg$ por acción del Zn, se produce una acción energética y todo el bromo es eliminado en media hora, obteniéndose gran cantidad de compuesto sólido.-

El método es el siguiente:

Técnica de preparación del metil furilo

Brometil furfural recristalizado se mezcla con un considerable exceso ($1\frac{1}{2}$ a 2 partes) en peso, de plata finamente dividida, preparada reduciendo el $ClAg$ con Zn por digestión durante 24 horas con SO_4H_2 muy diluido y lavando luego sucesivamente con agua, alcohol, éter y benceno.-

La mezcla de bromometil furfural y plata se cubre con dos o tres

eces su volumen de benceno seco, y se calienta hasta ebullición en un aparato de reflujo en baño de agua, hasta que una gota del líquido no é precipitado con solución nítrica de NO_3Ag .-

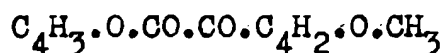
La reacción desprende una considerable cantidad de calor que calienta la mezcla antes de aplicar el calor exterior. La operación dura nos 30 a 45 minutos.-

La solución se filtra y el residuo se extrae tres o cuatro veces con benceno hirviente. La mayor parte del benceno es destilado y enfriando el resto se produce un precipitado amarillo. Este se seca en un plato poroso y se recrystaliza de una mezcla de benceno y éter de petróleo alientes. Así obtenido, el producto es todavía amarillo brillante, pero por repetidas purificaciones por recrystalización en agua hirviendo, de la que se separa enfriando, precipitan prismas incoloros.-

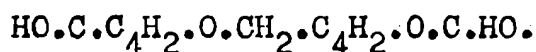
La sustancia se disuelve fácilmente en cloroformo y ácido acético glacial fríos.-

Funde a $119-120^\circ\text{C}$.-

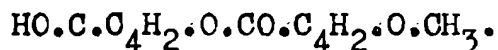
Este producto de condensación del bromometil furaldehído tiene por fórmula $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{O}_4$, y su constitución, de acuerdo a los datos obtenidos, por Fenton (3) parece ser la de un metil furilo:



el dialdehído:



el cetoaldehído:



según dicho autor, la segunda fórmula parece ser la más probable.

El compuesto se disuelve también fácilmente en agua caliente, cloroformo, benceno, alcohol y otros disolventes orgánicos.-

Dá reacciones de hermosos colores con ciertos compuestos nitrogenados y las coloraciones son tan intensas que constituyen reacciones muy delicadas para esas sustancias.-

Si el reactivo se mezcla con urea y la mezcla se trata con oxícloruro de fósforo, cloruro de acetilo o ácido clorhídrico seco, se produce un hermoso color azul de Prusia.-

Usando la reacción como una prueba para urea, los sólidos se mezclan bien o, si la sustancia está en solución, se mezcla con una solución

alcohólica del reactivo y se evapora a sequedad en baño de agua.-

El oxiclورو de fósforo, u otro cualquiera de los reactivos mencionados se puede emplear disuelto en un solvente adecuado, como ser éster de petróleo, ácido acético glacial o benceno.-

Cuando se practica de esta manera, la reacción es tan delicada que 0,1 mg. de urea da un color muy intenso; con cuidado se puede revelar la presencia de 0,01 mg. de urea.-

Las ureas monosustituídas (monometil, monoetil, monofenil urea) dan la misma reacción.-

La alantoina tambien produce coloración, pero el color aparece mas lentamente. El biuret da un leve tono azul muy lentamente.-

El uretano ($\text{NH}_2\cdot\text{CO}\cdot\text{Et}$) desarrolla un intenso color azul. Lo mismo ocurre con el carbamato de sodio. El color producido con uretano es producido también de inmediato si se usa como agente condensante HCl en solución acuosa.-

No se obtiene coloración con los siguientes compuestos: difenil urea simétrica; dimetil urea simétrica; monoacetil urea; acetilmetil urea; ácido oxalúrico; ácido úrico; aloxano; ácido parabánico; ácido cianúrico; cianamida; formamida; acetamida; acetanilida; oxamida; succinamida; benzamida; semicarbazida; glicocola.-

La tiourea da un color verdoso débil. La coloración azul obtenida en los casos arriba mencionados es debida a la formación de bases incoloras que con los ácidos dan sales de intenso color azul. Estas bases son fácilmente separadas tratando las sales azules con carbonato de bario y extrayendo con alcohol. Las soluciones incoloras así obtenidas dan el color azul inmediatamente si se las trata con ácidos en solución acuosa, pero la intensidad del color depende de la concentración y la constante de ionización del ácido.-

Es más intensa con SO_4H_2 , HCl, HBr, $\text{CCl}_3\cdot\text{COOH}$, y solo apenas perceptible con $\text{CH}_3\cdot\text{COOH}$ o tártrico.-

Análisis preliminares de los productos de la reacción entre el metil furilo y la urea indican que se forma un compuesto de condensación con una molécula del reactivo $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{O}_4$ y dos moléculas de urea.-

Este hecho indica la necesidad del grupo $-\text{NH}_2$ en la molécula del compuesto nitrogenado, dado que el reactivo tiene dos grupos $=\text{CO}$.

El poder para producir el color azul parece depender de la

capacidad del grupo unido al radical $-\text{CONH}_2$ para producir bases o sales.-

Esto puede explicar la no producción de color por parte de las acil-ureas. Los compuestos de condensación se oxidan fácilmente por exposición al aire.-

El derivado de condensación producido por la urea se prepara de la siguiente manera: el reactivo seco se mezcla bien con un gran exceso de urea (tres veces en peso) y se calienta a llama suave hasta que funde. Se obtiene un líquido rojo oscuro que solidifica al enfriar y que se disuelve en alcohol acuoso caliente. El alcohol absoluto, cuando se agrega a la solución enfriada, precipita una sustancia amarillo rojiza amorfa que se separa en flóculos y se lava varias veces con el precipitante.-

Esta sustancia, insoluble en alcohol absoluto o en agua, se disuelve fácilmente en alcohol acuoso caliente. Es prácticamente insoluble en benceno, cloroformo, acetato de etilo, etc. Se descompone por acción del calor a los 200°C . sin fundir.-

BIBLIOGRAFIA.-

- 1.- FENTON H.J.H. y GOSTLING M. J. Chem. Soc. 75, 423 (1899)
- 2.- FENTON H.J.H. y GOSTLING M. J. Chem. Soc. 79, 361 y 807 (1901)
- 3.- FENTON H.J.H. J. Chem. Soc. 83, 187 (1903)

DETERMINACION COLORIMETRICA EMPLEANDO

p.DIMETILAMINO BENZALDEHIDO .

DETERMINACION COLORIMETRICA EMPLEANDO

p.DIMETILAMINO BENZALDEHIDO

El reactivo de Erlich, p.dimetilamino benzaldehido, fué empleado por Weltmann y Barrescheen (1) pero la falta de especificidad de la reacción no permitió su generalización, según dichos autores, para la valoración de urea. Mucho más tarde, Bode y Ludwig (2) emplearon la reacción aplicándola a la determinación de la urea, por cromatografía sobre papel y determinación fotocolorimétrica posterior.-

En este método se utiliza 0,1 ml. de suero o 0,002 ml. de orina para la determinación. Analogamente, Watt y Chrisp (3) propusieron un método espectrofotométrico para dosaje de urea que se basa en esta misma reacción y cuyas características indicamos a continuación.-

El sistema p.dimetilamino benzaldehido (DMAB)-urea presenta un mínimo de transmisión en la longitud de onda de $420 \text{ m} \mu$, propiedad que puede emplearse para su valoración cuantitativa.-

En los ensayos efectuados con este método, Watt y Chrisp emplearon un espectrofotómetro Beckman DU.-

El color del sistema se desarrolla de inmediato y es estable a temperatura ambiente a los 10 minutos. Soluciones que contienen entre 80 y 160 ppm. de urea no experimentan cambios en la transmisión después de once días.-

Reactivos del método de Watt y Chrisp

Urea (P.A.) recristalizada dos veces de metanol y lavada con agua; se seca 48 horas al vacío sobre perclorato de magnesio y presenta un punto de fusión de 132°C .-

La solución testigo de urea es al 0,4 % en agua: con ella se preparan diluciones que contengan de 16 a 480 ppm.

Solución de DMAB al 2 % en alcohol de 95 grados que contiene 10 ml. de HCl concentrado por ciento.-

Procedimiento de valoración: a un volumen adecuado de solución de urea se agregan 10 ml. del reactivo de color y diluir a 25 ml. con agua destilada.-

El blanco se prepara con 10 ml. del reactivo diluido a 25 ml. con agua destilada.-

Aumentando la cantidad de reactivo, el porcentaje de transmisión decrece.

El reactivo, luego de transcurrida una semana desde su preparación, presenta en la reacción el mismo porcentaje de transmisión.-

Al aumentar la concentración de HCl hasta 0,44 M. el porcentaje de transmisión aumenta.-

El sistema coloreado sigue la ley de Beer hasta 320 ppm. de urea.

En el análisis de muestras puras de urea, se obtienen con este método errores que varían entre + 1,6 % y - 1,0 %.-

La presencia de hidroxilamina en relación molar mayor que 10:1 lleva a un error de solo 1 %.-

El cloruro de amonio no interfiere cuando está presente en relación molar de 10:1 y produce 1 % de error cuando esa relación se eleva a 15:1. La urea no puede determinarse por este método cuando la hidrazina y la semicarbazida están presentes en relación 1:1.-

Las soluciones de urea muy ácidas deben neutralizarse con Na.OH a la fenolftaleína y hacerse aproximadamente 0,4 M. con HCl.-

Las concentraciones óptimas para el trabajo analítico oscilan de 50 a 240 ppm. con un error relativo máximo de 4 % y 1 % de error fotométrico absoluto.-

BIBLIOGRAFIA.-

- 1.- WELTMANN y BARRESCHEN. Klin. Wochens. 1, 1100 (1922).-
- 2.- BODE y LUDWIG. Schweiz. Med. Wochens. 84, 629 (1954).-
- 3.- WATT G. y CHRISP J. Anal. Chem. 26, 452 (1954).-

DETERMINACION COLORIMETRICA DE LA UREA
EMPLEANDO RESORCINA

DETERMINACION COLORIMETRICA EMPLEANDO RESORCINA

Arreguine y García propusieron esta reacción (1) en la siguiente forma: 0,02 g de la sustancia sólida o 1 ml. de solución concentrada de la misma se tratan con 1 o 2 ml. de agua y el doble en volumen de HCl concentrado; se agregan 0,02 a 0,05 g. de resorcina (según la cantidad de muestra tomada: no conviene un exceso) y se lleva a ebullición durante 1 minuto aproximadamente.-

Se deja enfriar, se diluye con poca agua y se agregan 2 o 3 cc. de éter sulfúrico: se observa si después de agitar la mezcla el éter se colorea.-

Si se halla presente la urea, el éter toma coloración rosada o rojiza según la concentración.-

Si se añade amoníaco gota a gota al tubo que contiene la mezcla, mientras se lo refrigera con agua para evitar la evaporación del éter, la coloración virará en cierto momento al azul violáceo (instante de la neutralización) y luego se decolorará, quedando la capa acuosa teñida de violeta pálido si la cantidad de urea es pequeña y de violeta intenso si es apreciable. Al mismo tiempo es posible apreciar una fluorescencia de color marrón.-

La reacción es nítida con la urea y la guanidina operando en la forma descrita. La sensibilidad de la reacción es de 1: 1000.-

Se efectuaron ensayos con cuerpos afines a la urea, entre ellos: ácido úrico, uratos, ácido hipúrico, alantofina, aloxana, creatina, aloxantina, etiluretano, guanina, guanidina, glicocola, tiourea y xantina.-

El ácido hipúrico no produce coloración en medio ácido, en tanto que en medio alcalino amoniacal da una coloración amarillo verdosa que no pasa al éter y que debe atribuírse a la glicocola, puesto que ésta da una reacción análoga.-

La aloxantina, la alantofina y el aloxano no reaccionan en medio ácido; (la alantofina produce un tinte amarillento en soluciones concentradas), pero en medio alcalino presentan coloración rosada con fluorescencia verdosa.-

La coloración que se observa en medio amoniacal no pasa al éter.-

El ácido úrico, lo mismo que los uratos, no producen coloración en medio ácido. En medio alcalino amoniacal la coloración amarillo ver-

sa no pasa al éter.-

Con tiourea en medio ácido, ésta reacción produce coloración jiza, que pasa al éter si se opera en solución concentrada. Por alcalización amoniaca, el líquido acuoso presenta coloración rosada. Si opera en medio diluido, la coloración que se produce no pasa al éter; pero si se neutraliza con amoníaco y se vuelve a acidificar con HCl, la calidad de color que se produce pasa al éter.-

El hecho más probable es que se produzca una transformación de la tiourea en urea.-

No se debe considerar esta reacción como positiva, pues la resorcina, por igual tratamiento, produce una coloración amarillo rosada en la capa etérea.-

La guanidina da la misma reacción, aunque más débilmente. Ello debe a la facilidad con que se hidroliza para dar urea y amoníaco; guanina, xantina y creatina no dan la reacción indicada.-

Las experiencias efectuadas con soluciones tituladas de urea, usando cantidades conocidas con el objeto de estudiar una cuantificación de la reacción, dieron resultados negativos.-

Ello se debe seguramente a que se producen varias sustancias y que las cantidades de los cuerpos que entran en reacción deberían estar en una proporción adecuada.-

Por otra parte, la resorcina calentada con HCl, y, especialmente si éste es concentrado, produce una coloración que no pasa al éter y que no vira con el amoníaco.-

En medio amoniaca se presenta el inconveniente de la fluorescencia, lo cual hace imposible la valoración.-

La reacción debe ser efectuada con mezclas de HCl y resorcina frescas en el momento de utilizarlas; de ninguna manera debe recurrirse a mezclas ya preparadas, pues la resorcina en presencia de HCl se altera con el tiempo.-

Además, debe cuidarse de no usar un exceso de resorcina en la reacción. No debe emplearse un exceso de álcali, pues el amoníaco en exceso origina un tinte verdoso que molesta la observación. En todos los casos, debe preferirse el amoníaco a los hidróxidos de sodio o de potasio.-

Desde el punto de vista de sus aplicaciones, varias son las

educiones que pueden hacerse.-

La saliva, elemento en cuya constitución entran una serie de derivados nitrogenados (guanina, guanidina, bases pirimidicas) da la reacción, por la presencia de guanidina y urea. Puede admitirse también la hidrólisis de los glucos y nucleoproteidos presentes en la saliva.

Examinando la serie de sustancias que dan la reacción en las condiciones en que se opera, resulta que solo la dan aquellas que tienen una agrupación: $C(NH_2)_2$. Tal cosa ocurre, por ejemplo, con la urea y la guanidina. La tiourea da la reacción, pero presenta anomalías que ya han sido anotadas por otros investigadores del tema.-

Es posible admitir que la arginina, guanidina del ácido diamino valerianico, que por hidrólisis da ornitina y urea, de la reacción; pues como lo hace notar Lambling, la arginina es el único ureido que contiene, bajo la forma de resto guanidínico, el grupo ureico ya formado.-

Esta reacción, según Marenzi, es considerada completamente inespecífica por Werner y no utilizable en la determinación cuantitativa de urea (2).-

BIBLIOGRAFIA.-

- 1.- ARREGUINE V. y GARCIA E. An. Asoc. Quim. Arg. 9, 183 (1921).
- 2.- MARENZI, CARDINI, BANFI y VILALLONGA. Bioquímica Analítica Cuantitativa. El Ateneo. 1947.-

REACCIONES DE COLORACION DE LA UREA

EMPLEANDO ACIDO FOSFOTUNGSTICO

REACCIONES DE COLORACION EMPLEANDO ACIDO FOSFOTUNGSTICO

Moreigne (1) y Moor (2) emplearon el ácido fosfotúngstico como reactivo de coloración, pero este método ha tenido poca aplicación.

LIOGRAFIA.-

- 1.- MOREIGNE H. Reaction coloree produite par le reactif phosphotungstique en presence de l'acide urique et observations sur les procedes generalment employes pour defecquer l'urine avant le dosage de l'uree.-
Ann. Chim. Analyt. Appl. 10, 15 (1905).
- 2.- MOOR A. Biochem. Z. 149, 575 (1924).-

DETERMINACION COLORIMETRICA DE LA UREA EMPLEANDO
ACIDO SULFANILICO

DETERMINACION COLORIMETRICA EMPLEANDO ACIDO SULFANILICO

Con el ácido sulfanílico diazotado (1) (2), la urea da un color verde amarillento, y en base a esta reacción es posible estimarla colorimétricamente en sangre u orina.-

Esta reacción no se produce con sales de amonio, guanidina, creatina, creatinina y amino ácidos.-

El color es producido hasta por una solución 0,0005 M. de urea.

En el caso de la sangre, se debe preparar un desproteínizado mezclando 2 ml. de suero con 2 ml. de ácido tricloroacético al 20 %. Agitar, filtrar y usar ese filtrado.-

En el caso de tratarse de orina, se mezclan 8 ml. de la misma con 2 ml. de solución saturada de subacetato de plomo; filtrar, y a 1 ml. del filtrado agregar 3 ml. de solución saturada de sulfato de sodio. Filtrar y diluir 5 ml. del filtrado a 25 ml.-

La orina ha sido así clarificada y diluída 1:10.-

El reactivo se prepara mezclando 2 volúmenes de una solución de ácido sulfanílico al 0,5 % en HCl 1:19 y 1 volumen de nitrito de sodio al 0,2 % en agua destilada.-

La reacción se efectúa agregando 0,1 ml. del reactivo a 1 cc. del líquido problema, y se compara con una solución de cromato de potasio al 0,02 % usando una curva de calibración de urea como control.-

Este método ha sido objeto de algunas modificaciones. Se puede descomponer la urea con ácido nitroso y determinar el exceso del mismo con ácido sulfanílico y fenol.-

Este método fué propuesto por Sanchez (3) (4), para dosaje de urea en líquidos biológicos.-

Los amino ácidos y el amonio no interfieren en esta reacción.-

El color final es directamente proporcional a la cantidad de ácido nitroso e inversamente proporcional al contenido en urea.-

Este método permite determinar hasta 0,2 mg. de urea por ml. de la muestra incógnita.-

Debe eliminarse dentro de lo posible, el aire que contiene la solución de nitrito, pues puede ser oxidado a nitrato y falsear los resultados de la determinación.-

Glicina, alanina y leucina no interfieren en la reacción; el

ito debe estar ausente de los reactivos para evitar errores en la
terminación.-

Método de Sanchez

Reactivos.-

Nitrito de sodio 0,01 %.-

Solución reactivo: contiene 0,5 g. de ácido sulfanílico y 0,75 g. de
I en 100 ml. de ácido sulfúrico al 2,5 %.-

Solución testigo: se prepara disolviendo 0,100 g. de urea en agua des-
ta hasta completar 1 litro. En esta solución, 1 ml. equivale a 0,1 mg.
rea.-

Se prepara una serie de soluciones de concentración crecien-
tomando de la solución testigo 1 - 2-5 ml. y completando
una de ellas a 5 ml. con agua destilada.-

Medimiento.-

Se puede efectuar el dosaje en sangre, suero, plasma o líqui-
falorraquídeo.-

Mezclar 0,5 o 1 ml. de la muestra con agua destilada hasta
letar 8 ml.- Agregar 1 ml. de ácido sulfúrico 0,67 M. y 1 ml. de
stato de sodio al 10 %. Mezclar y calentar en un baño maría hirviendo
a que se produzca la coagulación. La muestra puede también ser despro-
izada por medio de una solución de ácido tricloroacético.-

Una vez coagulada la masa proteica, se filtra; tomar 5 ml. del
rado y agregar 1 ml. de solución de nitrito de sodio al 0,01 %.-
fr a 10 ml. y cubrir con una capa de aceite mineral.-

Agregar 30 gotas de ácido sulfúrico concentrado; mezclar
y calentar a 65 °C. durante 25 minutos.-

Agregar 1 ml. del reactivo mezclando bien y luego 4 ml. de
faco concentrado.-

Mezclar y dejar en reposo 5 minutos antes de efectuar la
aración.-

Muy pocas son las técnicas de valoración de urea que utiliz-
la reacción de descomposición por el ácido nitroso, pues la mayor
e de los investigadores consideran, después de los estudios de Wer-
que no da resultados satisfactorios.-

Frattini considera el método de Sanchez como exacto, aunque

arenzi y col. (5) creen que el ácido nitroso influye también sobre los aminoácidos.-

BIBLIOGRAFIA.-

- 1.- SNELL y SNELL. Colorimetric. Analysis. II, (1937) Van Nostrand Co.
- 2.- SETSURO AOI. Nagoya J. Med. Sci. 3, 13 (1928).-
- 3.- SANCHEZ J.A. Rev. Centro Est. Farm. Bioq. 25, 364 (1935).-
- 4.- SANCHEZ J.A. Semana Médica. 2, 503 (1937).-
- 5.- MARENZI, CARDINI, BANFI y VILALLONGA. Bioquímica Analítica Cuantitativa. El Ateneo . (1947).-

DETERMINACION COLORIMETRICA DE LA UREA
EMPLEANDO DIACETILO

DETERMINACION COLORIMETRICA EMPLEANDO DIACETILO

Según Fearon (1), las reacciones de identificación y dosaje se basadas en su condensación en medio ácido con grupos -C.HO o : muestran resultados alentadores.-

Especialmente las reacciones que emplean dicetonas (diacetilo O.CO.CH_3) prometen las mejores perspectivas en cuanto a su aplicabilidad.-

En medio fuertemente ácido se obtienen productos amarillos por oxidación se convierten en pigmentos anaranjados y rojos.-

Bajo estas condiciones de acidez, no se produce reacción con éfano y guanidinas sustituidas, lo que indica que el diacetilo tiene una reactividad distinta según la reacción del medio.-

El mecanismo de las reacciones del diacetilo en medio alcali- é estudiado por Harden y Norria (2), O'Meara (3) y Lang (4).-

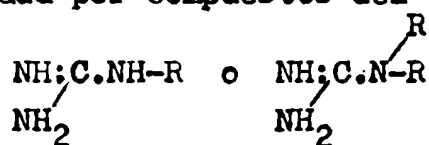
Smith (5), que estudió el mecanismo de estas reacciones, describió las coloraciones que se producen entre el diacetilo y muchas azi- entre ellas la semicarbazida.-

Clasificó las reacciones en:

).- Carbamido - diacetilo reacción: es la que se produce en medio ácido y es dada por compuestos del tipo:



).- Guanidino - Diacetilo reacción: es la que se produce en medio alcalino y es dada por compuestos del tipo:



aminaron también la mono y dioxima del diacetilo. La monoxima fué mejor en sensibilidad al diacetilo. La dioxima no dió resultados satisfactorios.-

Fearon (1) aconseja la técnica siguiente: se debe acidificar fuertemente la solución de urea con HCl concentrado y agregar una solución de diacetilo al 3 %. Se hierve 3 o 4 minutos: se produce coloración anaranjada que vira al rojizo por adición de unas gotas de cloruro de potasio al 1 %.-

La reacción es positiva con urea, fenilurea, metilurea,

utilurea, beta.naftilurea, dimetilurea (s. y a.), alantofina, semicar azida, citrulina y todas las grandes protefnas examinadas: ovoalbúmina, eroalbúmina, ovoglobulina, caseinógeno, seroglobulina, lactoalbúmina, ibrina, edestina, gluten y mucina.-

La reacción es positiva con compuestos de fórmula general $R_1-NH.CO.NH-R_2$ donde R_1 es hidrógeno o un radical alifático y R_2 o es un grupo acilo.-

Así, la fenilurea y la dimetilurea simétrica dan la reacción, ero no la acetilurea y la difenilurea.-

Se sugirió que los pigmentos obtenidos en la carbamido reac- ión eran derivados del anillo pirimidínico, el cierre del cual se lle- a a cabo por condensación oxidativa, incluyendo un metilo del diaceti- o.-

El compuesto formado entre el diacetilo y la semicarbazida a una triazina y fué obtenido por Thiele (6).-

Natelson, Scott y Beffa (7) presentaron un micrométodo adap- do al dosaje de urea en sangre, empleando el diacetilo como reactivo e coloración.-

A 0,1 ml. de suero, plasma o sangre se agrega 1,9 ml. de so- ión de ácido tungstico. Esta se prepara con partes iguales de solu- ión de ácido sulfúrico 0,15 M. y tungstato de sodio al 2,2 %.-

Conviene realizar esta desproteínización en un tubo de fondo hínico para centrifugar; del líquido sobrenadante de la centrifugación armar 1 ml. y agregarle 5 ml. de diacetilo. Llevar a un baño de agua a ulsición durante 5 minutos.-

Enfriar y comparar con la misma reacción efectuada sobre una olución tipo de urea de concentración adecuada.-

BIBLIOGRAFIA.-

- 1.- FEARON W.R. Biochem. J. 33, 903 (1939).-
- 2.- HARDEN y NORRIS. J. Physiol. 42, 332 (1911).-
- 3.- O'MEARA. Brit. J. Exp. Path. 12, 346 (1931).-
- 4.- LANG. Hopp. Seyl. Z. 216, 244 (1932).-
- 5.- SMITH. Analyst. 60, 171 (1935).-
- 6.- THIELE. Ann. Phys. Lpz. 302, 299 (1898).-
- 7.- NATELSON, SCOTT y BEFFA. Am. J. Clin. Path. 21, 275 (1951).-

DETERMINACION COLORIMETRICA DE LA UREA EMPLEANDO
DIACETILMONOXIMA

DETERMINACION COLORIMETRICA EMPLEANDO DIACETILMONOXIMA

El método se basa en la reacción descrita por Fearon (1) y estudiada posteriormente por Ornsby (2).-

Cuando la urea se calienta en solución ácida con diacetilmonoxi- se produce un color amarillo que se intensifica al amarillo anaran- o por oxidación con persulfato de potasio. Muchas ureas sustituidas un tono rojizo; solo la urea produce color amarillo.-

Fearon empleó la reacción para determinar citrulina en caseína; mall y Hunter (3) para citrulina en tejidos; Abelin para urea en ro, pero realizando la reacción en medio neutro, con lo que logra amente un dosaje aproximado.-

La urea es la única sustancia que produce una coloración amari- anaranjada.-

Una tonalidad variable del rosa al rojo, similar a la de la ci- lina es producida por la metilurea, butilurea, fenilurea, dimetilu- , alantofina, semicarbazida y proteínas.-

La reacción es negativa con sales de amonio, hidrazina, carbama- , cianatos, acetamida, difenilurea, guanidina, metilguanidina, crea- a, creatinina, glucociamida, ácido uroxámico, ácido úrico, indol y os los aminoácidos examinados (glicina y sus ésteres, sarcosina, nina, cistina, tirosina, triptófano, arginina, histidina, lisina, lina, hidroxiprolina, asparagina, ácido aspártico).-

Luego de sus investigaciones, Fearon llegó a la conclusión de la reacción es positiva con compuestos que tienen la fórmula gene- :
:



ie R_1 es hidrógeno o un radical alifático y R_2 no es un grupo acilo.

La alantofina da una débil reacción, pero en el dosaje de urea orina no introduce un error apreciable.-

Método de Ornsby (4)

Activos.-

HCl concentrado.-

Diacetilmonoxima al 3 % en solución acuosa, la cual, guardada en adera se conserva indefinidamente.-

Persulfato de potasio al 1 %. Debe prepararse semanalmente y guardarse en heladera.-

Dilución testigo: contiene 0,1 mg. de urea por ml. Se agrega un poco de iodoformo como conservador.-

Procedimiento:-

El volumen de muestra analizado debe contener preferentemente entre 0,1 y 0,2 mg. de urea; (límites : 0,05 a 0,3 mg.) y no debe exceder de 3 ml. Para muestras de orina debe emplearse 0,01 ml., o sea 1 ml. de una dilución 1:100. En sangre, 3 ml. del filtrado de Folin son suficientes.-

Colocar la cantidad apropiada de solución en tubos de ensayo; 1 ml. y 2 ml. de solución testigo de urea en tubos semejantes y en el otro tubo 3 ml. de agua destilada.-

Llevar todo a 3 ml. con agua destilada. Agregar a cada tubo 1 ml. de HCl concentrado y 0,5 ml. de solución de diacetilmonoxima al 1%.-

Mezclar por rotación y colocar los tubos en un baño de agua hirviendo durante 10 minutos. Evitar la evaporación tapando los tubos con una esfera de vidrio.-

Enfriar 2 minutos en agua corriente y agregar 0,25 ml. de persulfato de potasio al 1 %. lentamente, de manera que forme una capa.-

Luego del agregado de persulfato a todos los tubos, agitarlos simultáneamente.-

La intensidad del color se lee en un fotocolorímetro con filtro azul 420. El tiempo que tarda el color en desarrollarse al máximo depende de la concentración de urea.-

Con 0,1 mg. de urea, el máximo se alcanza a los 5 minutos; con 0,2 mg. entre los 10 y 15 minutos; con 0,3 mg. entre los 25 y 30 minutos.-

La concentración debe calcularse preferentemente con una curva de calibración para obtener un valor exacto, pues la proporcionalidad, luego de cierto límite, deja de ser lineal.-

Ornsby comparó este método con el de Van Slyke y Cullen, de la misma manera obteniendo valores semejantes.-

El color obtenido con filtrados de sangre y con orina difiere considerablemente del obtenido con urea pura debido a la presencia de citrulina.

Esto se corrige empleando el filtro azul 420 (con transmisión entre 400 y 420 milimicrones) que es la zona en la cual las curvas de absorción de esos dos compuestos difieren mas.-

Realizando los ensayos de recuperación de la urea agregada se opera entre el 97,5 y el 102,4 % de la misma.-

efecto del tiempo de calentamiento.-

El aumento del color depende del tiempo de calentamiento. Intensidad crece rápidamente en los primeros minutos y luego la intensidad es menor.- Es adecuado un período de 10 minutos.-

efecto de la cantidad y clase de agente oxidante.-

Fearon halló que el mejor agente oxidante es el persulfato de amonio pues no destruye el pigmento formado. La cantidad óptima es 0,25 ml. de una solución al 1 %.-

efecto de la luz.-

La luz directa del sol aumenta rápidamente la intensidad del color.-

Influencia de los ácidos.-

El HCl puede ser reemplazado por SO_4H_2 , Po_4H_3 , $\text{CCl}_3\cdot\text{COOH}$, pero se obtiene mayor intensidad de color con el primero.-

Método de Barker (5)

Reactivos.-

Solución acuosa de diacetilmonoxima al 0,3 %. A temperatura ambiente se conserva 4 semanas. En heladera se conserva más tiempo.

Acido sulfúrico al 50 % V/v.-

Persulfato de potasio al 1 %. En heladera se conserva por espacio de 4 a 6 semanas.-

Solución testigo concentrada de urea: 1,0717 g. en 500 ml. de agua destilada. Se conserva con unas gotas de toluol o cloroformo.-

Su concentración es tal que 1 ml. equivale a 1 mg. de N_2 ureico-

Solución testigo diluida de urea: se prepara llevando 1,5 ml. de la solución anterior a 100 ml. con agua destilada. 1 ml. de esta solución equivale a 0,015 mg. de N_2 ureico.-

Procedimiento.-

2 ml. del filtrado libre de proteínas preparado según Folin Wu se colocan en un tubo de ensayo. Se agrega luego 0,25 ml. de solución de diacetilmonoxima y 4 ml. de ácido sulfúrico al 50 %.-

Se lleva a un baño de agua a ebullición por 10 minutos, tapan los tubos con esferas de vidrio para prevenir la evaporación. Luego se agrega 0,25 ml. de persulfato de potasio al 1 % dejando en el baño a ebullición 5 minutos más. Retirar los tubos luego de ese lapso y efectuar la lectura luego de 15 minutos de haber agregado el persulfato.-

El testigo se prepara con 2 ml. de solución testigo diluida que someten al mismo proceso.-

Para la precipitación de las proteínas de la sangre, pueden usarse los métodos de Folin y Wu o Somogyi. En este último es conveniente la modificación que emplea una solución ácida de SO_4Zn . La desproteinización con ácido tricloroacético no da resultados satisfactorios.-

Las lecturas se pueden efectuar en un fotocolorímetro usando filtro azul 420.-

Si la lectura, efectuada en la escala de densidades ópticas, mayor de 500, la determinación se hace agregando 5 ml. de agua destilada y leyendo nuevamente la intensidad del color luego de haber efectuado esa dilución.-

Si se sabe que el filtrado a emplear en la determinación contiene menos de 75 mg. % de N_2 ureico, se utilizan 2 ml. en la misma. En caso de tener una mayor concentración, se emplea 1 ml. del filtrado diluido a 2 ml. con agua destilada.-

Diluyendo como se explicó anteriormente con 5 ml. de agua destilada al efectuar la lectura colorimétrica, es posible ampliar la proporcionalidad de la reacción hasta 250 mg % de N_2 ureico.-

El procedimiento se aplica con éxito a la orina, sin necesidad de eliminar el NH_3 con permutita. Una dilución conveniente de la orina es 1:200 si se emplean 2 ml. de dilución; y 1:100 si se utiliza 1 ml.

En casos excepcionales se pueden modificar estas condiciones.-

En la calibración efectuada con soluciones de urea de concentración creciente se obtiene una relación lineal entre la concentración

densidad óptica hasta un valor de esta de aproximadamente 400, cuando usarse hasta ese límite una simple proporción para efectuar cálculo.-

Por encima de ese valor de densidad óptica debe usarse una tabla de calibración.-

Este método fué comparado por Barker con el de la ureasa por hidrólisis del NH_3 y nesslerización. En los diferentes ensayos, la urea agregada fué recuperada totalmente.-

Siempre obtuvo resultados más bajos que con la ureasa pero semejantes.-

El ácido úrico, creatina, creatinina, glicina, alanina, ácido fólico, arginina, lisina y asparagina en cantidades equivalentes a 3 mg. de N_2 ureico no interfieren en la determinación.-

Orekhovich y Tustanorski (6) introdujeron una variante en el método de la diacetilmonoxima.-

Esta modificación es la siguiente: si bien la citrulina y la triptófano dan coloración amarilla con la diacetilmonoxima, en presencia de triptófano se produce una coloración púrpura.-

Triptófano y citrulina, en una solución que contenga PO_4H_3 y producen un ureído que es responsable de esa coloración púrpura.

En presencia de una cantidad dada de triptófano, puede calcularse la cantidad de ureído formada, pues 1 ml. de triptófano reacciona con 4 moles de urea o 3 moles de citrulina.-

Esta reacción se puede aplicar a la determinación de urea en suero.-

BIBLIOGRAFIA.-

- 1.- FEARON W.R. Biochem. J. 33, 903 (1939).-
- 2.- ORNSBY A. J. Biol. Chem. 146, 595 (1942).-
- 3.- GORMALL y HUNTER. Biochem. J. 35, 650 (1941).-
- 4.- ORNSBY A. J. Biol. Chem. 146, 595 (1942).-
- 5.- BARKER S.B. J. Biol. Chem. 152, 453 (1944).-
- 6.- OREKHOVICH y TUSTANOVICH. Biokhimiya. 14, 444 (1949).

DETERMINACION COLORIMETRICA DE LA UREA EMPLEANDO
alfa ISONITROSOPROPIOFENONA

DETERMINACION COLORIMETRICA EMPLEANDO

alfa.ISONITROSOPROPIOFENONA

Archibald (1) propuso un método de dosaje de urea basado en la coloración roja que en medio ácido producen la urea y la alfa.isonisopropiofenona. La estructura del producto obtenido es desconocida.-

Como en el caso de la diacetilcarbamido reacción, el color obtenido es fotosensible. Por ello, el color se desarrolla con mayor intensidad al abrigo de la luz; en esas condiciones la coloración obtenida es estable por más de 24 horas.-

La alfa.isonitrosopropiofenona parece presentar algunas ventajas con respecto al empleo de la diacetilmonoxima:-

- a) El reactivo es menos volátil.-
- b) Produce color rojo, que es más fácil de comparar que el amarillo de la diacetilmonoxima.-
- c) El reactivo es menos sensible para la citrulina y otros derivados de la urea.-

No producen coloración con este reactivo los siguientes compuestos: derivados amoniacales, uretano, tiourea, benzimidazol, prolina, nitina, glutamina, asparagina, ácido glutámico, glutatión, ergotioneína, cafeína, adenina, hidantoina y creatina.-

Dan una coloración muy débil la aloxantina y el ácido úrico.

El ácido parabánico, aloxano, biuret, alantoina y proteínas dan un desarrollo de color semejante a la urea.-

La metilurea reacciona dando color rojo.-

Los siguientes compuestos: N-benzil N-metil urea, N-etil N-oxilfenil N'-dibenzoil urea, N-etil N-2,4-dimetilfenil N'-etilurea, producen coloración cuando la reacción se efectúa sobre 10 mg. de los mismos.-

La misma cantidad de N-hidroxietil n-fenil urea y N-2-metil 4-oxifenil N'-etil urea solo produce vestigios de color.-

El timol reacciona como la citrulina, pero con cantidades inferiores a 1 mg. produce turbiedad.-

El ácido barbitúrico reacciona dando color amarillo.-

Sobre la naturaleza de la reacción es posible obtener algunos datos en base a la estructura de los dicetoderivados y derivados de

urea que reaccionan.-

Lang (2) dice que en el caso de la guanidina en medio alcalino, dos grupos carbonilos deben estar adyacentes en el dicetoderivado a que se produzca color en la reacción.-

Lo mismo debe decirse de la carbamido reacción con alfa.isonitrosopropiofenona.-

La alfa.isonitrosopropiofenona tiene por fórmula $C_6H_5-CO-C:NOH-CH_3$; cambio, el derivado $C_6H_5-CO-CO-C_6H_5$ no produce coloración.-

Lang estableció que por lo menos un grupo $-NH_2$ de los derivados la guanidina debe estar libre para que se produzca la reacción; esto es estricto en el caso de la carbamido reacción.-

Así, un compuesto de estructura $R_1-NH-CO-NH-R_2$ da un débil color con alfa.isonitrosopropiofenona y uno de más intensidad con diacetilmonoxima.-

Las amidas del tipo $R-CONH_2$ no dan color.-

Derivados de la urea de fórmula general $R-NH-CO-NH_2$ reaccionando una coloración más intensa con diacetilmonoxima que con alfa.isonitrosopropiofenona.-

Las ureas disustituidas del tipo $R_1R_2N-CO-NH_2$ dan colores insignificantes en cuanto a intensidad.-

Compuestos del tipo $R_1R_2N-CO-NHR_3$ ó $R_1R_2N-CO-N(R_3)_2$ no dan color.-

Como se indicó previamente, tanto el diacetilo como sus mono oxima dan el mismo desarrollo de color en la carbamido reacción, pero la intensidad de la coloración es un poco mayor con la diacetilmonoxima.-

En el caso del benzoil acetilo y su oxima los colores que se lucen tienen la misma intensidad.-

Lang emplea el benzoilacetilo en medio alcalino en reemplazo de diacetilo para determinar guanidina. También lo emplea para creatinina y arginina.-

Método de Archibald

Reactivos:

Mezcla sulfo-fosfórica: está compuesta por 1 volumen de ácido sulfúrico concentrado, 3 volúmenes de ácido fosfórico siruposo y 1 volumen de agua destilada.-

Solución de alfa.isonitrosopropiofenona al 4 % en alcohol etílico.-
solución testigo de urea: 10,7 mg. de urea en 100 ml. de agua destilada.-

Se guarda en heladera y se renueva mensualmente.-

Solución diluida de urea: 1 ml. de la solución anterior se diluye a 10 ml. con agua destilada; 1 ml. de esta solución equivale a 0,0107 mg. urea o a 0,005 mg. de N₂ ureico.-

Buffer de acetato: 10 g. de CH₃.COONa. 3H₂O y 10 ml. de ácido acético glacial se llevan a 1.000 ml. con agua destilada.-

Medimiento:

Se pueden usar para la determinación los filtrados de sangre privada de sus proteínas según los métodos de Somogyi, Fujita e Iwaatake, Ber y Van Slyke.-

Los dializados obtenidos según la técnica de Hamilton y Archibald son también satisfactorios.-

Para sangres con alto contenido de urea se usan diluciones mayores de 1:10.-

Cada 2 ml. de filtrado desproteinizado que se emplean en la determinación se mezclan en un tubo de ensayo con 5 ml. de agua destilada. El tubo de ensayo tiene un tapón de goma atravesado por un capilar de 1 mm. de diámetro.-

Preparación de muestras de orina: se diluyen de acuerdo al volumen de orina excretado por minuto según la tabla adjunta.-

Volumen de orina medido en ml/min.	Dilución para orinas con menos de 0,5% de prot.	Dilución para orinas con mas de 0,5% de prot.
menos de 0,2	1:1000	1:500
0,2-0,5	1:750	1:375
0,5-1,0	1:500	1:250
1,0-2,0	1:300	1:150
2,0-4,0	1:200	1:100
4,0-9,0	1:120	1:60
9,0-15	1:50	1:25

En el caso de tratarse de orinas con mas de 0,5 % de protefñas, debe proceder a la desproteinizaci3n antes de la diluci3n.-

Para el caso lfmite de 0,5 %, luego de una diluci3n de 1:500, es la indicada, la muestra para el an3lisis contiene 0,01 mg % de protefñas, lo que ocasiona solo un error de + 1 %.-

Para eliminar las protefñas se mezclan vol6menes iguales de orina y buffer de acetato; esta mezcla tiene un pH entre 4 y 5.-

Se calienta luego la mezola a 100^o C. y el precipitado de protefñas se elimina por centrifugaci3n o filtraci3n.-

La orina, una vez liberada de sus protefñas, debe diluirse como indica en la tabla adjunta en su 6ltima columna, con lo cual se obtiene una diluci3n final igual a la de la orina sin protefñas, equivalente a la columna del medio del cuadro.-

Luego, 2 ml. de orina diluida se pasan a un tubo de ensayo y se agrega 5 ml. de agua.-

Debe tenerse la precauci3n de no agregar timol como conservador a la orina, pues si contiene mas de 1 mg. en la diluci3n final, provoca turbiedad en la reacci3n.-

El blanco y el testigo se preparan colocando en sendos tubos de ensayo 0-2-4- y 6 ml. de soluci3n testigo diluida y 7- 5- 3- y 1 ml. de agua destilada respectivamente.-

A cada uno de los tubos que contiene 7 ml. de liquido se agregan 5 ml. de soluci3n fosfosulf6rica y 0,4 ml. de soluci3n de alfa.isotrosopropiofenona.-

Se mezcla por inversi3n y se tapan los tubos de ensayo con el tap3n especialmente preparado, colocando los tubos en un ba1o de agua para del contacto de la luz. El agua del recipiente debe llegar al nivel del liquido en los tubos.-

Luego de una hora de calentamiento, los tubos deben colocarse en un recipiente conteniendo agua a temperatura ambiente durante 15 minutos.-

Se efect6a luego la lectura en un espectrof3tmetro, con longitud de onda de 540 milimicrones, ajustando a cero con el blanco.-

En el caso de usarse un colorfmetro visual, debe compararse con el testigo mas semejante.-

Quando se usa el fotómetro, se construye una curva de calibración que relacione las concentraciones de urea con la densidad óptica de sus soluciones. Con las densidades ópticas obtenidas en los ensayos, y utilizando la curva de calibración, se pueden conocer las concentraciones de urea de los mismos.-

Siendo P los mg. de urea y D el volumen al cual 1 volumen de sangre u orina es diluido, se aplica al utilizar el fotómetro, la siguiente fórmula de cálculo:

g. % de N_2 ureico: 50. P. D.

Si se utiliza el colorímetro:

g. % de N_2 ureico: 50. D.C. S/U.

onde: S : lectura del testigo,

U : lectura del desconocido y

C : mg. de N_2 ureico del testigo.

La densidad óptica desarrollada en las soluciones de urea por esta reacción no es exactamente proporcional a la concentración de urea por encima de una densidad óptica de 500.-

En cuanto a la exactitud del método, se obtienen en orina resultados mayores en 2,8 % con respecto al método manométrico de la ureasa con una desviación standard de \pm 3,0 %.-

En sangre los resultados son 0,8 % mayores con una desviación standard de \pm 2,6 %.-

BIBLIOGRAFIA.-

1.- ARCHIBALD R. J. Biol. Chem. 157, 507 (1945).

2.- LANG Z. Physiol. Chem. 208, 273 (1932).

3.- HAMILTON y ARCHIBALD Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 16, 136 (1944)

P A R T E E X P E R I M E N T A L

METODO DE LA DIACETILMONOXIMA

INTRODUCCION

Como resultado de diversos ensayos previos utilizando las reacciones anteriormente descritas hemos seleccionado como la mas conveniente la técnica de Ornsby, introduciendo en ella algunas modificaciones con objeto de aumentar su sensibilidad y simplificar su ejecución.-

TECNICA MODIFICADA PARA LA DETERMINACION COLORIMETRICA DIRECTA DE UREA EMPLEANDO DIACETILMONOXIMA

Reactivos:

Mezcla fosfosulfúrica: está compuesta por 3 volúmenes de ácido fosfórico siruposo y 2 volúmenes de ácido sulfúrico concentrado.-

Solución de diacetilmonoxima al 3 % en agua destilada. Conservar preferentemente en heladera. La preparación de la diacetilmonoxima y su purificación se describen más adelante.-

Solución de persulfato de potasio al 1%. Se conserva en buenas condiciones unas 4 semanas, especialmente si se guarda en heladera.

Solución testigo concentrado de urea: al 4 por mil en agua destilada. Se conserva con unas gotas de cloroformo.-

Solución testigo diluida de urea: 0,5 ml. de la solución anterior se llevan a 100 ml. con agua destilada; 2 ml. de esta solución testigo equivalen a una muestra que contiene 0,2 g. por mil de urea y que ha sido diluida como se indica en el procedimiento dado a continuación.-

Procedimiento:

Dosaje de urea en sangre

Se emplea filtrado de sangre libre de proteínas según el método de Folín y Wu, tratando 1 ml. de sangre con 7 ml. de agua destilada, 1 ml. de ácido sulfúrico 2/3 N. y 1 ml. de tungstato de sodio al 10 %.-

Luego de agitar y filtrar, se toman 2 ml. de filtrado limpio para efectuar la determinación.-

En caso de disponer de un volumen reducido de muestra para su análisis, pueden reducirse proporcionalmente los volúmenes empleados en la desproteinización y utilizar 1 ml. de filtrado diluido al volumen original de 2 ml. con agua destilada.-

Puede también emplearse el siguiente micrométodo: en un tubo de

fondo cónico para centrifuga se coloca 1,4 ml. de agua destilada, 0,2 ml. de sangre, 0,2 ml. de ácido sulfúrico 2/3 N. y 0,2 ml. de tungstato de sodio al 10 %. Agitar, centrifugar 10 minutos a 2000 revoluciones por minuto y retirar con una pipeta 1 ml. del líquido sobrenadante, prosiguiendo con la técnica como se indica a continuación.-

Se toman 2 ml. del filtrado libre de proteínas (o 1 ml. y 1 ml. de agua destilada) y se le agregan 2,5 ml. de la mezcla fosfosulfúrica y 0,25 ml. de solución de diacetilmonoxima al 3 %.-

Luego de mezclar el contenido del tubo, se lo lleva a un baño de agua a ebullición durante 10 minutos, juntamente con un testigo preparado con 2 ml. de solución diluida de urea y un blanco con 2 ml. de agua destilada.-

Se retiran los tubos del agua hirviendo y se les agrega 0,25 ml. de solución de persulfato de potasio al 1 %.-

Esperar 5 minutos y diluir a 10 ml. con agua destilada.-

Efetuar la lectura en el fotocolorímetro empleando el filtro azul 47.-

El cálculo de la concentración de urea, efectuando las lecturas en la escala de densidades ópticas es el siguiente:

$$Cd = Ld \cdot 0,2/Lt.$$

donde:

Cd : concentración del desconocido en g/ml.

Ld : lectura del desconocido en densidad óptica.

Lt : lectura del testigo en densidad óptica.

0,2 : concentración en g/ml de la solución testigo.-

Dosaje de urea en orina.

0,1 ml. de orina se diluye a 10 ml. con agua destilada. De esa dilución se toma 0,2 ml. y se agrega 1,8 ml. de agua destilada. Ese volumen de 2 ml. es el que se utiliza para el dosaje de urea en orina, siguiendo el mismo procedimiento que para sangre.-

El cálculo se efectúa de la misma manera, pero teniendo en cuenta la dilución, que es 1:1000.-

En orinas con albúmina debe procederse a la desproteinización por uno de los procedimientos siguientes:

a) Empleando volúmenes iguales de orina y una mezcla de 10 g. acetato

de sodio cristalizado y 10 ml. de ácido acético glacial que se diluye hasta 1000 ml. con agua destilada. Las proteínas se coagulan colocando el tubo que contiene la mezcla en un baño de agua a ebullición.- Luego, el precipitado de proteínas se separa por filtración o centrifugación.-

b) Mezclar 8 ml. de orina con 2 ml. de solución saturada de acetato de plomo. Filtrar y a 5 ml. de filtrado agregar 3 ml. de solución saturada de sulfato de sodio; filtrar y diluir 0,25 ml. del filtrado a 25 ml. La orina ha sido así clarificada y diluida 1:200.-

INFLUENCIA DE LA ACIDEZ DEL MEDIO EN LA INTENSIDAD DE COLORACION

Se prepara una solución de urea que contiene 4 g. por litro de solución. De esta solución concentrada se toman 1,25 ml. y completa a 50 ml. en un matraz aforado con agua destilada.-

De esta manera se obtiene una solución de urea que contiene 0,1 g en un litro de solución, y en la que 1 ml. equivale a 0,1 mg. de urea.-

Se ella se toman en sendos tubos de ensayos: 0,0 - 0,1- 0,2- 0,3-.....0,8 ml.-

Se preparan 5 series de tubos en la forma indicada. Las cantidades de solución tomadas equivalen respectivamente a 0,00- 0,01- 0,02- 0,03....0,08 mg., de urea y corresponden al mismo valor numérico en gramos por mil de otras tantas soluciones de urea.-

El volumen de solución en cada tubo se completa a 2 ml. con agua destilada y a cada serie se le agrega:

1a. serie: 2,5 ml. de ácido clorhídrico concentrado.-

2a. serie: 2,5 ml. de ácido clorhídrico al 50 % V/v.-

3a. serie: 2,5 ml. de ácido sulfúrico al 50 % V/v.-

4a. serie: 2,5 ml. de mezcla fosfosulfúrica (3:2).-

5a. serie: 2,5 ml. de mezcla fosfosulfúrica diluida al 1:2 con agua destilada.-

Se prosigue en todos los casos con el método tal como se ha descrito, y los resultados obtenidos, expresados en densidades ópticas, se ordenan en cuadros comparativos.-

1a. serie: HCl concentrado:

Tubo No.	Densidad óptica.	Gramos/mil de urea.
1	30	0,01
2	55	0,02
3	84	0,03
4	118	0,04
5	180	0,05
6	240	0,06
7	315	0,07
8	435	0,08

2a. serie: HCl al 50 % V/v.-

Tubo No.	Densidad óptica	Gramos /mil de urea
1	48	0,01
2	65	0,02
3	87	0,03
4	112	0,04
5	150	0,05
6	194	0,06
7	225	0,07
8	255	0,08

3a. serie: SO₄H₂ al 50 % V/v.

Tubo No.	Densidad óptica	Gramos /mil de urea
1	47	0,01
2	96	0,02
3	120	0,03
4	204	0,04
5	278	0,05
6	310	0,06

Tubo No.	Densidad óptica	Gramos/mil de urea
7	335	0,07
8	415	0,08

4a. serie: mezcla fosfosulfúrica.-

Tubo No.	Densidad óptica.	Gramos/mil de urea.
1	50	0,01
2	130	0,02
3	210	0,03
4	300	0,04
5	378	0,05
6	495	0,06
7	565	0,07
8	635	0,08

5a. serie: mezcla fosfosulfúrica diluída 1:2.-

Tubo No.	Densidad óptica	Gramos/mil de urea
1	45	0,01
2	95	0,02
3	150	0,03
4	195	0,04
5	285	0,05
6	360	0,06
7	415	0,07
8	475	0,08

De las tablas expuestas anteriormente se deduce la conveniencia de emplear la mezcla fosfosulfúrica en la determinación, pues con ella se consigue un máximo de densidad óptica, aumentándose con ello la sensibilidad del método.-

La. S. R. I. D. N. G. I. C. O. S. E. L. I. G. I. O. S. A. D. O.

y
Densidad
g/cm³

0,1

0,05

0

100

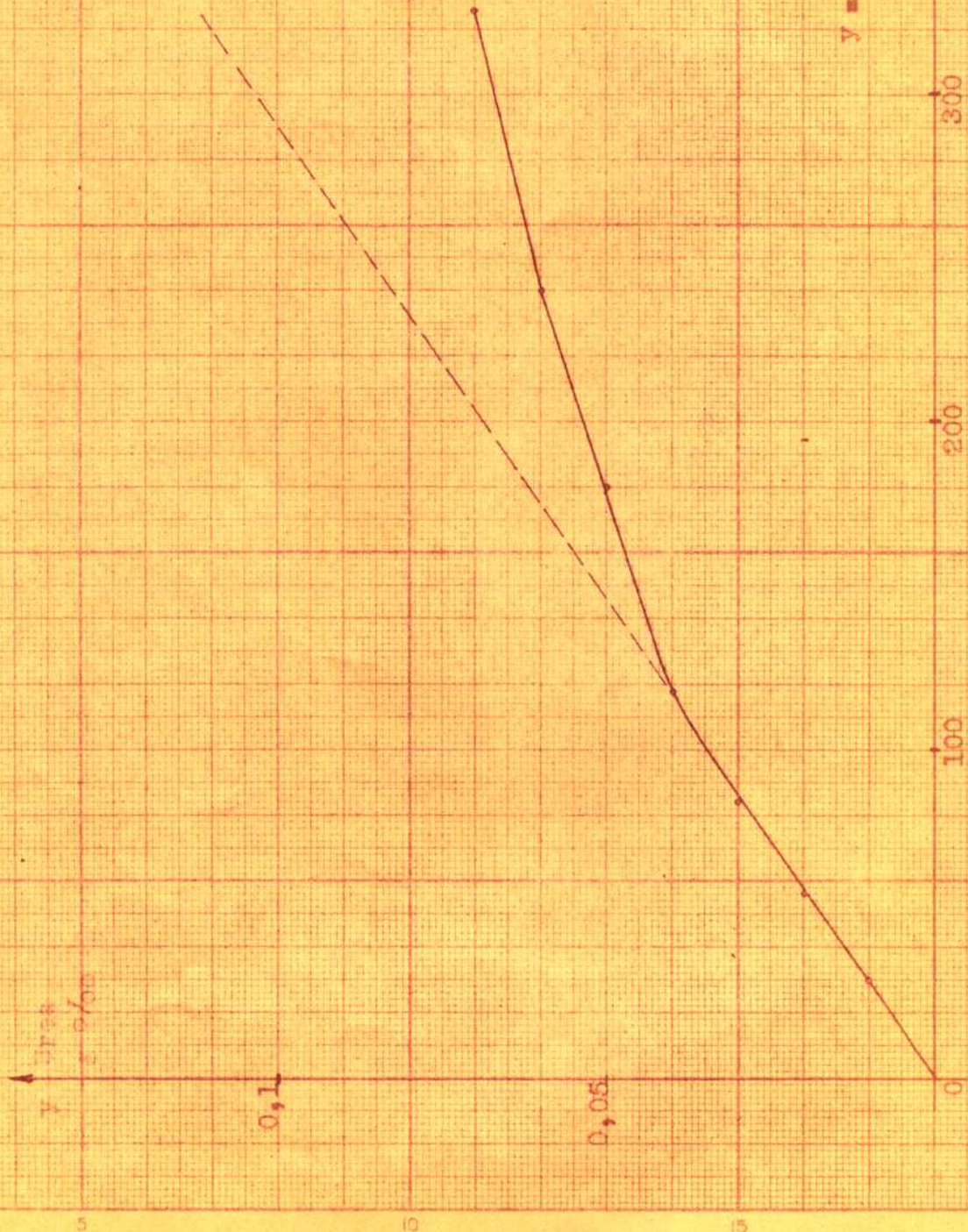
200

300

x

Densidad g/cm³

$$y = 0,00035 \cdot x$$



2a. SERIE: HCl 50% V/V

y Urea
g^o/cc

0,1

0,05

0

100

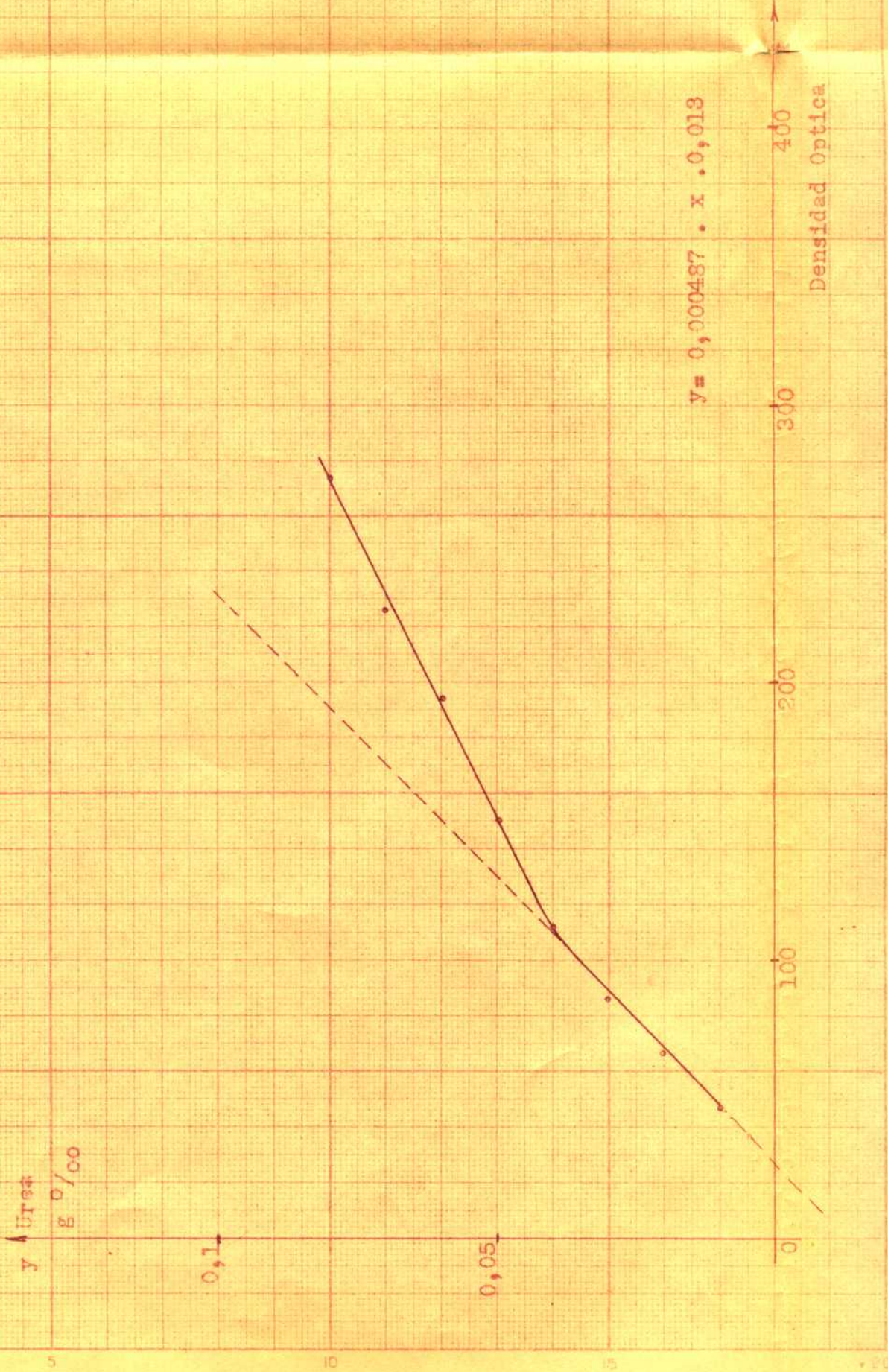
200

300

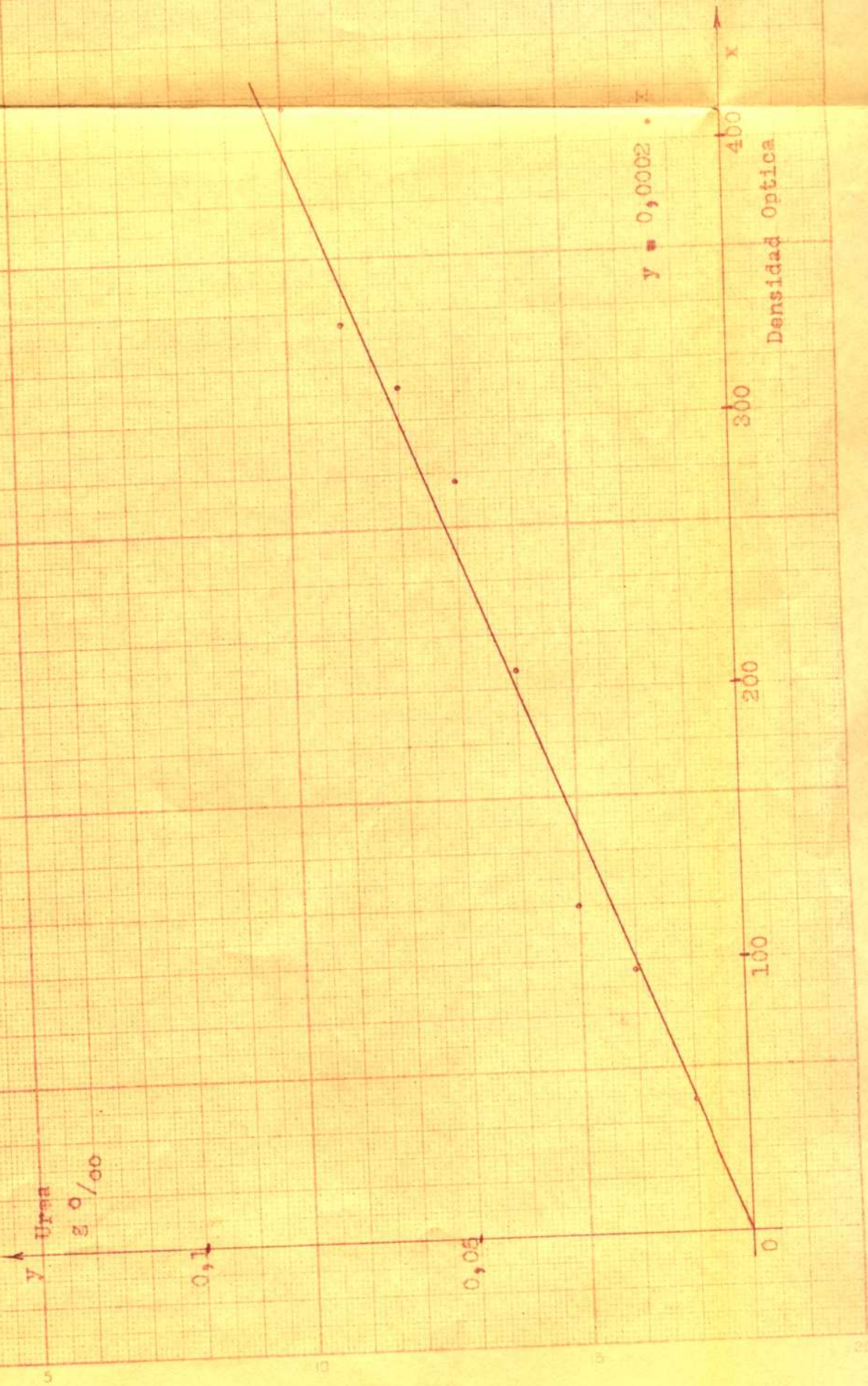
400

Densidad Optica

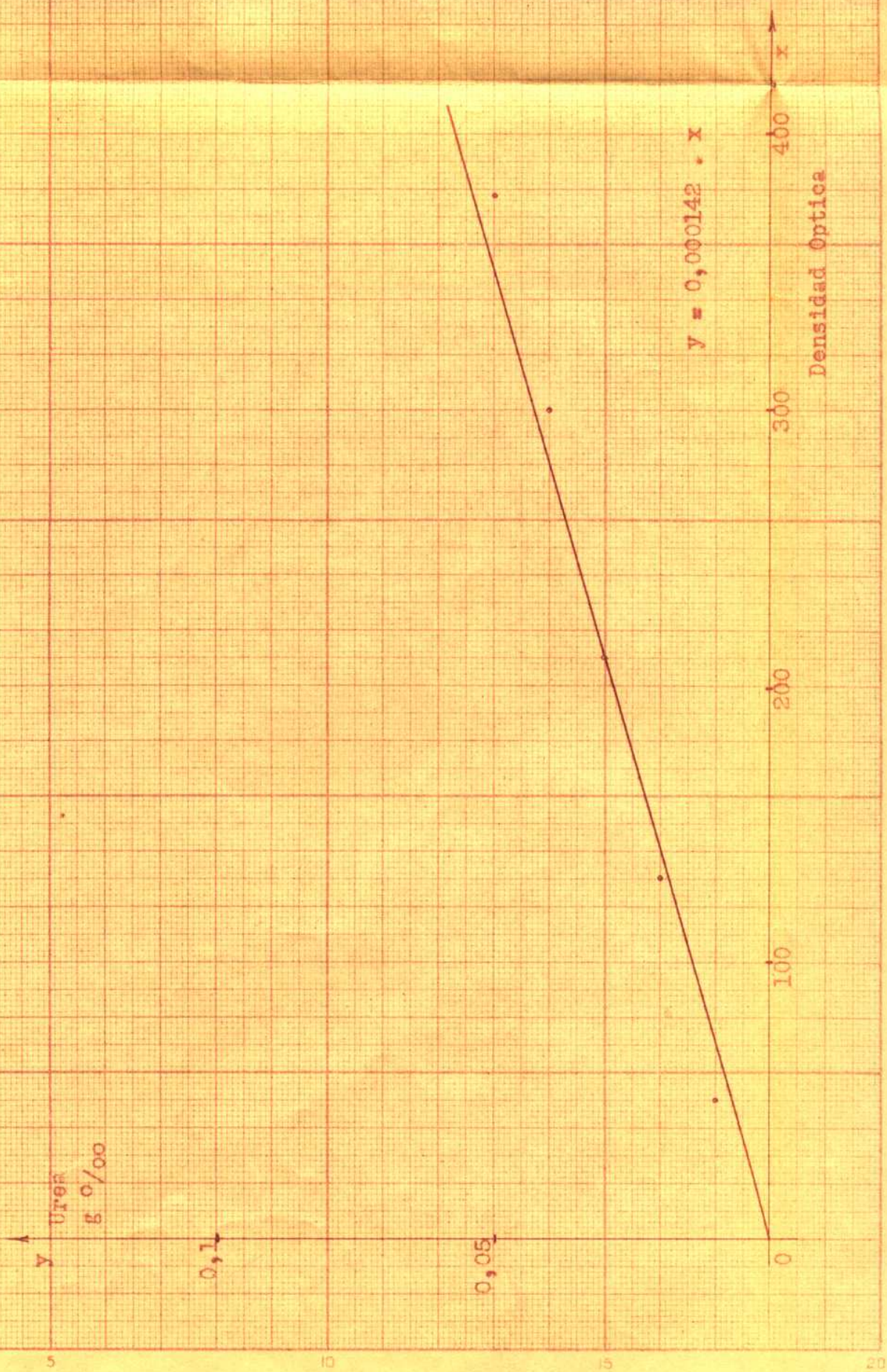
$$y = 0,000487 \cdot x \cdot 0,013$$



3a. SERIE: SO_4H_2 50% V/V



4a. SERIE: MEZCLA FOSFOSULFURICA



Sa. SERIE: MEZCLA FOSFOSULFURICA DILUIDA 1:2



De lo expuesto se deduce también que la intensidad de coloración depende de la acidez del medio, aumentando cuando ésta aumenta.-

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DEL OXIDANTE

Se utiliza preferentemente el persulfato de potasio como oxidante que aumenta la coloración producida en la reacción de condensación entre la urea y la diacetilmonoxima en medio ácido, pues no destruye el color producido.-

Otros oxidantes energéticos, como el nitrito de sodio, destruyen la coloración.-

La concentración de persulfato tiene gran influencia en la intensidad cromática desarrollada, así como la forma en que se agregue influye en la uniformidad del método.-

El persulfato debe agregarse de manera que forme un anillo superficial en todos los tubos donde se practica el método. Una vez logrado esto, deben agitarse todos al unísono para que la mezcla se produzca en todos los tubos al mismo tiempo.-

En cuanto al efecto de las distintas concentraciones de persulfato, se realizaron ensayos con muestras a las que se agregó cantidades crecientes de solución al 1% de persulfato de potasio.-

Son ellas: 0,125 - 0,25- 0,50- 0,75 cc.

A partir de 0,25 cc., el exceso de persulfato no tiene influencia en la densidad óptica de la solución obtenida, por lo cual consideramos esa cantidad como la mas aconsejable para incorporar durante la reacción. Los resultados obtenidos en los ensayos realizados fueron los siguientes:

Tubo No.	Densidad óptica	Gramos/mil de urea
1	28	0,01
2	69	0,02
3	110	0,03
4	177	0,04
5	226	0,05
6	300	0,06
7	370	0,07
8	462	0,08

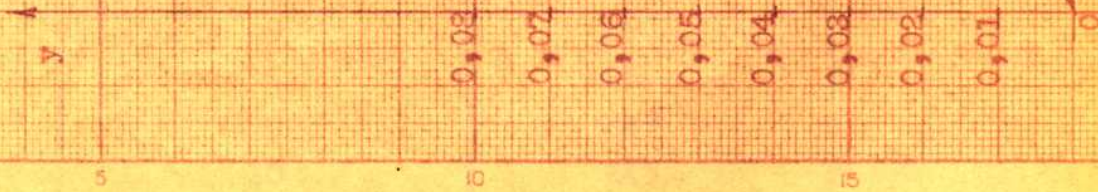
INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DEL OXIDANTE

Y Urea
g./ml

0,125 ml. $S_2O_8K_2$ 1%.

0,25 ml. $S_2O_8K_2$ 1%.

Densidad Optica



utilizando 0,125 ml. de solución de persulfato de potasio al 1%.
Cuando se emplearon 0,25 ml. se obtuvo el siguiente cuadro de valores:

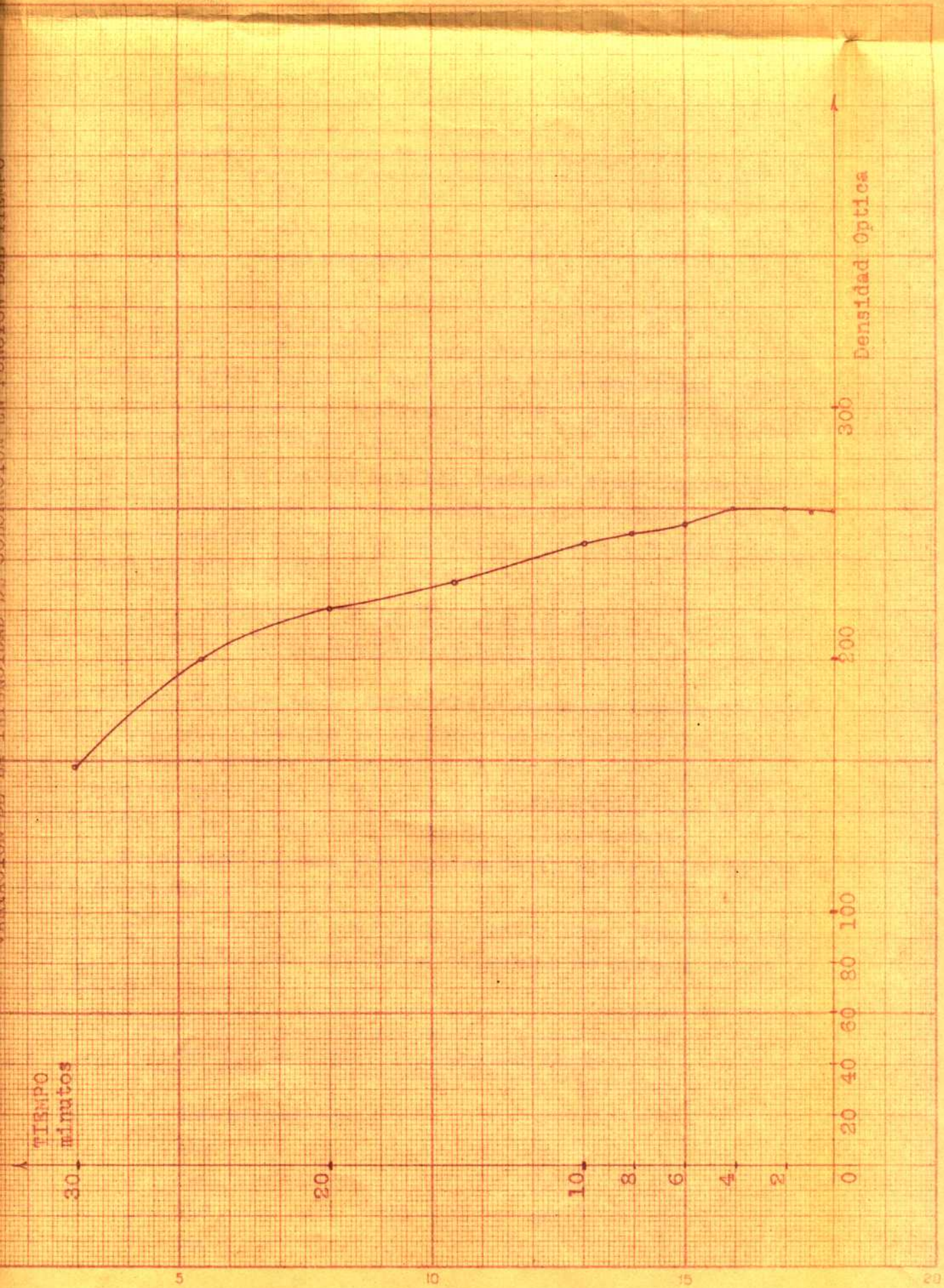
Tubo No.	Densidad óptica.	Gramos/mil de urea
1	50	0,01
2	130	0,02
3	210	0,03
4	300	0,04
5	378	0,05
6	495	0,06
7	565	0,07
8	635	0,08

Alse aumenta el volumen de solución de oxidante por encima de ese valor no se obtiene un aumento considerable de la intensidad de coloración.-

INFLUENCIA DEL TIEMPO EN LA DENSIDAD OPTICA
DE LA REACCION

Se prepara por dilución como se indicó para casos anteriores una solución de urea al 0,05 por mil. Con ella se efectuaron 5 determinaciones según la técnica indicada; el promedio de las densidades ópticas obtenidas a intervalos fijos de tiempo se indica en la tabla de valores adjunta:

Tiempo transcurrido	Densidad óptica
½	260
1	260
2	260
3	260
4	260
5	260
6	254
8	249
10	245
15	230



Tiempo transcurrido	Densidad óptica.
20	222
25	200
30 minutos	158
.....
24 horas	0

Como comprobación final se dejó estar en la oscuridad por 24 horas el producto de los ensayos realizados. Al día siguiente la coloración había desaparecido en todos los tubos.-

De lo anterior se deduce que las lecturas espectrofotométricas o colorimétricas deben realizarse inmediatamente después de la dilución final, con lo que se obtiene un margen de tiempo (5 minutos) durante el cual la coloración es estable.-

INFLUENCIA DE LA LONGITUD DE ONDA
EN LA REACCION CROMATICA

Los mismos ensayos de la experiencia anterior fueron utilizados para estudiar la influencia de la longitud de onda de la luz incidente en la densidad óptica de la reacción cromática en estudio.-

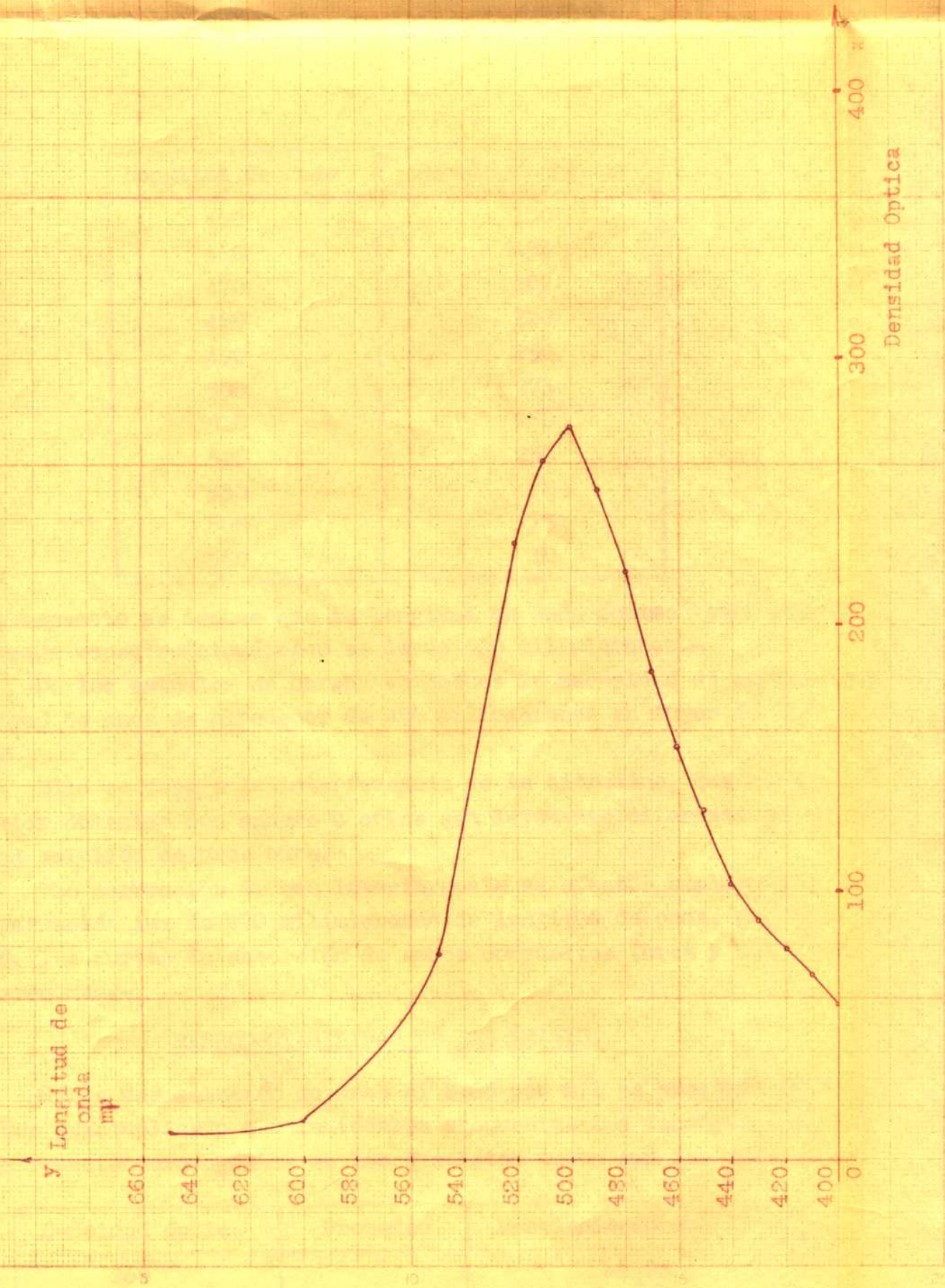
Se preparó una solución de urea de concentración 0,2 por mil y se efectuó sobre ella la reacción de la diacetilmonoxima.-

Luego se estudió la densidad óptica de la misma a las distintas longitudes de onda.-

Para ello se empleó un espectrofotómetro Erma (Tokyo) No. 610 a red de difracción. Los resultados obtenidos se ordenan en el cuadro adjunto.

Longitud de onda	Densidad óptica
400 milimicrones	58
410	68
420	78
430	88
440	102

INFLUENCIA DE LA LONGITUD DE ONDA



Longitud de onda	Densidad óptica
450	130
460	154
470	182
480	220
490	250
500	275
510	260
520	230
550	78
600	15
650	10

De lo expuesto se deduce que la longitud de onda óptima para efectuar el dosaje espectrofotométrico es la de 500 milimicrones.-

De los estudios de Onrsby se deduce la necesidad de emplear una longitud de onda de alrededor de 470 milimicrones en lugar de la indicada.-

Ello se debe a la interferencia de la citrulina, que hace que el color obtenido con sangre u orina sea levemente diferente al obtenido con solución de urea pura.-

La corrección de esa interferencia se efectúa empleando en la determinación luz de 470 milimicrones de longitud de onda, que es cuando las curvas de absorción de ambos compuestos (urea y citrulina) difieren mas.-

REPRODUCTIBILIDAD DE LOS ENSAYOS

Sobre una solución de urea al 0,05 por mil se practicaron dosajes por quintuplicado con la técnica propuesta. Las densidades ópticas de la reacción cromogénica en los distintos tubos son las siguientes:

Densidad óptica	Promedio	Desviaciones del promedio
260		-1,81 %
270		+1,96 %
265	264,80	+0,07 %

Densidad óptica	Promedio	Desviaciones del promedio
267		+ 0,83 %
262		- 1,06 %

De lo expuesto se deduce que las desviaciones en cuanto a reproductibilidad son aceptables, pues oscilan entre los límites máximos de + 1,96 % y - 1,81 %.-

CUMPLIMIENTO DE LA LEY DE LAMBER

Y BEER

En la fotocolorimetría se determina la cantidad de luz absorbida en un determinado intervalo espectral por una solución de la sustancia en ensayo.-

En los métodos fotocolorimétricos, a diferencia de los colorimétricos, no se comparan colores, sino intensidades luminosas para un determinado intervalo de longitud de onda conseguido por medio de filtros de color, prismas o redes de difracción.-

En la colorimetría se comparan los colores producidos por la solución en ensayo y una solución de concentración conocida del compuesto que se determina, sobre las que se practicaron las reacciones cromáticas.-

La intensidad de la luz transmitida por una solución disminuye en proporción geométrica cuando la concentración de la solución o el espesor de la capa bajo la cual se observa aumentan en progresión aritmética.-

La ecuación que expresa esta ley es la siguiente:

$$I_t : I_o . 10^{-e.l.c.}$$

donde:

I_t . intensidad de luz transmitida.

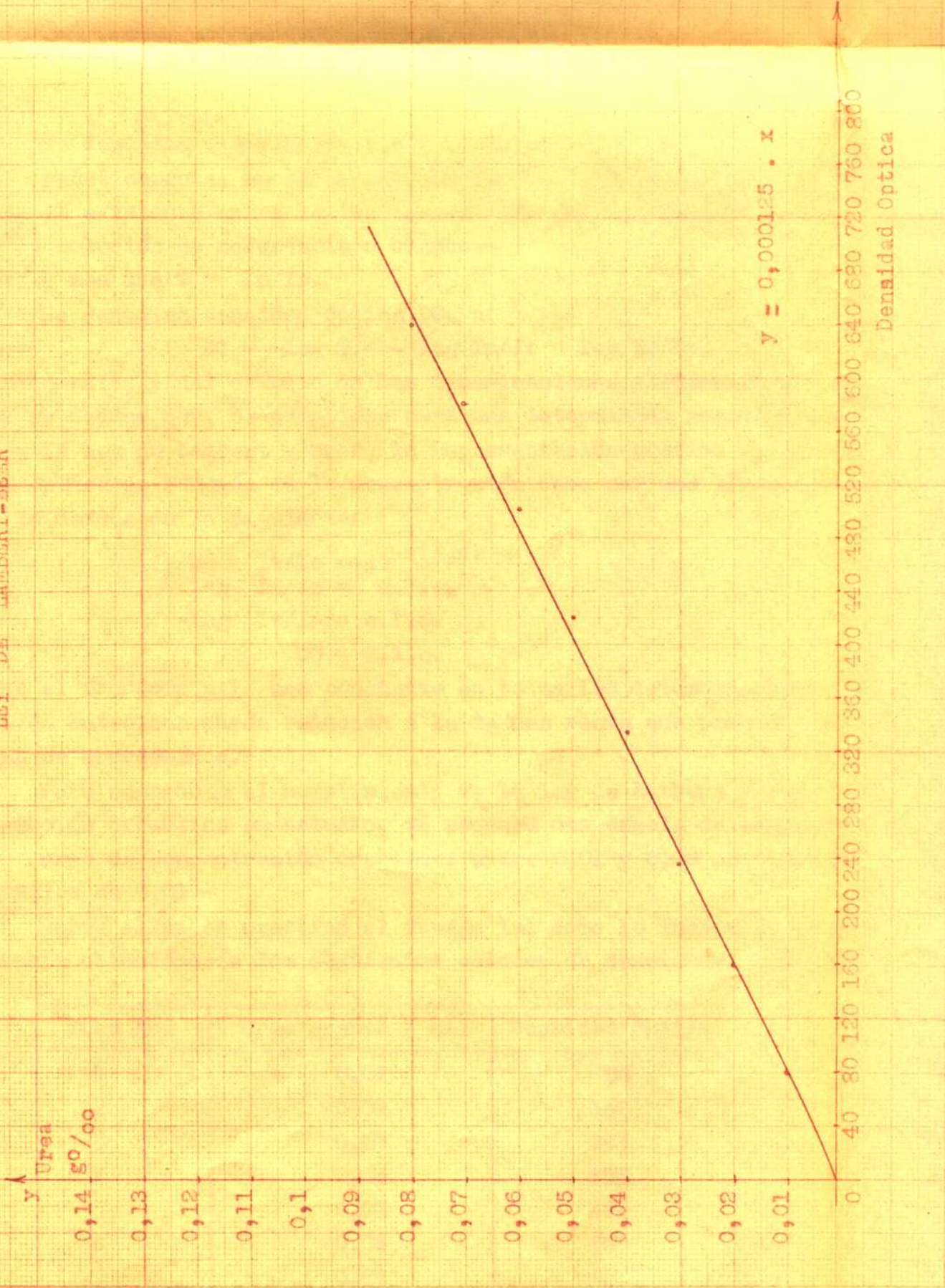
I_o . intensidad de luz incidente.

l . espesor de la capa de observación en cm.

c . concentración de la solución.

e . coeficiente de extinción, o sea el valor recíproco de la concentración de la solución que disminuye a 1/10 la intensidad de la luz incidente cuando se observa bajo un espesor de 1 cm.-

LEY DE LAMBERT-BEER



Se denomina transmisión T. a la relación I_t/I_o .-

Prácticamente, en el espectrofotómetro, ésta relación está dada por la existente entre la luz transmitida por la solución problema y la solución de referencia o blanco.-

O sea que $T = I_p/I_r$.

Se denomina densidad óptica DO. a:

$$DO = -\log T = -\log I_p/I_r = \log I_r/I_p.$$

Prácticamente, y del estudio de las denominaciones y fórmulas presentadas se deduce que, de cumplirse para una determinada reacción cromática la ley de Lambert y Beer, la representación gráfica de la densidad óptica en función de la concentración debe ser una línea recta.- Esto se deduce en lo siguiente:

$$\begin{aligned} I_t/I_o &= 10^{-e.l.c.} \\ \log I_t/I_o &= e.l.c. \\ -\log I_t/I_o &= e.l.c. \\ DO &= e.l.c. \end{aligned}$$

Siendo el producto e.l. una constante en todas las determinaciones, la ecuación antedicha queda reducida a la de una recta que pasa por el origen de coordenadas.-

Para comprobar el cumplimiento de la ley de Lambert y Beer por la reacción cromática en estudio, se preparó una escala de soluciones de urea de concentración creciente entre 0,01 y 0,08 por mil con intervalos de 0,01.-

Sobre ellas se practicó el dosaje tal como lo indica la técnica propuesta obteniéndose los siguientes valores de densidades ópticas:

Tubo No.	Urea gramos / mil	Densidad óptica
1	0,01	80
2	0,02	160
3	0,03	235
4	0,04	335
5	0,05	420
6	0,06	500
7	0,07	580
8	0,08	640

Llevados estos valores a un sistema de coordenadas, se observa que los resultados obtenidos forman una recta, con lo cual se comprueba el cumplimiento de la ley de Lambert y Beer.-

BIBLIOGRAFIA.-

- 1.- MORA LARA. Análisis clínicos por fotocolorimetría. Ed. Paz Montalvo. Madrid. (1955).-
- 2.- FEARON W.R. Biochem. J. 33, 903 (1939).-
- 3.- ORNSBY A. J. Biol. Chem. 146, 595 (1942).-
- 4.- GORMALL y HUNTER. Biochem. J. 35, 650 (1941)
- 5.- ORNSBY A. J. Biol. Chem. 146, 595 (1942).
- 6.- BARKER S.B. J. Biol. Chem. 152, 453 (1944).-
- 7.- OREKHOVICH y TUSTANOVICH. Biokhimiya, 14, 144 (1949).-

COMPARACION DE LOS VALORES OBTENIDOS CON EL METODO DE LA DIACETILMONOXIMA CON LOS DE LA UREASA Y EL HIPOBROMITO.

Se efectuaron una serie de dosajes de urea, sobre sangre y orina, usando conjuntamente los métodos de la diacetilmonoxima, de la ureasa por nesslerización directa y del hipobromito.-

Los fines perseguidos con esta triple comparación fueron múltiples: por un lado, comparar el método de la diacetilmonoxima con uno de reconocida exactitud, como es el de la ureasa; por otro, comparar y obtener datos concretos sobre las desviaciones del método del hipobromito.-

A continuación se detallan las técnicas empleadas.-

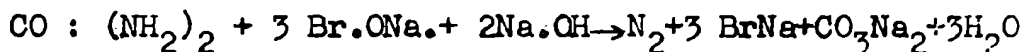
Método del hipobromito de sodio.

El procedimiento consiste en hacer reaccionar en medio alcalino el hipobromito de sodio sobre la urea.-

La reacción es compleja: la urea se transforma primero en un derivado bromado que luego se descompone por hidrólisis y oxidación.-

Finalmente, la reacción lleva a un desprendimiento de nitrógeno, pero a la vez se produce la formación de otros compuestos: cianuros, nitritos, hidracina.-

El balance general de la reacción es el siguiente:



ya ella corresponde la mayor parte de la urea.-

Empleado sin precauciones, el hipobromito no da más del 90 o 92% del nitrógeno ureico, lo que lleva al empleo de una solución testigo de urea o a un coeficiente de corrección.-

Estos métodos de proceder no son aconsejables. El empleo de reactivos muy alcalinos y de ureómetros a mercurio que permiten una agitación adecuada elevan el rendimiento de la operación; pero el reactivo alcalino en exceso es de conservación precaria.-

Esta dificultad se soluciona alcalinizando el reactivo bromo-bromado de Yvon en el momento del análisis, con hidróxido de sodio en solución y dentro mismo del ureómetro.-

El amoníaco se dosa junto con la urea y produce un aumento aparente en el resultado del análisis.-

La influencia de la creatinina y otros productos nitrogenados es despreciable.- Los rendimientos del método, en estas condiciones, son vecinos a los teóricos y los resultados presentan errores de alrededor del 2 %.-

5 ml. de sangre o suero se mezclan con 5 ml. de ácido tricloroacético preparado según Moog (solución al 20 % preparada calentando el ácido hasta fusión y mezclando 20 ml. del mismo con 80 ml. de agua destilada).-

Se agita y luego de unos minutos se filtra.-

Empleamos para el dosaje el ureómetro de Ambard calibrado con soluciones testigo de urea.-

5 ml. del filtrado obtenido anteriormente se introducen por la copita del ureómetro, previamente lleno de agua. La copa del ureómetro se lava con 2 ml. de agua destilada que contiene 20 gotas de Na.OH al 20 %.-

De la misma manera se introducen 5 ml. de hipobromito de sodio, y se deja desarrollar la acción del mismo sobre la urea, agitando la mezcla por medio de mercurio.-

Se lee el volumen de N_2 desprendido luego de esperar 2 minutos y efectuar una agitación final.-

La solución de hipobromito de sodio (reactivo de Ivon), se prepara disolviendo 5 ml. de bromo en 50 ml. de Na.OH al 20 %.-

Los valores obtenidos se corrigen a condiciones normales de temperatura y presión por medio de una tabla de calibración preparada con soluciones tipo de urea (1).-

Método de la ureasa

Reactivos:

Solución concentrada de $SO_4(NH_4)_2$: se prepara disolviendo 4.720 g. del producto en agua destilada con 1 ml. de SO_4H_2 y completando a 1.000 ml. con el mismo disolvente. 1 ml. de esta solución equivale a 1 mg. de N_2 .-

Solución diluida: se prepara diluyendo 5 ml. de la solución anterior a 100 ml. con agua destilada. 1 ml. de esta solución equivale a 0,05 mg. de N_2 y a 0,107 mg. de urea.-

Reactivo de Nessler: consta de dos soluciones:

a) Solución de yoduro doble de mercurio y potasio: colocar en un matraz aforado de 1.00 ml. de capacidad 13,55 g. de Cl_2Hg . puro muy finamente pulverizado; agregar alrededor de 100 ml. de agua destilada y 36 g. de yoduro de potasio. Agitar la mezcla hasta disolución completa y llevar a volumen con agua destilada.-

b) Solución de Na.OH al 40 %.-

El reactivo de Nessler se prepara agregando a 100 ml. de solución a), 30 ml. de solución b).-

Tartrato de sodio y potasio al 25 %.-

Fosfato disódico M/15: se disuelven 11,876 g. de $\text{PO}_4\text{HNa}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ en agua destilada y se completa a 1.000 ml.-

Fosfato monopotásico M/15: se disuelven 9.078 g. de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ en agua destilada y se completa a 1.000 ml.-

Solución reguladora de pH 6,7: se prepara mezclando 57 ml. de solución de fosfato monopotásico con 43 ml. de solución de fosfato disódico.-

Suspensión de ureasa: pesar 250 mg. de ureasa. Triturarla en mortero y suspenderla en 5 ml. de solución reguladora. 0,5 ml. de la suspensión equivalen a 25 mg de ureasa.-

Esa cantidad de ureasa es capaz de hidrolizar la urea en 10 minutos. Tungstato de sodio al 10 %.-

Acido sulfúrico 2/3 N.-

Método:

En dos tubos de ensayo colocar 1 ml. de sangre, suero o plasma y 6,5 ml. (sangre) ó 7,5 ml. (suero o plasma) de agua destilada.- Mezclar por rotación.-

A unos de esos tubos (BLANCO), agregar una gota de yoduro doble de mercurio y potasio; el otro es el DESCONOCIDO. A ambos tubos agregar 0,5 ml. de suspensión de ureasa (25 mg) y mezclar.-

Dejar en reposo durante 10 minutos a una temperatura entre 30 y 40 grados.- Luego a cada tubo se le agrega 1 ml. (sangre) ó 0,5 ml. (suero o plasma) de tungstato de sodio al 10 % y de ácido sulfúrico 2/3 N.-

Agitar fuertemente y dejar en reposo 5 minutos. Filtrar y colocar en dos probetas de 10 ml. 2 ml. de cada filtrado (equivalente a 0,2 ml. de sangre), llevando a 8 ml. con agua destilada.-

Agregar 0,4 ml. de solución de tartrato de sodio y potasio y 1 ml. de reactivo de Nessler y completar a 10 ml. con agua destilada. Mezclar.

Leer en el fotocolorímetro luego de 5 minutos, usando el filtro azul 440 y haciendo el cero del aparato con agua destilada.-

El testigo se prepara con 0,4 ml. de la solución tipo diluída de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ que se trata de la misma manera, leyéndose en el fotocolorímetro contra un blanco en el que se reemplaza la solución testigo por agua destilada y que contiene todos los reactivos.-

El cálculo se realiza con la siguiente fórmula:

$$\text{Cd. (g./mil)} = \text{Ct. Ld/Lt. } 0,5$$

donde:

Cd. concentración de urea en el desconocido en g./mil.-

Ct. concentración del testigo en g./mil de urea: 0,107 g./mil.

Ld. densidad óptica del desconocido.

Lt. densidad óptica del testigo.

0,5 factor de dilución.-

(2)

BIBLIOGRAFIA.-

- 1.- J. LOISELEUR y colaboradores. Techniques de Laboratoire. Masson et Cie. (1954).-
- 2.- MARENZI A.D. An. Farm. y Bioquímica. 16,3 (1945).-

COMPARACION DE RESULTADOS

Se efectuaron dosajes simultáneos en sangre y orina por los métodos del hipobromito, de la ureasa y de la diacetilmonoxima.-

Los resultados obtenidos se indican en el cuadro adjunto.-

DOSAJE EN SANGRE

Caso No.	Método del hipobromito Urea en g/ mil.	Método de la ureasa. Urea en g/mil.	Método de la diacetilmonoxima. Urea en g/mil
1	0,19	0,18	0,19
2	0,28	0,21	0,20
3	0,19	0,15	0,17
4	0,29	0,25	0,26
5	0,28	0,22	0,23
6	0,47	0,38	0,38
7	0,39	0,36	0,37
8	0,19	0,16	0,17
9	0,18	0,17	0,16
10	0,75	0,67	0,67
11	0,92	0,89	0,91
12	0,29	0,23	0,23
13	0,65	0,61	0,63
14	0,19	0,17	0,19
15	0,80	0,71	0,72
16	0,92	0,87	0,88
17	0,18	0,15	0,16
18	0,18	0,17	0,17
19	0,18	0,17	0,18
20	0,56	0,47	0,46

DOSAJES EN ORINA

Caso No.	Método del hipobromi- to, g/mil de urea	Método de la diacetil- monoxima g/mil de urea
1	17,64	16,20
2	18,90	16,90
3	10,08	9,75
4	21,46	20,08
5	25,20	23,60
6	30,24	28,75
7	26,46	26,10
8	11,34	10,61
9	13,86	11,70
10	20,16	18,20
11	11,34	10,99
12	14,88	13,75
13	17,36	16,70
14	22,32	20,87
15	23,56	21,95

ESTUDIO ESTADISTICO DE LOS VALORES
OBTENIDOS CON LAS DIFERENTES TECNICAS

El propósito de las valoraciones efectuadas fué comparar la técnica en estudio con otras dos de aplicación usual en el campo biológico, y una de las cuales (la de la ureasa) proporciona resultados muy cercanos al verdadero valor.-

En cuanto a la otra técnica de comparación, la del hipobromito, aunque es sabido que sus resultados se apartan de la realidad, se la utilizó por ser una técnica corriente y de rutina en casi todos los laboratorios de análisis biológicos.-

La finalidad del presente capítulo es el estudio de la significación estadística de las series de valores obtenidos.-

Para la comprensión de los resultados a exponerse es necesario una breve introducción teórica donde se expondrá el camino a seguir en el planteo del problema desde un punto de vista estadístico.-

El único factor cuya influencia nos interesa analizar es el factor técnica de análisis: por lo tanto, hemos mantenido constantes los demás factores, realizando determinaciones simultáneas sobre el mismo líquido problema (sangre).. .

A partir de los valores numéricos de las determinaciones analíticas efectuadas se obtuvieron una serie de constantes estadísticas para cada grupo de valores o serie, que se enumeran a continuación.-

CONSTANTES ESTADISTICAS

Promedio aritmético (P.A.): $\frac{Sx}{n}$

donde n representa el número de determinaciones de la serie y Sx la suma de los n valores individuales.-

Desviación tipo, normal, cuadrática media o standard (D.S.):

$$D.S. : \sqrt{\frac{S(dx)^2}{n}}$$

donde dx es la desviación simple de cada término, S(dx)² es la suma de los cuadrados de las desviaciones simples y n el número de los valores o términos observados.-

Para pequeñas muestras (n < 30) se utiliza la siguiente fórmula:

$$D.S. : \sqrt{\frac{S(dx)^2}{n-1}}$$

Una desviación tipo grande indica que la distribución en frecuencia está ampliamente extendida hacia ambos lados del P.A. mientras que una desviación tipo pequeña indica que los valores se concentran apretadamente alrededor del promedio aritmético.-

Error tipo, normal o Standard: E.S. : $\frac{D.S.}{\sqrt{n}}$

Así como la desviación tipo o Standard señala la dispersión de los valores con respecto al P.A. , el error Standard es una noción estadística que indica la dispersión de los P.A. de series semejantes a la estudiada y pertenecientes a la misma población.-

Comparación de dos promedios:

La comparación de dos promedios se realiza calculando el error Standard de la diferencia de los dos promedios: (E.S._d).-

Para muestras de un número grande de valores se emplea la fórmula:

$$E.S._d : \sqrt{E.S._1^2 + E.S._2^2}$$

Para pequeñas muestras se utiliza la fórmula:

$$E.S._d : \frac{S}{\frac{n_1 \cdot n_2}{n_1 + n_2}}$$

donde: $S : \sqrt{\frac{S(dx_1)^2}{n_1} + \frac{S(dx_2)^2}{n_2 - 2}}$

Las letras tienen el mismo significado que en las fórmulas anteriores y los subíndices 1 y 2 se refieren a las dos series consideradas.-

Se entiende por pequeña muestra aquella en que $n_1 + n_2 - 2 < 30$.

Significación de la diferencia de dos promedios:

Decimos que una diferencia entre dos promedios es significativa cuando la probabilidad que ésta diferencia ocurra en series extraídas de la misma población es igual o menor de $\frac{1}{20}$.-

Para series numerosas esto ocurre cuando la diferencia de los

promedios es igual o mayor que dos veces el error tipo (standard) de la diferencia de promedios (E.S._d).-

Expresado algebraicamente cuando:

$$\frac{P_1 - P_2}{E.S._d} \geq 2.$$

A esa relación se la designa con la letra t.-

Por lo tanto podemos decir que para series numerosas la diferencia de promedios es significativa cuando t > 2.-

En el caso de series poco numerosas ($n_1 + n_2 - 2 < 30$), el valor de t para el cual la diferencia de promedios se hace significativa varia en forma inversa a $n_1 + n_2 - 2$, y debe ser calculado en cada caso de acuerdo a tablas especiales (ver R.A. Fisher: Statistical Methods for Research Workers, pág. 174, (1946).-

Para abreviar usaremos en lo sucesivo la siguiente nomenclatura:

Método de hipobromito: Serie 1:

Método de la ureasa : Serie 2;

Método de la diacetilmonoxima: Serie 3.

Los resultados obtenidos en los cálculos estadísticos se agrupan a continuación:

Serie	P.A.	D.S.	E.S.	E.S. _d	t.
1	0,40	0,265	0,060	entre 1 y 2 0,082	0,48
2	0,36	0,25	0,056	entre 2 y 3 0,0805	0,12
3	0,37	0,258	0,058	entre 1 y 3 0,083	0,36

Del exámen de los resultados obtenidos, en particular de los valores de $E.S._d$ y de t se concluye que las diferencias numéricas en los datos analíticos de las diferentes técnicas carecen de significación estadística.-

Por lo tanto, los resultados analíticos obtenidos con la técnica en estudio son perfectamente comparables con los obtenidos por medio de la técnica de la ureasa, considerada como una de las más exactas para la determinación de urea en medios biológicos.-

Por otra parte, y con respecto a la técnica del hipobromito, el estudio estadístico demuestra que las diferencias analíticas que presenta con las otras dos técnicas carecen de significación, mientras que los valores obtenidos se asemejan mas a los del método de la diacetilmonoxima que a los del método de la ureasa.-

PREPARACION DE UN TESTIGO ARTIFICIAL ESTABLE

El objeto de los ensayos practicados fue obtener un testigo estable, tanto para la calibración fotocolorimétrica como para la lectura colorimétrica o la comparación visual por medio de una escala de colores crecientes y de equivalencia conocida.-

Los primeros ensayos se efectuaron con solución de $\text{Cr}_2\text{O}_7\text{K}_2$ al 1 % que contenía 1 ml. de HCl concentrado para asegurar la reacción ácida del medio y la estabilidad de color de la solución.-

De esa solución tomamos:

0,1 - 0,2- 0,3-.....-1 ml, en sendos tubos de ensayo y llevamos a 10 ml. con agua destilada.-

Lefmos la densidad óptica de las soluciones así preparadas, ajustando a cero el fotocolorímetro con agua destilada y empleando el filtro azul 470.-

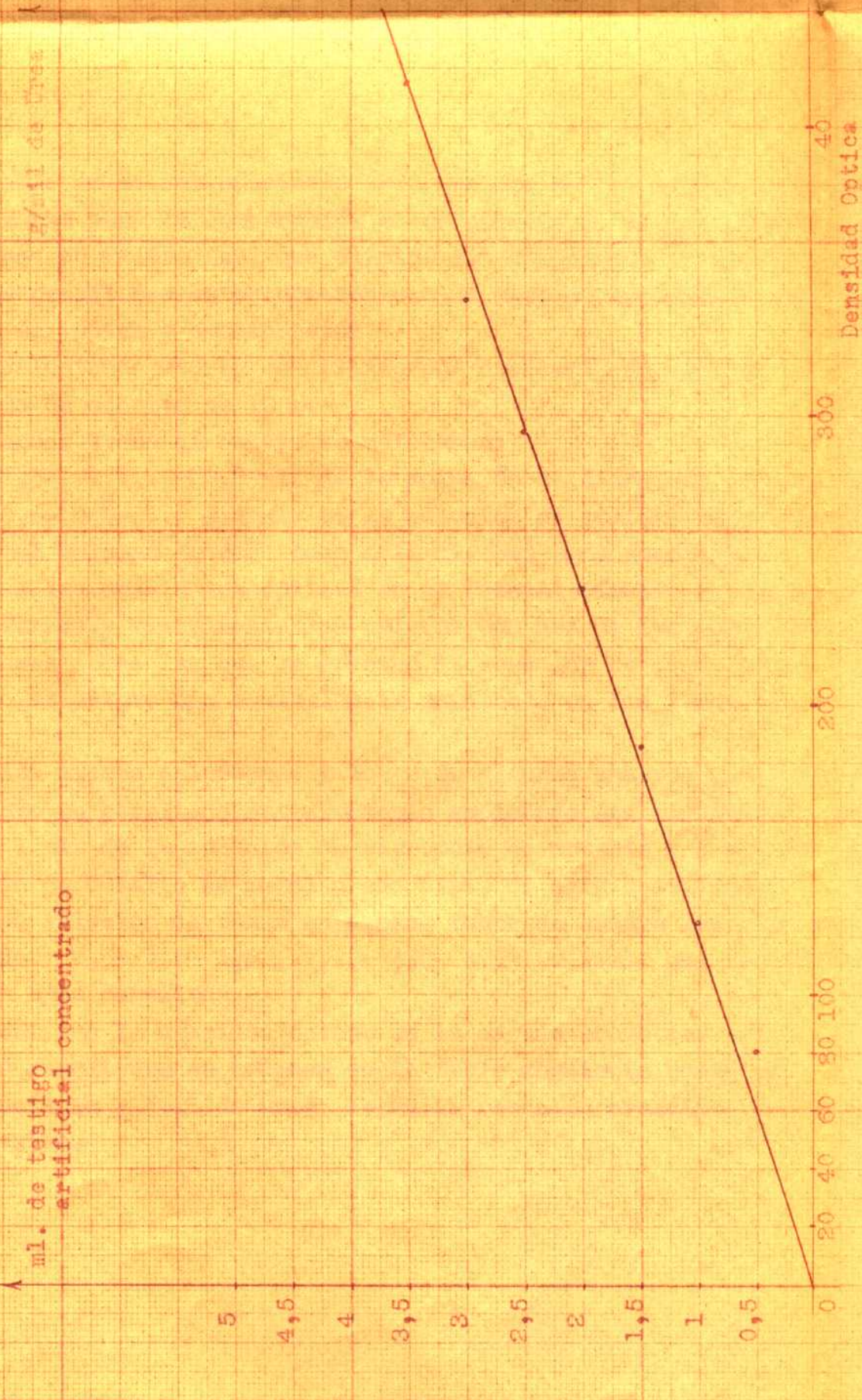
Los valores obtenidos se ordenan en la tabla adjunta:

Tubo No.	Ml. de dicromato de potasio al 1 %.	Densidad óptica	Equivalencia g/mil de urea.
1	0,1	87	0,011
2	0,2	174	0,022
3	0,3	252	0,032
4	0,4	324	0,041
5	0,5	385	0,048
6	0,6	405	0,055
7	0,7	490	0,061
8	0,8	560	0,070
9	0,9	605	0,075
10	1,0	660	0,082

A partir de una densidad óptica superior a 350 la solución de dicromato de potasio no sigue la ley de Lambert y Beer. Hasta ese valor de densidad óptica es posible utilizar la escala de dicromato como testigo estable para el fotocolorímetro, obteniendo como lo hemos hecho nosotros la equivalencia de esas soluciones por medio de una curva de calibración preparada con soluciones testigo de urea de concentración variable.-

El tono de color obtenido con el dicromato difiere un poco del que presenta la reacción cromática de la diacetilmonoxima: aquel es mas amarillento, mientras que ésta última presenta leve tonalidad ana-

CALIBRACION DEL TESTIGO ARTIFICIAL



ranjada.-

Por ello no es satisfactorio para la comparación visual, pero puede utilizarse para la comparación colorimétrica si el colorímetro empleado posee un filtro azul que elimina esa diferencia de tonalidad.

Buenos resultados se obtuvieron con un testigo artificial preparado como se indica a continuación:

Como soluciones madres se utilizaron: dicromato de potasio al 1 % y sulfato de cobalto al 10 %.-

En sendos tubos de ensayo se colocaron:

0,1 - 0,2- 0,3-- 0,8 ml. de la solución de dicromato de potasio y 0,3- 0,6- 0,9-..... 2,4 ml. de la solución de sulfato de cobalto, completando el volumen de cada tubo a 10 ml. con agua destilada.-

Leídas las densidades ópticas en el fotocolorímetro y comparados colorimétrica y visualmente los colores con los de las soluciones testigo de urea sobre las que se efectuó la reacción de la diacetilmonoxima, no se obtuvo una equivalencia aceptable en los tonos de color.-

Con las mismas soluciones y luego de algunos ensayos preliminares, se obtuvo un resultado satisfactorio empleando las siguientes cantidades: 1 ml. de la solución de dicromato de potasio y 2 ml. de la de sulfato de cobalto se mezclan con 8 ml. de agua destilada.-

De esa solución se toman en sendos tubos de ensayo las siguientes cantidades: 0,5- 1,0- 1,5- 4,0- 4,5-.....ml. que se llevan a 10 ml. con agua destilada.-

Se obtiene la densidad óptica de la escala cromática así preparada; esos resultados se ordenan en la tabla siguiente junto con la equivalencia en g./ml de urea según la reacción cromática de la diacetilmonoxima.-

Tubo No.	ml. de solución testigo artificial concentrado.	Densidad óptica	Equival. en g/mil de urea.
1	0,5	80	0,010
2	1,0	125	0,015
3	1,5	185	0,025
4	2,0	240	0,030
5	2,5	295	0,035
6	3,0	340	0,040
7	3,5	415	0,050
8	4,0	465	0,055

Los tonos de color obtenidos con esta escala artificial se pueden comparar a simple vista por transparencia con los colores producidos en las reacciones cromáticas practicadas con soluciones de urea o filtrados de líquidos biológicos exentos de proteínas.-

La comparación es sencilla y la tonalidad es muy semejante a la que produce la diacetilmonóxima, por lo que consideramos los resultados obtenidos como satisfactorios.-

PREPARACION DE DIACETILMONOXIMA

Ante la imposibilidad de conseguir este reactivo en el comercio, procedimos a su preparación y purificación de acuerdo a la técnica siguiente.-

Sustancias necesarias:

- 85 ml. de butanona (metiletilcetona) desecada.-
- 3 ml. de HCl concentrado.-
- 100 ml. de nitrito de amilo.-
- 80 g. de Na.OH al 33 %.-
- Eter etílico.
- Acido sulfúrico.-

Procedimiento:

La metiletilcetona se mezcla con 3 ml. de ácido clorhídrico concentrado y se calienta suavemente a 40 grados, agitando la mezcla mecánicamente.-

Sin dejar de agitar, se agrega el nitrito de amilo poco a poco, manteniendo la temperatura entre 40 y 50 grados. La adición no debe durar menos de dos horas. Como la reacción es exotérmica, hay que enfriar exteriormente con agua y hielo.-

Terminada la adición, se quita la refrigeración exterior y se continúa agitando durante media hora más. El líquido está formado por una solución en alcohol amílico de la diacetilmonoxima, con algo de nitrito de amilo y de butanona inalterados.-

Se agregan 80 g. de hielo y 80 g. de Na.OH al 33 % y se continúa agitando durante media hora más. El color amarillo claro de la solución se hace pardo rojizo al agregar la solución de Na.OH. Se pasa a un embudo de decantación y se separa la capa superior, de alcohol amílico, de la solución acuosa. Para eliminar completamente el alcohol amílico, se extrae dos veces con éter.-

La capa acuosa que queda contiene en disolución la sal sódica de la diacetilmonoxima.-

Para aislar la monoxima, esa solución acuosa de su sal de sodio se acidula con ácido sulfúrico diluido, introduciendo hielo al mismo tiempo para evitar que la temperatura ascienda y llegue a 10 grados. Si se calentase más la isonitrosocetona se separaría en forma

oleosa, dificultando mucho su purificación ulterior.-

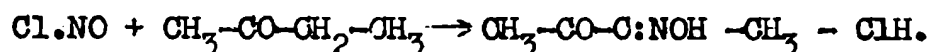
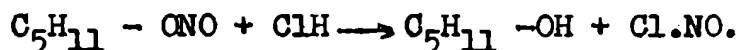
La papilla cristalina resultante, de color amarillo sucio, formada por diacetilmonoxima y sulfato de sodio, se filtra con vacío, se lava con poca agua fría y se funde en b.m., dejándola solidificar en reposo.-

Al enfriarse, se separa la monoxima en forma de una torta cristalina de color verde claro que sobrenada en las aguas madres en las que cristaliza el sulfato de sodio.-

De las aguas madres se puede extraer algo mas de monoxima con éter. La monoxima así obtenida se recristaliza en agua para obtenerla con el grado de pureza deseado.-

Así obtenida, la diacetilmonoxima se presenta en forma de escamas de p.f. 74-75 grados. Es muy soluble en alcohol, éter y cloroformo. Poco soluble en agua.-

La reacción correspondiente a la preparación de la diacetilmonoxima es la siguiente:



BIBLIOGRAFIA.-

GIRAL -ROJAHN. Productos químicos y farmacéuticos. 369,1(1946).
Ed. Atlante, México.-

REACCION COLORIMETRICA DE LA UREA CON EL FURFURAL
Y SUS DERIVADOS

REACCIONES COLORIMÉTRICAS DE LA UREA CON FURFURAL Y DERIVADOS

Utilizamos para los ensayos efectuados una solución de urea al 10 %.

Como reactivos empleamos furfural recientemente destilado, acetato de furfural, furfural cetona, alcohol furfurílico y hidrofuramida.-

Enumeramos a continuación las condiciones en que se efectuaron y los resultados obtenidos con cada una de las reacciones.-

Reacción con furfural en solución acuosa.- (1) (2).-

En sendos tubos de ensayo se colocan 0,1- 0,5 y 1,0 ml. de solución de urea al 10 % . Se agrega luego 0,1 ml. de furfural acuoso 1:10 y 0,1 ml. de ácido clorhídrico concentrado. Observada a distintos intervalos de tiempo, el ensayo no acusa desarrollo de color.

Reacción con furfural en solución acetónica.- (3) (4).-

En sendos tubos de ensayo se colocan 0,1- 0,5 y 1,0 de solución de urea al 10 %. Se completa cada tubo al volumen de 1 ml. y se le agrega 1 ml. del siguiente reactivo: furfural recientemente destilado 0,5 ml. acetona 2 ml., agua destilada 2 ml. HCl concentrado 1 ml.

Al agregar el reactivo no se produce coloración. Luego de 2 minutos comienza a desarrollarse un tono rosado de distinta intensidad según la concentración de urea.-

Reacción con acetato de furfural. (5).-

El reactivo tiene la siguiente composición:

Acetato de furfural ($C_4H_3O.CH(CH_3-CO.O)_2$) 0,5 g.

Acetona 2 ml.

Agua destilada 2 ml.

Acido clorhídrico concentrado: 1 ml.

El ensayo se efectúa como en el caso anterior y los resultados son análogos. Al cabo de media hora, esta reacción y la anterior alcanzan un tono rojo que con el tiempo vira al violáceo, produciéndose al cabo de unas horas una coloración violeta intensa y un precipitado negrozco.-

negruzco.-

Otros compuestos.-

En las mismas condiciones de la experiencia anterior, no se produce coloración con furfuralcetona ($C_4H_3O.H:CH-CO-CH_3$).

En la furfural cetona, la función aldehído se encuentra bloqueada por su condensación con acetona. De la falta de reacción cromática se puede deducir que la función aldehído del furfural es la que se condensa con la urea para dar un producto cromático.-

No se produce reacción cromática utilizando alcohol furfurílico y hidrofuramida en las mismas condiciones de las experiencias anteriores.-

De todas las sustancias ensayadas con resultado positivo, el diacetato de furfural es la que presenta las ventajas mayores en cuanto a comodidad de aplicación.-

El furfural, que también da la reacción cromática, tiene el inconveniente de exigir una destilación previa para tenerlo libre de productos de oxidación que lo impurifican a través del tiempo.-

El diacetato de furfural, de fácil preparación, es un producto cristalino que se conserva inalterable y que al emplearse en la reacción, libera, por la reacción ácida del medio en que se realiza la técnica, el furfural como resultado de su hidrólisis.-

BIBLIOGRAFIA.-

- 1.- SCHIFF H. A reaction for urea. Ber. 10, 773-776 (1877)
- 2.- WERNER E.A. The chemistry of urea. Monografías de bioquímica. Longsman Green Co. (1923).
- 3.- GANASSINI D. Chem., Zentr. 11, 473 (1919)
- 4.- GANASSINI D. Boll. Chim. Farm. 59, 3 (1920)
- 5.- MORERA V. Comunicación personal.-

DETERMINACION COLORIMETRICA DE LA UREA
POR MEDIO DEL FURFURAL

Reactivo:

Furfural 2 ml.
Acetona 10 ml.
HCl concentrado 5 ml.

Procedimiento:

De una solución de urea al 4 por mil se colocan en sendos tubos de ensayo: 0,1- 0,2- 0,3-..... y 1,0 ml.

A cada tubo se agrega 1 ml. del reactivo, llevando previamente el volumen contenido en el mismo a 1 ml. con agua destilada.-

Se colocan los tubos en un b.m. a 37 grados durante media hora. Se desarrolla una coloración rojiza que se lee en el fotocolorímetro empleando el filtro verde de 500 milimicrones, diluyendo previamente el contenido de los tubos a 10 ml. con agua destilada y ajustando a cero el aparato con un blanco formado por agua destilada y el reactivo, sujetos al mismo proceso.-

Los resultados obtenidos se detallan en el cuadro de valores siguiente.-

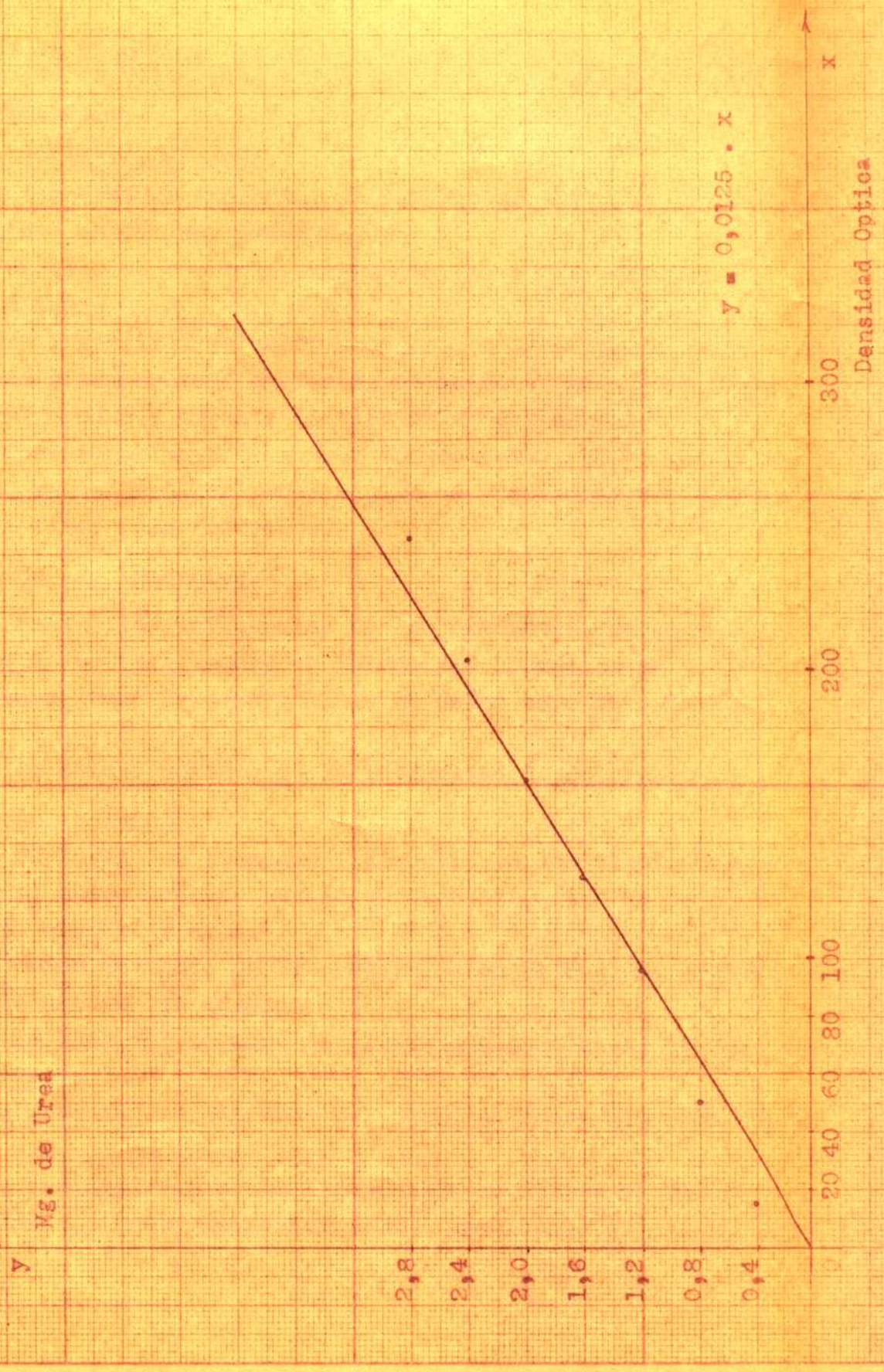
Tubo No.	ml. solución urea 4 g/mil.	mg. de urea.	Densidad óptica
1	0,1	0,4	15
2	0,2	0,8	50
3	0,3	1,2	95
4	0,4	1,6	128
5	0,5	2,0	160
6	0,6	2,4	204
7	0,7	2,8	245

Influencia del tiempo.-

A la temperatura ambiente, el color comienza a desarrollarse a la media hora del agregado del reactivo, haciéndose primero notable a simple vista en los tubos de mayor concentración de urea.-

Al cabo de una hora se alcanza una intensidad de color apre-

PROPORCIONALIDAD ENTRE LA DENSIDAD OPTICA Y LA
CONCENTRACION EN LA REACCION ENTRE UREA Y FURFURAL



ciable en toda la escala de concentraciones. Entre las 3 y 5 horas, el tono rojizo es suficientemente intenso como para efectuar las lecturas colorimétricas.

Influencia de la temperatura.-

A temperatura ambiente, el desarrollo del color es muy lento para los fines analíticos prácticos.-

Por ello se recurrió al auxilio del calor para acelerar la reacción cromática.-

Una intensidad de color semejante a la obtenida por una espera de 3 horas a temperatura ambiente, se puede obtener calentando por media hora a 37 grados y durante 15 minutos a 56 grados.-

Temperaturas mayores no son convenientes, pues llegando a la ebullición, se desarrollan tonos violáceos y precipitados negros no aptos para los fines colorimétricos.-

Influencia de los oxidantes.-

Se ensayó las influencias de los oxidantes, en particular del persulfato de potasio, sobre la intensidad cromática de la reacción, haciéndolo actuar luego de desarrollado el color como se indicó anteriormente.-

No se obtuvo aumento de la intensidad de coloración.-

Influencia del solvente.

El furfural fué ensayado disuelto en los siguientes solventes: acetona, ácido acético, anhídrido acético, éter de petróleo, éter sulfúrico, alcohol y agua.-

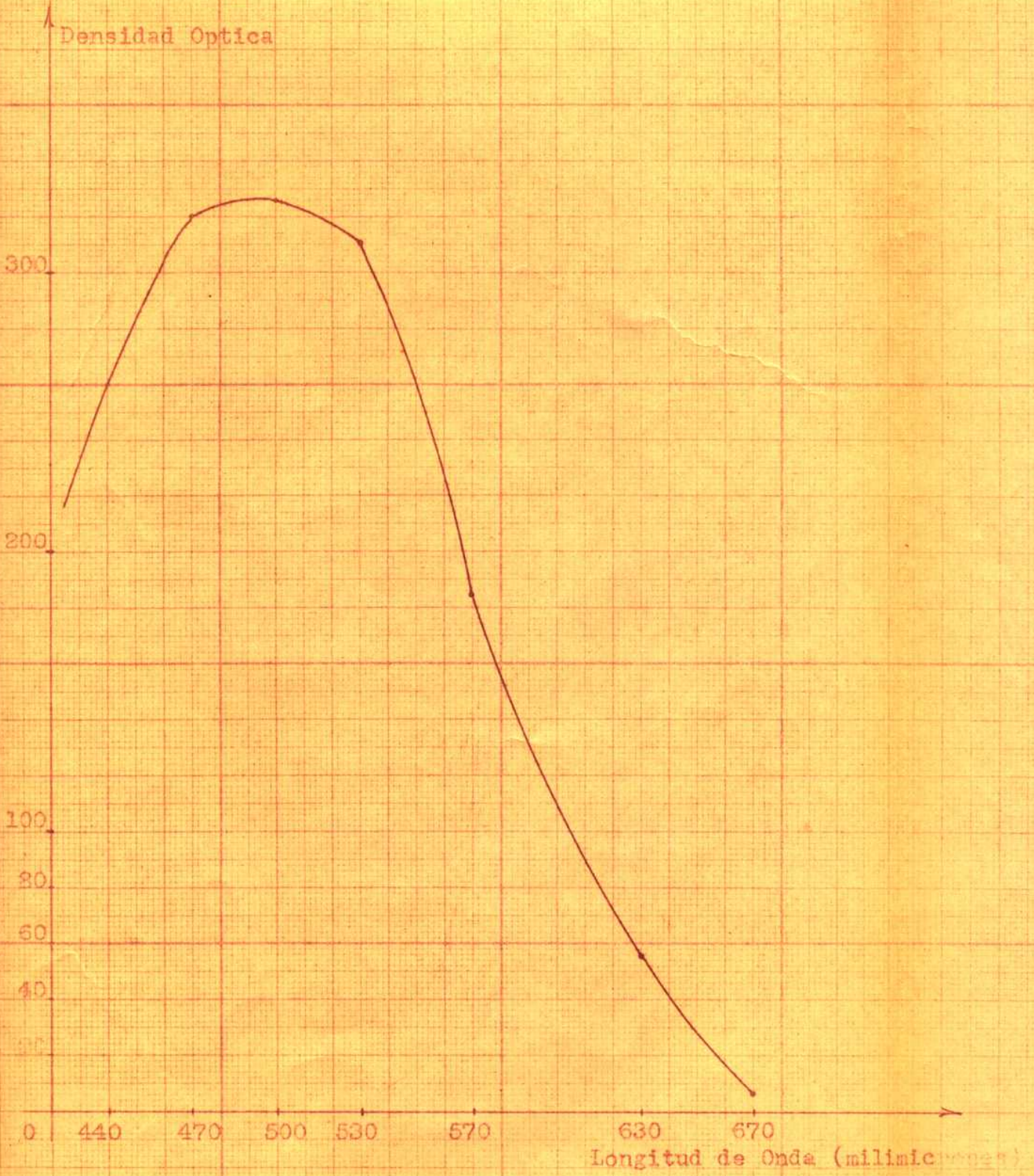
El único solvente de los ensayados en el cual se produce la reacción con la urea es la acetona.-

Influencia de la longitud de onda de la luz empleada en la lectura espectrofotométrica.-

Se practicó la reacción del furfural sobre una solución de urea al 4 por mil, de la que se empleó 1 ml.

La densidad óptica de la reacción cromática se midió a distintas longitudes de onda, obteniéndose los resultados que se indican a continuación:

INFLUENCIA DE LA LONGITUD DE ONDA EN LA DENSIDAD OPTICA DE LA REACCION ENTRE URSA Y FURFURAL



PROPORCIONALIDAD ENTRE LA DENSIDAD OPTICA Y LA CONCENTRACION
EN LA REACCION ENTRE UREA Y ACETATO DE PURPURA



Longitud de onda milimicrones.	Densidad óptica
440	260
470	320
500	325
530	310
570	185
630	35
670	5

Para efectuar estas medidas se empleó el mismo espectrofotómetro Erma que se utilizó en el caso de la diacetilmonoxima. De lo expuesto se concluye que la longitud de onda aconsejable es la de 500 milimicrones.

-----o-----

DETERMINACION COLORIMETRICA DE LA UREA
POR MEDIO DEL DIACETATO DE FURFURAL

Reactivo:

El reactivo tiene la siguiente composición:

Solución a : diacetato de furfural al 10 % en acetona.

Solución b : ácido clorhídrico concentrado.-

En el momento de usarse, se mezclan las soluciones a y b en la proporción de 2: 1, con lo que se tiene preparado el reactivo.-

Procedimiento:

En sendos tubos de ensayo se colocan: 0,1 - 0,2- 0,3-.....
y 0,7 ml. de una solución de urea al 4 por mil. El volumen de cada tubo se lleva a 1 ml. con agua destilada.-

Se agrega a todos ellos y a un blanco de 1 ml. de agua destilada, 1 ml. de reactivo.-

Se llevan los tubos a un b. m. a 56 grados durante 15 minutos. Retirados de allí los tubos, se completa a 10 ml. con agua destilada el volumen de cada uno de ellos y se lee la densidad óptica en el espectrofotómetro, ajustando a cero el aparato con el blanco y usando luz de 500 milimicrones de longitud de onda.-

Los resultados obtenidos se exponen en el cuadro siguiente:

Tubo No.	ml. de solución urea 4 g/ml.	mg. de urea.	Densidad óptica
1	0,1	0,4	35
2	0,2	0,8	75
3	0,3	1,2	115
4	0,4	1,6	150
5	0,5	2,0	200
6	0,6	2,4	255
7	0,7	2,8	305

Todas las conclusiones obtenidas en el caso de la técnica del furfural son aplicables a la del diacetato de furfural, pues en última instancia actúa en la reacción el furfural liberado por la hidrólisis de este compuesto en medio ácido.-

Sensibilidad del método.-

La reacción no se produce cuando en 1 ml. de solución en ensayo hay menos de 0,4 mg. de urea.-

Esta sensibilidad es suficiente para permitir su aplicación al dosaje de urea en orina.-

La reacción no se produce con creatinina, ácido úrico, derivados amoniacales, uretano, glutamina, asparagina, ácido glutámico, glutatión, glicocola, tirosina triptofano, cistina y alantofina.

La bilirrubina produce color rojo violáceo, pero como se elimina al desproteinizar los líquidos biológicos, su interferencia carece de importancia.-

Conclusiones.-

De lo expuesto en los capítulos anteriores se concluye que, aunque existe proporcionalidad entre la concentración de urea y la densidad óptica de la reacción cromática, el método no es aplicable a desproteinizados de sangre debido a que la concentración de urea en ellos es inferior a la sensibilidad del método.-

La ausencia de interferencias por parte de los otros componentes de los medios biológicos hace que el método se pueda aplicar a otros

líquidos orgánicos donde la urea se encuentre en mayor concentración.

En este caso se encuentra la orina, a la que es posible aplicar este método rápido de dosaje de urea, efectuando una dilución conveniente de la misma para ubicarse dentro del límite de concentración adecuada.

-----o-----

PREPARACION DEL DIACETATO DE FURFURAL

4 moles (384 g.) de furfural recientemente destilado y enfriado a 0 grado, se agregan a 4,2 moles (428 g.) de anhídrido acético, contenidos en un matraz de dos litros y se enfría a - 5 grados.-

Se agrega 1 g. de $\text{Cl}_2\text{Sn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ disuelto en anhídrido acético. La adición del furfural se efectúa tan rápidamente como es posible y la temperatura no debe pasar de - 3 grados.-

Luego de dejar la mezcla en reposo durante 24 horas, se vuelca en una solución de carbonato de sodio y se agrega hielo hasta que la coagulación del aceite sea completa.-

Luego de unos minutos, la mezcla se filtra por succión. Luego de secar el producto cristalino durante la noche en un desecador a vacío sobre ácido sulfúrico, se recristaliza disolviéndolo en éter de petróleo, del que cristaliza bajo la forma de agujas incoloras.-

El producto así obtenido es soluble en ácido acético, acetona anhídrido acético, alcohol, y poco en agua.-

El punto de fusión es 52-53 grados.-

La técnica detallada en los párrafos anteriores fué utilizada para preparar el diacetato de furfural que utilizamos en las experiencias realizadas.-

BIBLIOGRAFIA.-

GILMAN Y WRIGHT. Iowa State Journal of Science. 30 (1929).

METODO DEL DIACETATO DE FURFURAL
APLICADO A LA VALORACION DE UREA EN ORINA

Reactivos:-

Solución de diacetato de furfural al 10 % en acetona.-

Acido clorhídrico concentrado.

Acetona.

Solución testigo concentrada: contiene 20 g/mil de urea en agua destilada. A partir de ella se prepara la solución testigo diluida llevando a 10 ml. con agua destilada 1 ml. de la solución testigo concentrada.-

Procedimiento.-

Diluir 1 ml. de orina a 10 ml. con agua destilada. Colocar en sendos tubos de ensayo 1 ml. de la dilución de orina (tubo D), 1 ml. de solución testigo diluida (tubo T) y 1 ml. de agua destilada (tubo B).

A cada tubo agregar 2 ml. de solución de diacetato de furfural al 10 % en acetona y 1 ml. de ácido clorhídrico concentrado.-

En otro tubo de ensayo (BO) colocar 1 ml. de la dilución de orina, 2 ml. de acetona y 1 ml. de ácido clorhídrico concentrado.-

Colocar todos los tubos en un baño maría a 56°. durante 15 minutos.-

Retirar luego de ese lapso los tubos del baño y diluir el contenido de cada uno de ellos a 10 ml. con agua destilada.-

Leer la densidad óptica de la reacción cromática en un espectrofotómetro con luz de 500 milimicrones de longitud de onda, ajustando a cero el aparato con el blanco (tubo B) y restando para los cálculos la densidad óptica del tubo BO a la de la solución incógnita (tubo D).

Cálculo.-

$$\text{Concentración de urea en g/mil} = \frac{\text{Ct. Li}}{\text{Lt.}}$$

donde:

Ct. concentración del testigo: 20 g/mil

Li. lectura del desconocido = lectura tubo D- lectura tubo BO.

Lt. lectura del testigo.

Por lo tanto:

$$\text{Concentración de urea en g/mil} = \frac{20. (L_D - L_{BO})}{L_t.}$$

-----o-----

DOSAJE DE UREA EN ORINA POR EL METODO DEL DIACETATO DE FURFURAL
COMPARANDOLO CON EL DE LA DIACETILMONOXIMA

Caso No.	Método de la diacetilmonoxima Urea en g/mil.
1	18,40
2	9,75
3	21,33
4	27,90
5	15,42
6	32,66
7	16,31
8	25,70
9	12,43
10	13,78

Caso No.	Método del diacetato de furfural Urea en g/mil.
1	19,38
2	8,97
3	20,76
4	28,35
5	16,07
6	31,12
7	15,89
8	24,65
9	13,07
10	13,55

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

- 1).- Se efectuó un estudio bibliográfico y recopilación de las técnicas para determinación colorimétrica directa de urea.-
- 2).- De los métodos estudiados se seleccionó el que emplea como reactivo la diacetilmonoxima, por presentar una aplicación práctica directa debido a su sencillez y exactitud.-
- 3).- A la técnica elegida se le introdujeron modificaciones en cuanto a la composición de las soluciones testigo y reactivos y al proceso analítico basadas en el estudio práctico realizado a los efectos de adaptarla al dosaje de urea en sangre y orina.-
 Los resultados obtenidos mediante las modificaciones tendientes a aumentar la sencillez y exactitud del método fueron satisfactorios.- Puede decirse que la técnica analítica propuesta reúne las condiciones necesarias, como lo demuestra el estudio estadístico efectuado, para ser considerada en igualdad de condiciones con otras aceptadas unánimemente por su exactitud, pero de ejecución mas laboriosa.-
- 4).- Se realizó un estudio estadístico de los resultados analíticos obtenidos con la técnica propuesta y con la de la ureasa. Se llega así a la conclusión que las diferencias observadas en los valores numéricos carecen de significación estadística.-
- 5).- Se efectuó el estudio de otro método de valoración colorimétrica de la urea basado en la reacción entre ésta y el furfural o sus derivados (en particular el acetato de furfural), proponiéndose una técnica para dosaje de urea en orina.-

[Handwritten signature]

-----=0=-----

[Handwritten signature]