

**- UNIVERSIDAD IBEROAMERICANA -**

*Incorporada a la U. N. A. M.*

FACULTAD DE QUIMICA BERZELIUS

**"MODIFICACION A LA TECNICA DE BROWN PARA LA DETERMINACION  
DE UREA EN SANGRE"**

TESIS PARA OPTAR EL TITULO DE QUIMICO  
FARMACUTICO BIOLÓGICO

MARINA DELGADO SANTOS



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD IBEROAMERICANA

Incorporada a la U. N. A. M.

FACULTAD DE QUIMICA BERZELIUS

" MODIFICACION A LA TECNICA DE BROWN PARA LA DETERMINACION  
DE UREA EN SANGRE "

Tesis para optar el título de Químico  
Farmacéutico Biólogo.

MARINA DELGADO SANTOS.

MEXICO, D.F. 1960

A LA MEMORIA DE MI QUERIDO PADRE

A MI MADRE CON GRATITUD Y CARINO

A mis hermanos.

Al Sr. Químico D. LUIS M. VERA, Director de la  
Facultad de Química Berzelius con esti-  
mación y respeto, por su ayuda -  
moral para ver culminados  
mis esfuerzos.

A la Srta. AURELIA RIVAS  
A mis maestros quienes me han  
ayudado con su enseñanza y  
consejos.

Agradezco sinceramente la ayuda de el  
DR. ALEJANDRO ELIZONDO LOPEZ LLERA

Y

El Sr. Q.B.P. JOSE RUIZ HEJERERA -  
a quien debo la dirección de este traba-  
jo y a el Laboratorio Clínico de -  
la Central Quirúrgica donde se  
realizó el mismo.

Y en especial por su ayuda al  
Sr. Q.B.P. EVERARDO VILLALOBOS

" MODIFICACION A LA TECNICA DE BROWN PARA LA DETERMINACION  
DE UREA EN SANGRE "

- I.- Introducción.
- II.- Material y Métodos.
- III.- Resultados.
- IV.- Discusión.
- V.- Resumen.
- VI.- Bibliografía.

Sangre Humana.

Clorímetro Klett Summerson.

Espectrofotómetro Bausch and Lomb.

Espectronic 20

Paradimetil amino benzaldehido. (PDAB)

PDAB - Eastman.

Solución disódica del ácido Etilen.

dinitro tetracético - Eastman.

Citrato de Sodio - Baker and Adams

Sulfato de Zinc - Mallinckrodt.

Acido sulfúrico - Addler.

Hidroxido de sodio - Baker S Adams

Agua destilada.

CAPITULO I.

INTRODUCCION

Seyler's Zeitscher ( 1952 ), descubrió al paradimetil amino benzaldehído como revelador de urea en crómatografía en papel.

Posteriormente Watt y Chrisp ( 1954 ), desarrollaron un método colorimétrico para la determinación de urea en presencia de amonio utilizando este mismo reactivo. Brown ( 1959 ), adoptó esta técnica de la determinación de urea en sangre, haciendo diversas modificaciones a la técnica original y estudiando la influencia de diversos factores sobre el desarrollo del compuesto colorido.

En las técnicas más usadas en la rutina clínica nos encontramos con diversas dificultades.

Karr ( 1924 ), determina el nitrógeno uréico por medio de la reacción con ureasa; el espécimen así tratado se nessleriza y se compara la lectura en el colorímetro, con la lectura de una solución patrón. La principal dificultad de éste método, está en el reactivo de nessler, cuya preparación es engorrosa y difícil de controlar; aún la preparación de la ureasa y su mantenimiento en estado activo, presenta estas dificultades.

El método de Van Slyke y Cullen ( 1916 ), modificado para la determinación de urea en sangre, precisa de mucha práctica en la apreciación del vire del indicador en el punto final de la reacción.

El método manométrico de Van Slyke ( 1927 - 1933 ), requiere un equipo manométrico demasiado grande y difícil de trabajar cuando

do se tienen varias muestras, aparte de esto una serie de correcciones a los volúmenes que hacen más tardada la dosificación

Koch y Mcmeekin ( 1924 ), usan el reactivo de nessler aunque para llegar a la solución que debe tratarse con él, no usa la ureasa, sino una mezcla oxidante que lleva el nitrógeno hasta amoníaco.

Considerando la importancia clínica que reviste la determinación de urea como control rutinario del metabolismo protéico y el funcionamiento renal; y considerando la deficiencia de los métodos existentes, se decidió hacer un estudio de la técnica de Brown con objeto de ofrecer una solución a la búsqueda de un método sencillo, rápido reproducible para la determinación de urea en sangre.

**CAPITULO II.**

**MATERIAL Y METODOS**

**MATERIAL: -**

Las sangres se obtuvieron de personas sanas y enfermas que acudieron a consulta externa al laboratorio clínico de la Central Quirúrgica.

Como el presente trabajo fué un estudio comparativo entre la técnica de Karr, la más común en los laboratorios clínicos, y la técnica de Brown, se describen ambas.

Técnica de Brown ( Original ).

Reactivos:- Todos los reactivos son grado analítico a menos que se indique otra cosa.

a).- Solución alcohólica reguladora: Se disolvieron 10 grm. de acetato de sodio trihidratado y un gramo de la solución disódica del ácido estileno dinitro tetraacetico (EDTA) en solución de agua, se añaden 30 ml. de etanol al 95% y se afora a 100 ml.

b).- Solución de ureasa.- Se añadieron 0.5 grm. de harina de Jach Bean Meal a 20 ml. de solución buffer alcohólica.

c).- Sulfato de Zinc al 10%.- 50 grm. de sulfato de zinc heptahidratado se disuelven en agua destilada y se afora a 500 ml.

d).- Hidroxido de sodio 0.5 N.- Se prepararon 1000 ml. de hidroxido de sodio, pesando 10 grm. del reactivo y aforado a un litro con agua destilada.

Esta solución fué valorada diluyendo alícuotas de 10 ml. de solución de sulfato de zinc, con 40 ml. de agua destilada y valo

rando con la solución de hidróxido de sodio, utilizando fenolftaleína como indicador de tal manera que se gastaron 10 más o menos 0.5 ml.

En caso necesario la solución de hidróxido de sodio se diluyó o concentró hasta lograr dicho objetivo.

e).- Solución de paradimetil amino benzaldehído ( PDAB ). - Se disolvieron 5 grm. de PDAB ( Eastman No. 95 ), en alcohol - de 95 % y diluyendo a 100 ml.

A 50 ml. de esta solución se agrega cuidadosamente y enfriando en el baño del agua 5 ml. de ácido sulfúrico concentrado, - en un matraz de 100 ml., aforando a 100 ml. con dicha solución de PDAB, dándonos una solución de color amarillo que es estable por algunas semanas a la temperatura ambiente y a la luz.

f).- Plasma sanguíneo.

Técnica: -

Desproteinización.- En un matraz Erlenmeyer de 25 ml. se pipetea 7 ml. de agua y uno de plasma, agregando 1 ml. de hidróxido de sodio, mezclar perfectamente y agregar por último uno - ml. de sulfato de zinc; se agita con movimiento suave y se filtra por papel. Pasa un líquido transparente y límpido.

Plasma libre de urea:- Se agregan aproximadamente 5 ml. de - plasma con concentraciones normales de urea y libre de sulfas, - 3 ó 4 gotas de solución de ureasa; se tapa y se deja reposar -- por toda la noche.

Desproteínizar en igual forma el filtrado nos servirá como blanco.

1.- En dos tubos de ensayo, poner en uno 2 ml. del filtrado del plasma tratado con ureasa ( blanco ), y en el otro, 2 ml. del filtrado del plasma problema.

2.- A cada uno de los tubos agregar 2 ml. de solución de PDAB.

3.- Reposar 10 min. y leer en el colorímetro a 440 m $\mu$  llevando a 100 por % de transmisión con el blanco.

4.- Determinar la densidad óptica del problema y determinar la concentración de nitrógeno uréico por interpolación en la curva de calibración del aparato.

Observaciones: -

Trabajando conforme la técnica original, observamos que en la preparación de trabajo de PDAB, la solución presentaba un color amarillo, que al agregarse al filtrado se intensificaba de tal manera que era imposible hacer lecturas al colorímetro; incluso el reactivo agregado al blanco no nos permitía llevar a transmitancia a 100 por %.

Nosotros observamos además en la preparación de la solución de trabajo, que al agregar ácido sulfúrico incrementaba el color amarillo de la solución alcohólica de PDAB; entonces decidimos modificar esta parte de la técnica en la siguiente forma:

Agregar una solución alcohólica de PDAB, reposando determina-

Desproteínizar en igual forma; el filtrado nos servirá como blanco.

1.- En dos tubos de ensayo, poner en uno 2 ml. del filtrado del plasma tratado con ureasa ( blanco ), y en el otro, 2 ml. del filtrado del plasma problema.

2.- A cada uno de los tubos agregar 2 ml. de solución de PDAB.

3.- Reposar 10 min. y leer en el colorímetro a 440 m $\mu$  llevando a 100 por % de transmisión con el blanco.

4.- Determinar la densidad óptica del problema y determinar la concentración de nitrógeno uréico por interpolación en la curva de calibración del aparato.

Observaciones: -

Trabajando conforme la técnica original, observamos que en la preparación de trabajo de PDAB, la solución presentaba un color amarillo, que al agregarse al filtrado se intensificaba de tal manera que era imposible hacer lecturas al colorímetro; incluso el reactivo agregado al blanco no nos permitía llevar a transmitancia a 100 por %.

Nosotros observamos además en la preparación de la solución de trabajo, que al agregar ácido sulfúrico incrementaba el color amarillo de la solución alcohólica de PDAB; entonces decidimos modificar esta parte de la técnica en la siguiente forma:

Agregar una solución alcohólica de PDAB, reposando determina-

do tiempo para que haya reacción entre la urea y el PDAB, y añadir posteriormente el ácido sulfúrico para desarrollar el color.

Esta variante nos indujo a probar diferentes concentraciones de PDAB, determinado para cada concentración su espectro de absorción a diferentes longitudes de onda entre 425 y 480  $\mu$ , y escoger así la concentración optima para un máximo desarrollo de color y la longitud de onda a la cual encontramos un máximo de absorción.

Así pues, se prepararon soluciones alcoholicas de PDAB al 1, 2,3, y 5 por  $\%$  se trabajó en la siguiente forma:

1.- 2 ml. de solución patrón de nitrógeno; agregar 2 ml. de solución alcoholica de PDAB, y finalmente añadir 0.1 ml. de ácido sulfúrico concentrado.

2.- Hacer las lecturas a las diferentes longitudes de onda usando el blanco de agua destilada para llevar la transmisión a 100 por  $\%$ .

La cantidad de ácido sulfúrico para estas cantidades fué tal, que nos diera una normalidad aproximada a la que quedaba el ácido de la solución de PDAB de Brown ( original ) que se agregaba al filtrado.

2 ml. filtrado + 2 ml. de PDAB ( original ).

normalidad final del ácido sulfúrico; 0.91 N.

En la forma que nosotros trabajamos o sea, agregando 0.1 ml. de ácido sulfúrico concentrado para desarrollar el color, la no

do tiempo para que haya reacción entre la urea y el PDAB, y añadir posteriormente el ácido sulfúrico para desarrollar el color.

Esta variante nos indujo a probar diferentes concentraciones de PDAB, determinado para cada concentración su espectro de absorción a diferentes longitudes de onda entre 425 y 480  $\mu$ , y escoger así la concentración óptima para un máximo desarrollo de color y la longitud de onda a la cual encontramos un máximo de absorción.

Así pues, se preparon soluciones alcoholicas de PDAB al 1, 2,3, y 5 por  $\%$  se trabajó en la siguiente forma:

1.- 2 ml. de solución patrón de nitrógeno; agregar 2 ml. de solución alcohólica de PDAB, y finalmente añadir 0.1 ml. de ácido sulfúrico concentrado.

2.- Hacer las lecturas a las diferentes longitudes de onda usando el blanco de agua destilada para llevar la transmisión a 100 por  $\%$ .

La cantidad de ácido sulfúrico para estas cantidades fué tal, que nos diera una normalidad aproximada a la que quedaba el ácido de la solución de PDAB de Brown ( original ) que se agregaba al filtrado.

2 ml. filtrado + 2 ml. de PDAB ( original ).

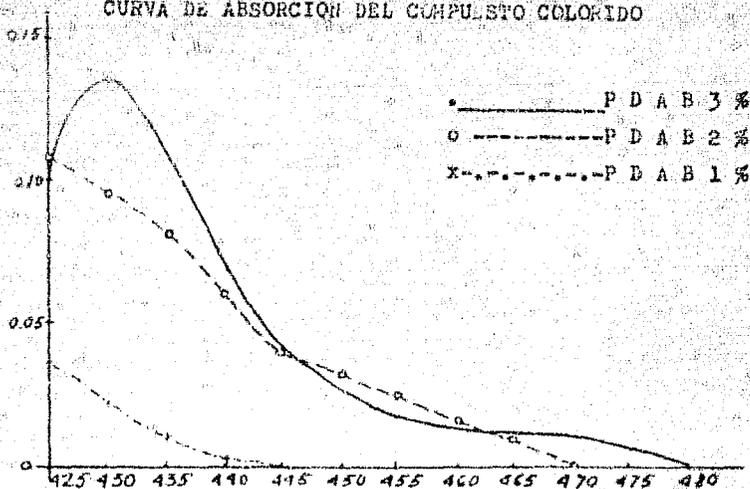
normalidad final del ácido sulfúrico; 0.91 N.

En la forma que nosotros trabajamos o sea, agregando 0.1 ml. de ácido sulfúrico concentrado para desarrollar el color, la nor

alidad final era de 0.87 N.

De ésta forma obtuvimos los espectros de absorción correspondientes a las diferentes concentraciones de PDAB usadas - -  
( Graficas 1, 2 ).

CURVA DE ABSORCION DEL COMPLEJO COLORIDO



INFLUENCIA DE LA CONC. DE PDAB.

Solución al 1 % de PDAB en ET-OH 95 %  
 usando una solución de urea de 20 mg N %  
 tratada según la técnica.

	T	D.O.
425	92	0.036
430	95	0.022
435	98	0.009
440	98.5	0.007
445	100	0.000

Solución al 2% de PDAB en ET-OH 95 %  
 usando la misma solución de urea.

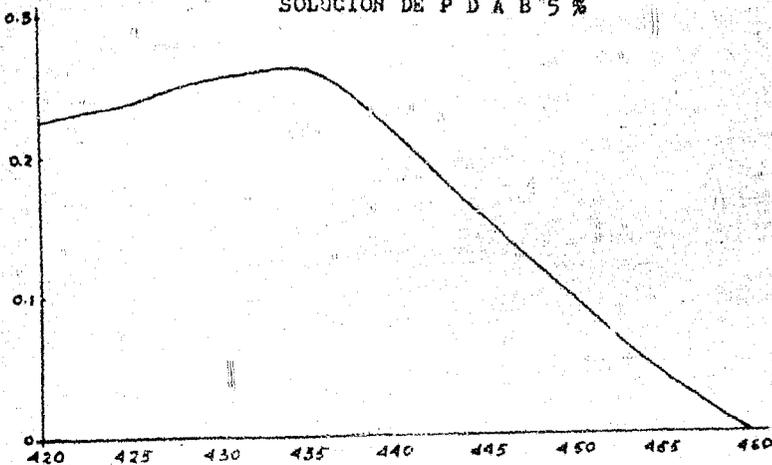
	T	D.O.
425	78	0.108
430	80	0.096
435	83	0.081
440	87	0.060
445	91	0.040
450	92	0.036
455	94	0.027
460	96	0.018
465	99	0.004
470	100	0.000

Solución al 3% de PDAB en ET-OH 95%  
 usando la misma solución de urea.

	T	D.O.
425	79	0.102
430	73	0.137
435	80	0.096
440	84	0.076
445	88	0.055
450	94	0.027
455	96	0.018
460	96.5	0.015
465	97	0.013
470	97.5	0.010
475	100	0.000

ESPECTRO DE ABSORCION DEL COMPUESTO COLORIDO

SOLUCION DE P D A B 5 %



INFLUENCIA DE LA CONC DE PDAB.

Solución al 5 % de PDAB

Usando una solución de urea de 40 mg N%

	TBI	T Prob.	D.O.BI	D.O. Prob.	Dif D.O. Prob- D.O. BI
420	5	3	1.301	1.522	0.222
425	6	3.5	1.222	1.456	0.234
430	7	4	1.155	1.398	0.243
435	9	5	1.045	1.300	0.254
440	11.5	6.5	0.939	1.187	0.248
445	12.5	9	0.903	1.045	0.142
450	15.5	13	0.810	0.886	0.076
455	22	19	0.657	0.721	0.054
460	26	26	0.584	0.584	0.000

El espectro de absorción correspondiente a la solución de PDAB de 3 %, nos muestra que es esta la concentración óptima para un desarrollo máximo de color, y que a 430 m $\mu$  esta la absorción máxima.

Incluso a este espectro y longitud de onda los que más se asemejan a los determinados por Brown en su trabajo original ( 1959 )

Nuestra curiosidad no fué poca y decidimos hacer un pequeño estudio de la influencia del ácido usado en el desarrollo del color para ver si alguno de ellos podría sustituir al ácido sulfúrico.

Así estudiamos los ácidos: Nitríco, clorhídrico, fosfórico, sulfúrico, acético y láctico.

#### INFLUENCIA DEL ACIDO USADO

##### DATOS RESUMIDOS.

ACIDOS	ml. EMPLEADOS	MAXIMA	D.O.	Ph.
HCl	0.23	430	0.284	0.5
CH <sub>3</sub> COOH	0.12	430	0.000	5.0
CH <sub>3</sub> -CHOH-COOH	0.21	430	0.000	5.0
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	0.20	430	0.097	2.0
+ HNO <sub>3</sub>	0.12	430	0.574	0.5
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.10	430	0.276	0.5

+ Diluido el sistema de HNO<sub>3</sub> 1: 4

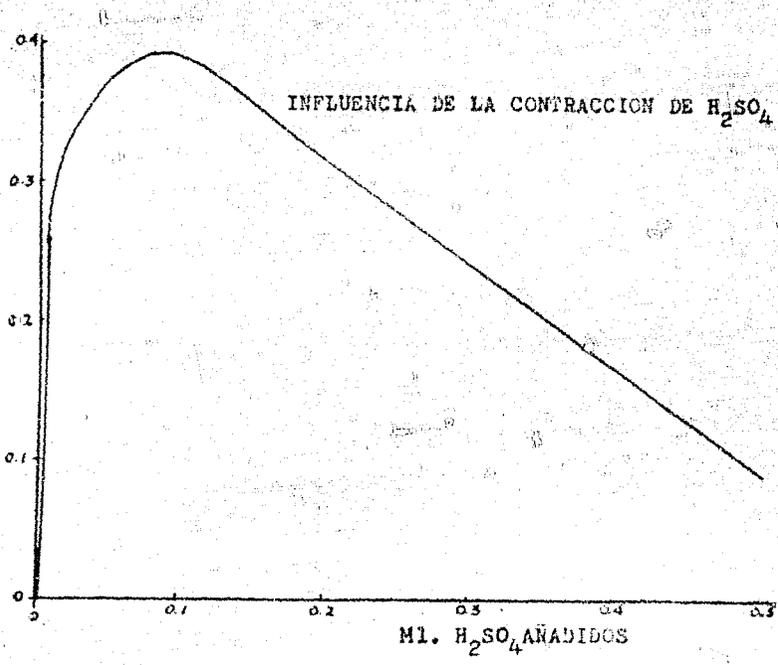
Encontramos que el ácido clorhídrico (  $\text{HCl}$  ) podría sustituir el ácido sulfúrico (  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ), de la técnica original.

Para nuestro trabajo práctico seguimos usando el ácido sulfúrico.

Como indicamos antes el ácido sulfúrico agregado nos dá una normalidad aproximada; entonces decidimos hacer un estudio de la influencia de la concentración de ácido sulfúrico para encontrar la cantidad de ácido que resultará en un desarrollo óptimo de color.

A 2 ml. de la solución patrón de nitrógeno, se agregan 2 ml. de la solución alcohólica de PSAB al 3 % y cantidades de 0.01 ml. hasta 0.5 ml. de ácido sulfúrico.

Así obtuvimos los resultados que se muestran en la grafica No. 3.



INFLUENCIA DE LA CONC. DE H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 Solución de PDAB al 3 % en ET-OH 95 %  
 Usando una solución de urea de 50 mg. %

= 430 Mu

	Cantidad de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> añadido	Conc. final	N final	T	D.O.
1.-	0.01	0.25	0.0125	79	0.103
2.-	0.02	0.50	0.0250	56	0.252
3.-	0.05	1.25	0.0625	43	0.367
4.-	0.10	2.50	0.125	41	0.376
5.-	0.20	5.00	0.250	53	0.276
6.-	0.50	12.50	0.625	82	0.087

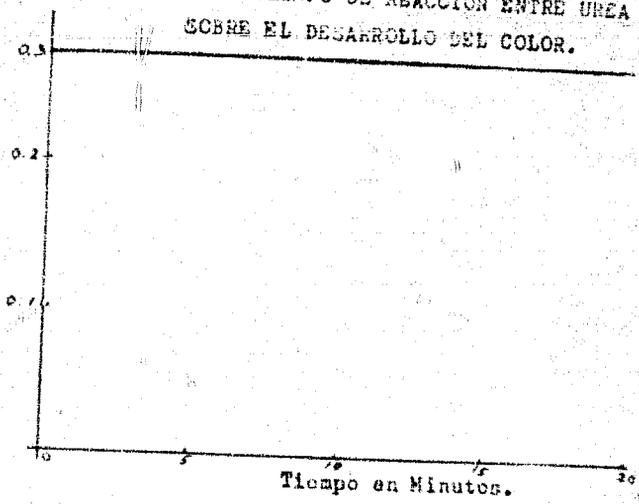
De esta manera encontramos que 0.1 ml. es la cantidad necesaria de ácido sulfúrico para el desarrollo óptimo del color.

Indudablemente que estas variantes, a la técnica original nos modificaron el tiempo de reposo después del cuál se deben hacer las lecturas; por estas consideraciones procedimos a determinar este tiempo de reposo para nuestra técnica modificada e hicimos los siguientes estudios:

Influencia del tiempo de reacción entre la urea y el PSAB sobre el desarrollo del color, es decir, determinar el tiempo al cabo del cuál se debe agregar el ácido sulfúrico para obtener un desarrollo máximo, y además, después de agregar el ácido, el tiempo al cabo del cuál se estabiliza el color máximo para poder hacer las lecturas al colorímetro.

Obtuvimos los resultados que se muestran en las ( gráficas 4 y 5 ).

INFLUENCIA DEL TIEMPO DE REACCION ENTRE UREA Y PDAB  
 SOBRE EL DESARROLLO DEL COLOR.



INFLUENCIA DEL TIEMPO DE REACCION

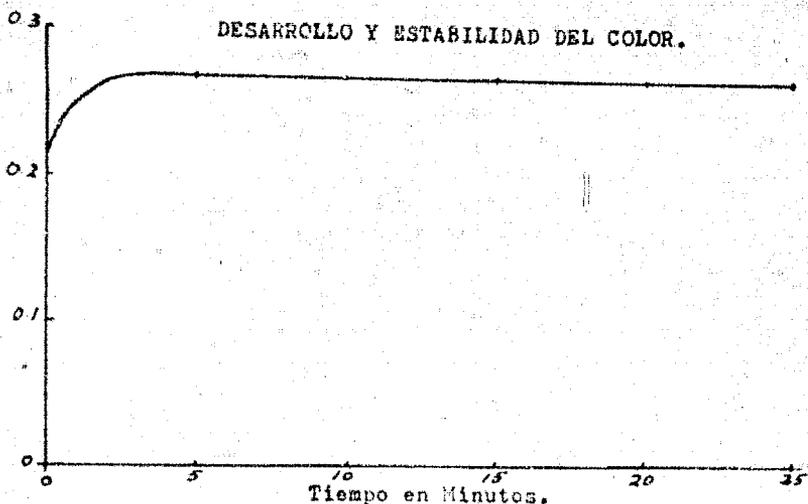
Entre el PDAB y la Urea  
 solucion al 3% de P D A B  
 usando solucion de Urea de 50 mg. N %  
 tratada según la Técnica  
 Acido añadido : 0.1 ml  
 Tiempo de lectura despues de añadir el  
 ácido: 10 minutos.

Tiempo de reacción

(Tiempo al cabo del cual se  
 añadió el  $H_2SO_4$  )

M i n u t o s .

	T	D.O.
0	53	0.276
1	55	0.260
2	54	0.268
5	53	0.276
10	54	0.268
20	54	0.268



**INFLUENCIA DEL REPOSO DESPUES DE ANADIDO EL  $H_2SO_4$  SOBRE**

EL DESARROLLO DEL COLOR

Solución al 3 % de PDAB

Usando solución de Urea de 50 mg N %

Acido añadido: 0.1 ml.

Tiempo de reposo 10 minutos

Tiempo de Reposo Minutos	T	D.O.
0	61	0.215
1	51	0.245
2	55	0.260
3	54	0.268
4	54	0.268
5	54	0.268
6	54	0.268
7	54	0.268
8	54	0.268
9	54	0.268
10	54	0.268
15	54	0.268
20	54	0.268
30	54	0.268

De ellos deducimos lo siguiente:

19.- El tiempo de reacción entre el PDAB y la urea no influye -  
sobre el desarrollo del color.

20.- El tiempo de reposo mínimo al cabo del cuál se debe hacer  
la lectura en tres minutos.

Conforme avanzó nuestro trabajo práctico, observamos cierta -  
dificultad el trabajar con plasma sanguíneo, sobre todo por que  
teníamos que contar con la cantidad bastante apreciable de san-  
gre para obtener los dos ml. de plasma que necesitábamos; así -  
pués, hicimos estudios comparativos trabajando con sangre total,  
plasma y paquetes globulares obtenidos por centrifugación, para  
ver la posibilidad de utilizar un material más fácil de manejar.

De esta manera observamos que los datos obtenidos en las deter-  
minaciones usando sangre total y plasma sanguíneo son iguales; -  
con paquete globular es bastante difícil trabajar. Por estas ra-  
zones decidimos emplear como material de trabajo sangre total y  
no plasma sanguíneo, siendo la desproteinización de aquella en -  
igual forma que la descrita para plasma sanguíneo.

Después del estudio de estas variantes a la técnica original -  
de Brown estamos en condiciones de describir nuestra técnica mo-  
dificada, y la cual usamos durante el desarrollo del presente -  
trabajo.

## TECNICA DE BROWN MODIFICADA.

### Reactivos:-

- a).- Solución alcohólica reguladora.- Igual a la original de Brown.
- b).- Solución de ureasa.- Igual a la original de Brown.
- c).- Sulfato de Zinc al 10 %.- Igual a la original de Brown.
- d).- Hidroxido de sodio 0.5 N.- Igual a la original de Brown.
- e).- Solución de PDAB.- Pesar 3 gm. de PDAB disolver en alcohol etílico al 95 % en matraz aforado de 100 ml. diluyen do hasta la marca.
- f).- Acido sulfúrico concentrado.
- g).- Sangre total citratada.

### Técnica:-

Desproteínización.- Esta se lleva a cabo conforme a la técnica original de Brown.

Sangre libre de urea.- Aproximadamente 5 ml. de sangre total citratada libre de sulfas, se agregan 4 ó 5 gotas de solución de ureasa; tapar con tapón de hule y reposar durante toda la noche.

Desproteínizar en igual forma que la sangre problema; el filtrado nos servirá como blanco.

1.- En dos tubos de ensaye, poner en uno 2 ml. del filtrado de la sangre tratada con ureasa ( blanco ); y en el otro 2 ml. del filtrado de la sangre problema.

2.- A cada uno de los tubos agregar 2 ml. de la solución alco-

hólica de PDAB.

- 3.- Añadir 0.1 ml. de ácido sulfúrico a los dos tubos.
- 4.- Reposar tres minutos ( mínimo ), y leer al colorímetro a 430  $\mu$  llevando a 100 por % de transmisión con el blanco.
- 5.- Determinar la Densidad Óptica del problema, multiplicar -- por el factor y determinar los miligramos de Nitrogeno Ureico en 100 ml.

#### CURVA DE CALIBRACION.

Se partió de una solución patrón de urea correspondiente a 50 mg. de nitrógeno ureico, por 100 ml. que se preparan disolviendo 107 mg. de urea en agua en un matraz volumétrico de 100 ml. diluyendo hasta la marca.

Se prepararon las diluciones correspondientes para obtener concentraciones desde 5 hasta 45 mg. de nitrógeno uréico y trabajando conforme a nuestra técnica modificada para determinar el factor.

Por eso se uso la fórmula:

$$D.O. = Kc$$

En la que D.O. = Densidad Óptica.

K. = Constante del aparato.

c. = Concentración.

Conocidos D.O. y c., se despeja K, su valor determinado por un promedio de los resultados obtenidos.

La inversa de K es denominada factor ya que en el problema tenemos:

$$D.O. = Kc.$$

$$c = \frac{D.O.}{K}$$

$$c = D.O. \text{ por } \frac{1}{K}$$

O sea:

$\frac{1}{K} = F$ , factor de conversión en donde tenemos que;

D.O. por F = mg. de nitrógeno uráico en 100 ml.

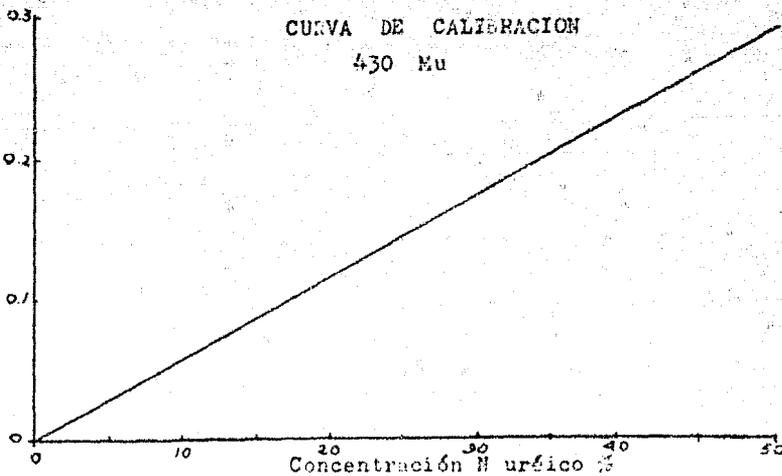
Nuestro factor así determinado fué 188.3

Influencia de las sulfas:-

Ya Brown en su trabajo original menciona la interferencia de las sulfas en su método, por lo que nosotros procedimos a determinar si con nuestra técnica modificada se podía proceder en igual forma que la descrita por Brown.

Por ésto determinamos el espectro de absorción de una de las sulfas más en uso: Sulfatiazol, misma usada por Brown.

Los resultados se muestran en la ( Grafica 6 ).



CURVA DE CALIBRACION

solución de PDAE \_\_\_\_\_ 3%

cantidad de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> \_\_\_\_\_ 0.1 ml

Tiempo de reposo \_\_\_\_\_ más de 3 min.

Leer contra El.

CONC.	No.	T	D.O.	PRIMEDIO	K	K PROMEDIO	F (1/K)
5	1	94	0.027	0.026	0.0052		
	2	95	0.022				
10	1	80	0.055	0.055	0.0055		
	2	80	0.055				
15	1	82	0.086	0.086	0.0057		
	2	80	0.099				
20	1	78	1.108	0.108	0.0054		
	2	78	1.108				
25	1	72	0.143	0.152	0.0051	0.00531	188.3
	2	69	0.161				
30	1	65	0.187	0.184	0.0052		
	2	66	0.181				
35	1	60	0.222	0.215	0.0054		
	2	62	0.208				
40	1	52	0.284	0.284	0.0063	+	
	2	52	0.284				
45	1	50	0.300	0.300	0.0060	+	No tomar en cuenta
	2	50	0.300				

F x D.O. \_\_\_ mg. N Úrico x 100 ml.

Como se ve en 480 Mu podemos hacer una lectura, de la que estamos seguros es una absorción de color, debida única y exclusivamente al compuesto colorido de la sulfá y del PDAB, a esta misma longitud de onda el compuesto colorido de urea y PDAB no nos da ninguna lectura ( ver pagina 8 y 9 ).

Es por esta razón que cualquier filtrado tratado conforme a nuestra Técnica Modificada y leyendo su absorción a 480 Mu, que nos diera una absorción menor de 97 por 1 la consideraremos "contaminada" con cualquier medicamento del tipo de las sulfas.

Para determinar la absorción debida única y exclusivamente a la urea seguimos la técnica descrita por Brown, 6 sea:

A 2 ml. de filtrado agregar dos gotas de solución de ureasa, reposar 30 minutos. Para desarrollar el color de este filtrado así tratado seguimos nuestra técnica modificada.

Agregar 2 ml. de solución de PDAB y posteriormente 0.1 ml. de ácido sulfúrico; reposar 3 minutos y determinar su absorción a 430 Mu.

Restar la absorción de la muestra contaminada de la absorción de la muestra sin tratar con ureasa; el resultado será la absorción debida solamente a la urea.

Esta absorción se puede transformar en D.O. y determinar así la concentración de nitrógeno uréico en 100 ml. Como se ve la técnica usada es en sí misma la de Brown variando sólo en procedimiento para desarrollar el color.

En nuestro estudio comparativo de las técnicas de Brown Modificada y de Karr tuvimos la suerte de que ninguno de los casos nos encontramos sangres con sulfas, ya que como se ve en los resultados los niveles de urea encontrados son normales por lo que suponemos que ninguna de las personas de las que se obtuvieron sangre estaban en tratamiento a base de sulfas.

Determinación de nitrógeno uréico por nesslerización directa.

Fundamento:-

En este método ideado por Karr el filtrado libre de proteínas es incubado con ureasa y una solución amortiguadora de acetato.

La solución obtenida se nessleriza y compara en el colorímetro con una solución patrón de urea sometida al mismo procedimiento.

Material:-

Dos tubos de ensayo graduados a 22.5 cm<sup>3</sup> y 25 cm<sup>3</sup>.

Reactivos:

1.- Ureasa.- Se colocan 3 gm. de permutita en un matraz de 500 ml. se añaden 50 ml. de solución de ácido acético al 2 por %.

Déjese sedimentar la permutita y decántese el líquido que sobrenada. Lávese dos veces con 50 ml. de agua, decantándose ésta cada vez. A la permutita lavada se añaden 15 gm. de harina de soya.

Luego se agrega una mezcla de 16 ml. de alcohol y 84 ml. de agua.

Agítese suave aunque continuamente durante 15 minutos. Déjese reposar en refrigerador durante una noche. Cuando se aclare el líquido que sobrenada, se transfiere a frascos pequeños, que se conservan bien tapados en el refrigerador.

2.- Amortiguador.- Se disuelven 20 gm. de acetato sódico en agua y se añaden 2.2 ml. de ácido acético al 10 por %. Se diluyen hasta 100 ml. y se mezcla.

3.- Solución patrón de nitrógeno uréico.- Disuélvase 0.3215 g. de urea en agua y dilúyase hasta 500 ml. (cada ml. de la solución contiene 1.5 mg. de nitrógeno uréico).

4.- Solución tipo de nitrógeno uréico.- Coloque en un frasco volumétrico de 100 ml. de la solución patrón de nitrógeno uréico y dilúyase hasta la marca ( cada 5 ml. contienen 0.075 mg. de nitrógeno uréico ).

5.- Solución de nessler.- Se disuelven 30 gm. de yoduro de potasio en 20 ml. de agua destilada y se añaden a la solución 22.5 de yodo. Se agita hasta disolución y se agregan 30 gm. de mercurio metálico. Se agita bien la mezcla y se mantiene fría llevándola de vez en cuando bajo el chorro del agua del grifo, hasta que el líquido sobrenadante pierda el color amarillo del yodo.

Se separa por decantación el mercurio que quede sin disolver y se comprueba si hay exceso de yodo, añadiendo algunas gotas a un poco de solución de almidón en tubo de ensaye. Si no se pro-

duce color azul se añade gota a gota solución de yodo, semejante a la ya indicada, hasta que se logre un ligero exceso de yodo revelado con la prueba con almidón. Se diluye 200 ml. se mezcla y se vierte sobre 975 ml. de solución de hidróxido sódico al 10 por 100 preparada con toda exactitud. Se mezcla bien y se deja sedimentar el precipitado.

Esta solución debe prepararse varios días antes de su uso. Se usa el líquido claro sobrenadante. Debe evitarse agitar el sedimento cuando se toma solución del frasco que la contiene.

6.- Solución de goma ghatti.- Se colocan 20 gm. de goma ghatti en bolsa hecha con doble capa de gasa y se sumerge ésta en una probeta que contenga 1000 ml. de agua, de modo que la superficie líquida cubra justo el contenido de la bolsa. Se deja durante toda la noche. Se retira la bolsa, después exprimirla con suavidad. Se filtra la solución por algodón recibiéndola en un frasco alto y estrecho para que pueda depositarse el sedimento. Sólo se usa la capa superior clara. La solución se conserva bien.

Técnica:-

Con pipeta, se depositan en un tubo grande o bien en un matraz 1 ml. de sangre oxalatada, añadiendo 8 ml. de solución de ácido sulfúrico N/12 agitando suavemente, y por último 1 ml. de solución de tungstato de sodio al 10%, agitar fuerte y filtrar.

Del filtrado así obtenido se toman 5 ml. que se colocarán en un tubo de Folin, se añaden cuatro gotas de solución de ureasa y

0.5 ml. de la solución amortiguadora de acetato sódico; se incuba a baño María por 15 minutos, transcurrido este tiempo se saca y añade 4 a 6 gotas de solución de goma ghatti.

Se añora a 22.5 ml. con el agua destilada y se añaden 2.5 de solución de Nessler, se agita y lee en Klett-Summerson (Colorímetro fotoeléctrico). Se usará filtro de luz num. 54 y se hará una lectura a cero como una determinación en blanco con agua destilada. La prueba en blanco debe contener todos los ingredientes de la solución desconocida excepto en el filtrado que se sustituye por agua.

#### CURVA DE CALIBRACION.

##### DETERMINACION DEL FACTOR.

Para el colorímetro Klett - Summerson.

CONC. en mg. de N. uréico	TUBOS	LECTURA	FACTOR	FACTOR PROMEDIO.
5 mg. por 100 ml. _____	1	25	0.2	
	2	25	0.2	
10 mg. por 100 ml. _____	1	48	0.208	
	2	47	0.212	
15 mg. por 100 ml. _____	1	71	0.211	
	2	71	0.211	
20 mg. por 100 ml. _____	1	94	0.212	
	2	92	0.217	
25 mg. por 100 ml. _____	1	116	0.224	
	2	112	0.207	
30 mg. por 100 ml. _____	1	144	0.208	
	2	145	0.207	
35 mg. por 100 ml. _____	1	153	0.228	
	2	155	0.225 = 0.2160	
40 mg. por 100 ml. _____	1	182	0.219	
	2	180	0.222	
45 mg. por 100 ml. _____	1	206	0.218	
	2	206	0.218	
50 mg. por 100 ml. _____	1	221	0.226	
	2	220	0.227	

0.5 ml. de la solución amortiguadora de acetato sódico; se incubaba a baño María por 15 minutos, transcurrido este tiempo se saca y añade 4 o 6 gotas de solución de goma ghatti.

Se afora a 22.5 ml. con el agua destilada y se añaden 2.5 de solución de Nessler, se agita y lee en Klett-Summerson (Colorimetro fotoeléctrico). Se usará filtro de luz num. 54 y se hará una lectura a cero como una determinación en blanco con agua destilada. La prueba en blanco debe contener todos los ingredientes de la solución desconocida excepto en el filtrado que se sustituye por agua.

**CURVA DE CALIBRACION.**

**DETERMINACION DEL FACTOR.**

Para el colorimetro Klett - Summerson.

CONC. en mg. de N. urfíco	TUBOS	LECTURA	FACTOR	FACTOR PROMEDIO.
5 mg. por 100 ml. _____	1	25	0.2	
	2	25	0.2	
10 mg. por 100 ml. _____	1	48	0.208	
	2	47	0.212	
15 mg. por 100 ml. _____	1	71	0.211	
	2	71	0.211	
20 mg. por 100 ml. _____	1	94	0.212	
	2	92	0.217	
25 mg. por 100 ml. _____	1	116	0.224	
	2	112	0.207	
30 mg. por 100 ml. _____	1	144	0.208	
	2	145	0.207	
35 mg. por 100 ml. _____	1	153	0.228	
	2	155	0.225 = 0.2160	
40 mg. por 100 ml. _____	1	182	0.219	
	2	180	0.222	
45 mg. por 100 ml. _____	1	206	0.218	
	2	206	0.218	
50 mg. por 100 ml. _____	1	221	0.226	
	2	220	0.227	

Se partió de una solución de urea correspondiente a 50 mg. de nitrógeno uréico, como en el caso de la curva de calibración del PDAB.

Se prepara disolviendo 107 mg. de urea en agua en un matraz volumétrico de 100 ml. diluyendo hasta la marca.

Se prepararon las diluciones correspondientes para obtener concentraciones desde 5 hasta 45 mg. de nitrógeno uréico para obtener el factor según la fórmula:

$$F = \frac{c}{\text{lectura}}$$

#### RECUPERACION:-

Con el objeto de poder determinar la exactitud de la técnica de Brown, en comparación con la técnica de Karr, se hizo un estudio si múltiple de recuperación en ambas técnicas.

Se determinó primero la urea con sangres normales por los dos métodos.

A éstas sangres de concentración conocida para nosotros, les agregamos solución patrón de nitrógeno uréico de tal manera que a la cifra determinada, se sumará una cantidad correspondiente a 15 mg. de nitrógeno uréico por 1.0 ml.

De esta manera, por una nueva determinación, la cifra teórica que debíamos obtener sería la ya determinada en un principio agregada de 15 mg.

Los datos están en la tabla correspondiente, página 30.

CAPITULO III.  
RESULTADOS.

## RESULTADOS:

Como se menciona al principio de éste trabajo hicimos un estudio comparativo de 50 casos de determinación de nitrógeno uréico por los métodos de Karr y Brown Modificado.

Los resultados se muestran a continuación.

Método de Karr	Método de PDAB Modificado.
1.- N.U. = 13.00	1.- N.U. = 12.31
2.- N.U. = 10.60	2.- N.U. = 10.43
3.- N.U. = 21.00	3.- N.U. = 17.80
4.- N.U. = 12.00	4.- N.U. = 10.30
5.- N.U. = 11.89	5.- N.U. = 11.39
6.- N.U. = 14.73	6.- N.U. = 14.26
7.- N.U. = 10.80	7.- N.U. = 9.51
8.- N.U. = 12.80	8.- N.U. = 11.73
9.- N.U. = 13.19	9.- N.U. = 12.38
10.- N.U. = 18.24	10.- N.U. = 18.21
11.- N.U. = 11.00	11.- N.U. = 8.66
12.- N.U. = 29.188	12.- N.U. = 26.00
13.- N.U. = 40.00	13.- N.U. = 27.85
14.- N.U. = 17.80	14.- N.U. = 14.32
15.- N.U. = 11.39	15.- N.U. = 9.20
16.- N.U. = 13.10	16.- N.U. = 12.60
17.- N.U. = 8.60	17.- N.U. = 7.60
18.- N.U. = 13.80	18.- N.U. = 12.73

Método de Karr	Método de PDAB Modificado.
19.- N.U. = 18.77	19.- N.U. = 18.00
20.- N.U. = 21.00	20.- N.U. = 20.20
21.- N.U. = 9.00	21.- N.U. = 8.93
22.- N.U. = 17.83	22.- N.U. = 14.20
23.- N.U. = 15.50	23.- N.U. = 14.20
24.- N.U. = 17.20	24.- N.U. = 15.25
25.- N.U. = 26.00	25.- N.U. = 24.00
26.- N.U. = 11.00	26.- N.U. = 9.76
27.- N.U. = 18.00	27.- N.U. = 16.80
28.- N.U. = 28.00	28.- N.U. = 25.93
29.- N.U. = 41.00	29.- N.U. = 35.40
30.- N.U. = 25.00	30.- N.U. = 25.80
31.- N.U. = 18.30	31.- N.U. = 15.25
32.- N.U. = 7.20	32.- N.U. = 8.66
33.- N.U. = 20.20	33.- N.U. = 19.62
34.- N.U. = 14.00	34.- N.U. = 12.44
35.- N.U. = 12.60	35.- N.U. = 10.54
36.- N.U. = 14.00	36.- N.U. = 11.49
37.- N.U. = 11.00	37.- N.U. = 9.63
38.- N.U. = 18.00	38.- N.U. = 16.38
39.- N.U. = 6.00	39.- N.U. = 3.80
40.- N.U. = 12.00	40.- N.U. = 8.66

Método de Karr

41.- N.U. =	9.00
42.- N.U. =	9.00
43.- N.U. =	14.00
44.- N.U. =	20.00
45.- N.U. =	24.00
46.- N.U. =	12.00
47.- N.U. =	8.80
48.- N.U. =	12.00
49.- N.U. =	14.00
50.- N.U. =	12.00

Método de PDAB Modificado.

41.- N.U. =	4.10
42.- N.U. =	6.02
43.- N.U. =	13.14
44.- N.U. =	17.20
45.- N.U. =	19.40
46.- N.U. =	8.65
47.- N.U. =	7.00
48.- N.U. =	9.73
49.- N.U. =	12.00
50.- N.U. =	10.54

N. U. = Nitrógeno uréico en sangre.

### CASOS DE RECUPERACION

Este estudio se llevó a cabo con una solución de 15 mg. de nitrógeno uréico en ambas técnicas.

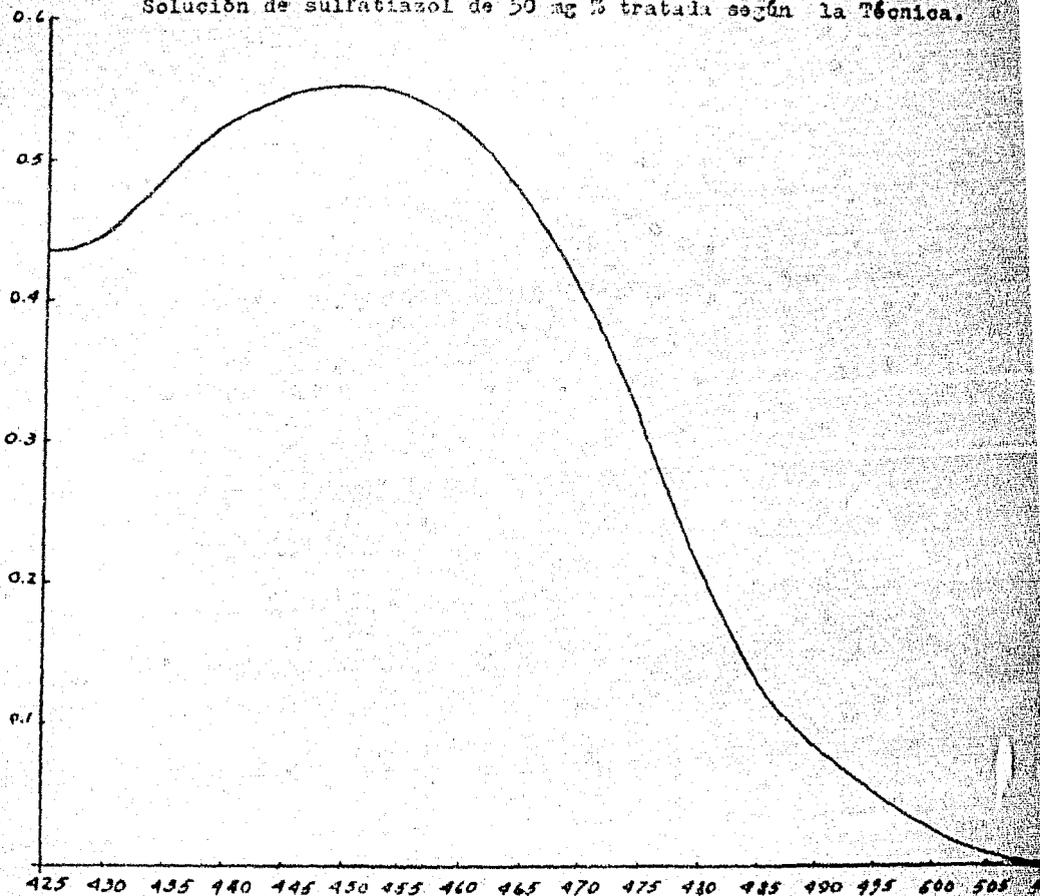
Karr	P.D.A.B. Modificado.								
1.- 30.00 <u>15.00</u> 44.00 97.78%	1.- 17.93 <u>15.00</u> 31.00 96%								
2.- 32.00 <u>15.00</u> 42.00 98.85%	2.- 61.19 <u>15.00</u> 31.80 99%								
3.- 34.70 <u>15.00</u> 44.00 98.87%	3.- 16.00 <u>15.00</u> 30.00 97%								
4.- 13.60 <u>15.00</u> 28.50 99.50%	4.- 7.72 <u>15.00</u> 25.80 92%								
5.- 23.60 <u>15.00</u> 37.95 99.98%	5.- 15.44 <u>15.00</u> 30.00 98%								
6.- 12.00 <u>15.00</u> 27.50 101.00%	6.- 8.66 <u>15.00</u> 28.06 97%								
7.- 41.00 <u>15.00</u> 55.97 99.80%	7.- 15.25 <u>15.00</u> 29.75 98%								
8.- 37.00 <u>15.00</u> 57.00 102.95%	8.- 11.49 <u>15.00</u> 25.07 94%								
9.- 37.00 <u>15.00</u> 56.00 99.95%	9.- 13.38 <u>15.00</u> 27.96 98%								
10.- 20.00 <u>15.00</u> 37.20 103.78%	10.- 18.26 <u>15.00</u> 33.21 99%								
<table border="0" style="width: 100%; margin: 0 auto;"> <tr> <td style="width: 33%;">Inicial</td> <td style="width: 33%;">Añadida</td> <td style="width: 33%;">Total</td> <td style="width: 33%;">Recup.</td> </tr> </table>	Inicial	Añadida	Total	Recup.	<table border="0" style="width: 100%; margin: 0 auto;"> <tr> <td style="width: 33%;">Inicial</td> <td style="width: 33%;">Añadida</td> <td style="width: 33%;">Total</td> <td style="width: 33%;">Recup.</td> </tr> </table>	Inicial	Añadida	Total	Recup.
Inicial	Añadida	Total	Recup.						
Inicial	Añadida	Total	Recup.						

PROMEDIO DE RECUPERACION KARR = 101.23 %

BROWN = 98.80 %

# ESPECTRO DE ABSORCION DEL SULFATIAZOL

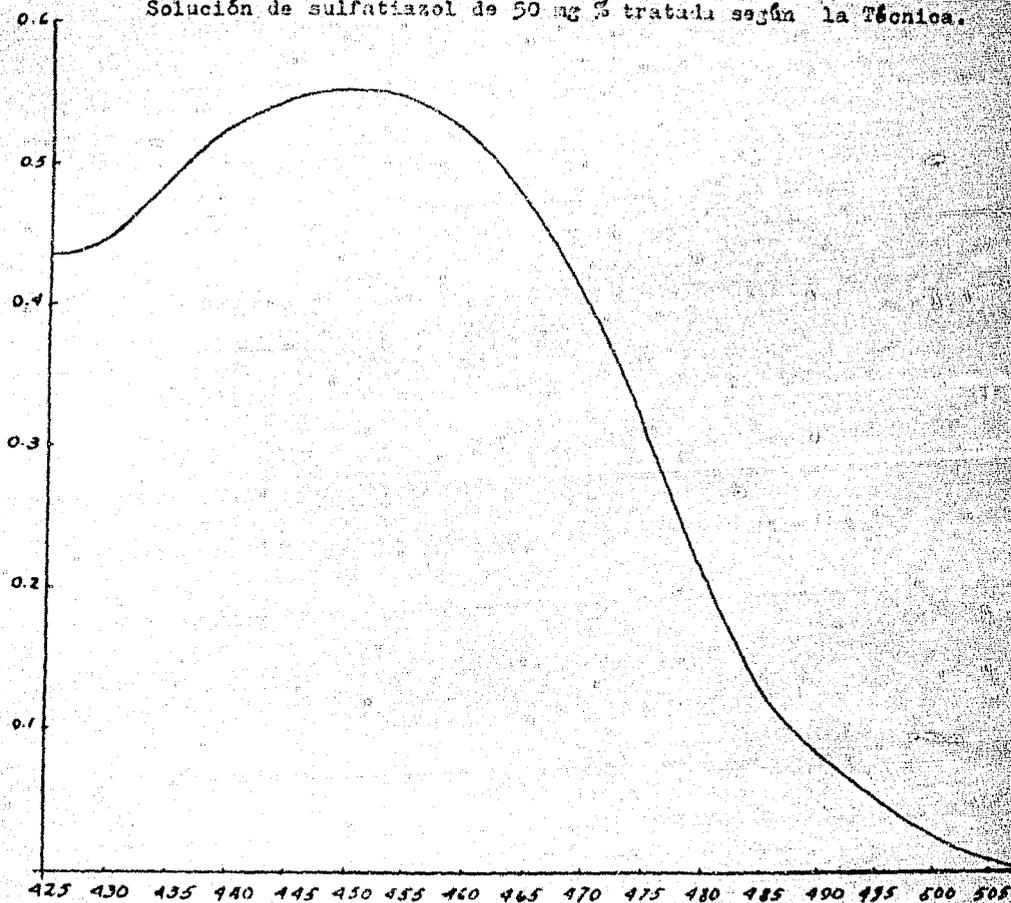
Solución de sulfatiazol de 50 mg % tratada según la Técnica.



n.o.		Longitud de Onda.	n.o.		
425	0.438	455	0.545	435	0.431
430	0.450	460	0.531	490	0.085
435	0.494	465	0.475	495	0.035
440	0.522	470	0.409	500	0.011
445	0.545	475	0.315	505	0.005
450	0.552	480	0.208	510	0.000

# ESPECTRO DE ABSORCION DEL SULFATIAZOL

Solución de sulfatiazol de 50 mg % tratada según la Técnica.



D.O.	Longitud de Onda.	D.O.	
425	0.438	485	0.131
430	0.450	490	0.086
435	0.494	495	0.036
440	0.522	500	0.011
445	0.545	505	0.005
450	0.552	510	0.000
455	0.545		
460	0.531		
465	0.475		
470	0.409		
475	0.315		
480	0.208		

CAPITULO IV.  
DISCUSSION.

## DISCUSION:-

### Modificación de la técnica.-

En su trabajo original, Brown menciona haber usado un espectrofotómetro Baush and Lomb Spectronic 20 y que debido al intenso color del reactivo de PDAB, el espectrofotómetro Coleman Junior no pudo ser usado.

Nosotros observamos esto mismo, pero trabajando con el mismo tipo de aparato que a Brown dió resultado un Baush and Lomb Spectronic 20.

Hicimos varios intentos al preparar la solución de trabajo de PDAB pero siempre obtuvimos tal intensidad de color que era imposible llevar a 100 por % de transmisión con el blanco, a menos que se hiciera una dilución, más como ésto implicaba una dilución del problema, nos pareció más conveniente ver la forma de evitar estas diluciones; de ahí el estudio de las modificaciones que creimos pertinentes, con resultados óptimos que nos condujeron a nuestra técnica de Brown Modificada, que es perfectamente reproducible y fiable según mostramos en el estudio comparativo hecho con la técnica de Karr.

Durante el estudio del espectro de absorción de una solución alcohólica de PDAB al 5 % o se tal como la describe Brown, observamos que la solución que usabamos como blanco ( agua destilada tratada como sangre o plasma sanguineo ); al ser tratada con la

solución de PDAB y ácido sulfúrico, daba también una coloración tan intensa que nos impedía llevar la transmitancia a 100 por %, entonces procedimos a leer contra un blanco de agua destilada con el que llevamos a 100 por % de transmitancia y lefamos la transmisión del blanco tratado y de la solución patrón; restamos las D. O. y así pudimos sacar la D.O. debida al compuesto colorido de la solución patrón.

Como vemos de nuevo para poder trabajar con esta solución de PDAB necesitaríamos hacer diluciones del blanco y problema, cosa que redundaría en un error en la cifra obtenida, por lo que decidimos exoger la concentración de 3 % como óptima para el trabajo práctico, pues con ella se evitaba las tan ya mencionadas diluciones.

Determinada esta concentración óptima de PDAB no podíamos trabajar con aproximaciones, esto es refiriéndonos a la cantidad de agregada; por esta razón fué el estudio de la influencia de la concentración de ácido sulfúrico sobre el desarrollo de color; --

Dar las condiciones óptimas a las modificaciones que haríamos a una técnica original.

La elaboración de la curva de calibración y con ella la determinación de un factor de conversión, no presentó problema alguno lo que nos indica que trabajamos en condiciones óptimas y perfectamente reproducibles.

### Influencia de las sulfas:-

El estudio de la influencia de las sulfas nos dió resultados semejantes a los proporcionados por Brown en su trabajo original; incluso la forma que se determina la absorción debida única y exclusivamente al compuesto colorido de urea y PDAB, es igual al usado por Brown, sólo modifica en el proceso de desarrollo de color que fué conforme nuestra Técnica Modificada.

Desafortunadamente no proporcionamos datos de los resultados, - pues como mencionamos antes, ninguno de los casos estudiados presentó concentraciones con sulfas; es por ésto que sólo menciona - los el proceso, aunque basada en datos experimentales.

### ESTUDIO COMPARATIVO DE LA TÉCNICA DE KARR Y LA DE BROWN MODIFICADA RECUPERACION:-

Como se ve los resultados obtenidos por ambos métodos son bastante parecidos, aunque se nota una franca tendencia a cifras más altas por el método de Karr.

A nuestro parecer, esta tendencia se debe al reactivo de Nessler, que apesar de ser recién preparado se presentaba conforme pasaba - el tiempo, una turbidez, que incluso con filtraciones repetidas no pudimos eliminar; esta turbidez influye una mayor absorción de - luz lo que resulta en la obtención de cifras más altas.

Esto no se observa con el reactivo de PDAB, pues la solución es - completamente estable, no presentando ni la más ligera turbidez aun después de un lapso de 6 meses; esto indudablemente no sucede con -

el Reactivo de Nessler ,pues de un día para otro puede (de hecho presenta) presentar turbidez.

El compuesto colorido obtenido por nesslerización, debe ser leido casi inmediatamente, pues pasado un tiempo, también se enturbia la solución.

El compuesto colorido obtenido con PDAB se estabiliza en un tiempo mínimo de tres minutos, y se puede hacer lecturas aún después de once días, no mostrando ninguna variación, ni en la intensidad del color ni en la transparencia de la solución.

Son estas las mejores ventajas que encontramos al Método que - - proponemos sobre el de Karr.

Encontramos además que el método propuesto es más exacto que el - de Karr , como se desprende de los datos obtenidos del estudio de 10 casos de recuperación.

101.23 % de recuperación para el Método de Karr.

98.80 % de recuperación para el Método de Brown Modificado.

La cifra 2.34 más alta que el 100 por % del Método de Karr es - considerable , y la atribuimos a la turbidez del Reactivo de - - Nessler ; 98.80 % que obtenemos por el Método de Brown Modificado nos acerca a la exactitud, otra de las ventajas del Método que proponemos sobre el de Karr.

Una más es que el filtrado obtenido por el Método de desproteini zación de Brown, nos sirve para disificar cualquiera de los elementos usados en la rutina clínica ó sea úrico, glucosa y creatinina .

Sin embargo, encontramos también desventajas al método modificado, de ellas, la más importante a nuestro juicio, la influencia interferencia de las sulfas.

No pudimos encontrar algún indicio para evitar esta influencia de las sulfas, sólo pudimos reproducir la manera de obtener la absorción debida única y exclusivamente al compuesto colorido de la urea y PDAB.

En resumen:- El método de Brown Modificado que proponemos, es factible de poder usarse en la rutina clinica.

CAPITULO V.  
RESUMEN .

CAPITULO V.  
RESUMEN.

RESUMEN:-

- 1.- Se utiliza el Método de Brown ( 1959 ) para determinación de nitrógeno urfico en sangre en comparación con el Método de - Karr ( 1924 ).
- 2.- Se encuentra una serie de dificultades con el Método original, que nos induce a estudiar algunas modificaciones.
- 3.- Estas modificaciones nos dan resultados óptimos, por lo que - en el trabajo práctico seguimos una técnica modificada.
- 4.- El estudio comparativo se hace con la Técnica Modificada.
- 5.- La interferencia de las sulfas estudiada con la Técnica Modificada, nos da resultados semejantes a los reportados por Brown en su trabajo original.
- 6.- Encontramos superior la Técnica Modificada a la técnica de -- Karr.
- 7.- La única desventaja realmente importante a la Técnica Modificada es la interferencia de las sulfas.
- 8.- Se propone una técnica para determinación de nitrógeno urfico en sangre. Con ventaja sobre la Técnica de Karr, a la cual de nominamos "Técnica Modificada de Brown".

CAPITULO VI.  
BIBLIOGRAFIA.

BIBLIOGRAFIA:-

- Seyler's Zeitscher.- *Physiol. Chem.* 290 (316):136-138-1952
- Wait, G.W., Chriss, J.D., *Anal Chem.* 26,452 (1954)
- Karr ( *J. Lab. Clin. Med.* 1924, 9:3 )
- Van Slyke y Cullen ( *J. Biol. Chem.*, 1916, 24: 117)
- Koch y McMeekin ( *J. Am. Chem. Soc.*, 1924, 46: 2066 )
- S.K. Tower ( *Chem. Analyst* 32,7-8, 1943 )
- Stanley Levey and Jean Reid ( *Wayne Univ. Detroit Mich.*  
*Am. J., Clin. Path.* 22-798., 805, 1952 )
- Harald Leer ( *Mount Sinai Hosp N.Y.J. Univ.* 64-818-20 1950 )
- Teresa Sanchez y José del Burgo, *Colegio Para.* (Santiago de  
Chile 11. No. 131-32,1-3., 1954 )
- Modified Karr Method.- When using Lab.-trol as a Control.  
*J. Lab Clin. Med.* 9,3 ( 1924 )
- Gentzkow Masen *J Biol. Chem.* 143-531 ( 1942 ).