

302927

Universidad Femenina
de México

UNIVERSIDAD FEMENINA DE MEXICO

DETERMINACION DE ACIDO
ASCORBICO EN PLASMA Y
SANGRE EN INDIVIDUOS DE
DIFERENTES EDADES

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
GLADIS GONZALEZ MUCIÑO

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO. D. F.

1990



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 está 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.

I N D I C E

	Páginas
CAPITULO I INTRODUCCION	1
CAPITULO II GENERALIDADES	
2.1. Historia	3
2.2. Monografía	5
2.3. Estabilidad	6
2.4. Síntesis	6
2.5. Fuentes de la vitamina C	7
2.6. Farmacología	10
2.6.1. Absorción, distribución y excreción del ácido ascórbico	11
2.6.2. Requerimientos diarios del ácido ascórbico	13
2.6.3. Papel fisiológico	14
2.6.3.1. Patología de los radicales libres y su prevención con vitaminas antioxidantes	18
2.6.3.2. La vitamina C en las principales enfermedades mortales.	21
2.6.3.3. Arterioesclerosis y enfermedades isquémicas al corazón.	23
2.6.3.4. El estilo de vida y la vitamina C.	25
2.6.3.5. Combinación de la vitamina C y otros antioxidantes.	26
2.6.3.6. Prevención de la formación de compuestos N-nitrosos por medio de la vitamina C.	26
2.7. Usos clínicos del ácido ascórbico.	27
2.8. Métodos analíticos para la determinación del ácido ascórbico en muestras biológicas.	28

2.8.1.1.	Cromatografía en papel.	30
2.8.1.2.	Cromatografía en capa fina.	30
2.8.1.3.	Cromatografía de gases.	31
2.8.1.4.	Cromatografía de líquidos.	31
2.8.2.	Método electroquímico.	32
2.8.3.	Método enzimático.	32
2.8.4.	Método por espectroscopía.	34
2.8.4.1.	Iones metálicos.	34
CAPITULO III PARTE EXPERIMENTAL		36
3.1.	Método analítico para determinar ácido ascórbico en plasma y sangre.	37
3.2.	Validación y optimización del método.	38
3.2.1.	Linealidad del sistema.	38
3.2.2.	Precisión del método.	39
3.2.3.	Precisión del sistema.	39
3.2.4.	Análisis de reproducibilidad de la cinética del ácido ascórbico en agua.	39
3.2.5.	Exactitud del método en sangre.	40
3.2.6.	Exactitud del método en plasma.	41
3.2.7.	Estabilidad del ácido ascórbico en muestras plasmáticas.	41
3.3.	Determinación del ácido ascórbico en plasma y sangre en sujetos de diferentes edades.	42
CAPITULO IV RESULTADOS		43
CAPITULO V ANALISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIONES		73
CAPITULO VI CONCLUSIONES		82
CAPITULO VII BIBLIOGRAFIA		84

CAPITULO I

INTRODUCCION

El ácido ascórbico (A.A.) también conocido como vitamina C o vitamín C tiene una gran historia, ya que el mismo Hipócrates nos describe los síntomas que se presentan cuando existe una disminución de esta vitamina en el organismo humano, síntomas que dan origen al escorbuto.¹

El ácido ascórbico es un micronutriente que es sintetizado por los seres vivos, vegetales y animales, salvo el cobayo, mono y hombre; esto implica que su ingesta es indispensable, encontrándose así especialmente en las frutas cítricas: limón, naranja, tomate, repollo, coliflor, papaya y guayaba. Existe también en los organismos animales, especialmente las glándulas endócrinas y en particular en las suprarrenales, tanto en la corteza como en la médula^{2,3}.

En la actualidad está aumentando la literatura científica y el número de ensayos clínicos que se están realizando para dilucidar los múltiples procesos en que interviene la vitamina C en el organismo humano. Indudablemente la función bioquímica que desempeña el ácido ascórbico se relaciona con su carácter de buen agente reductor. Involucrándose así en la síntesis de colágeno⁴; tiene acción sobre las células de hueso y piel⁵ como también interviene en la síntesis de las prostaglandinas⁶. Se han encontrado niveles considerados en el TPN.⁷

Tiene efectos sobre los niveles de colesterol y lípidos totales⁸ y a su vez optimiza la absorción del hierro⁹, previene el cáncer intestinal¹⁰ teniendo también efectos sobre la inmunidad celular humoral en niños atópicos (Asmáticos)¹¹.

En México puede pensarse que gran parte de las enfermedades son a causa de los bajos niveles plasmáticos de ácido ascórbico, por un factor de tipo cultural debido a que la mayor parte de la población indígena y aún mucha gente de las grandes ciudades de nuestro país tienen hábitos pobres de alimentación, muy pocos consumen cantidades necesarias de frutas naturales o vegetales frescos, la falta de balanceo de su dieta, y la pérdida de estas vitaminas en su forma de preparación de los guisados.

Por lo anteriormente mencionado se hace resaltar la importancia del A.A. en la dieta diaria, debiendo cubrir una cantidad de 60-100 mg/día en adultos¹².

El objetivo del presente estudio será la determinación del ácido ascórbico en muestras plasmáticas y sanguíneas en 100 individuos, los cuales se clasificarán por edades (Los sujetos en estudio serán mayores de 20 años); empleando el método espectrofotométrico de Tillmans, utilizando como indicador 2,6-diclorofenol-indofenol en medio ácido. Se evaluarán estadísticamente los valores obtenidos. En donde se espera obtener valores mayores en los jóvenes que en el resto de los grupos. Ya que se ven enfatizadas una serie de enfermedades en edad adulta.

CAPITULO II

GENERALIDADES

2.1 HISTORIA.

El escorbuto es una de las enfermedades más antiguas que la humanidad conoce. Hay evidencias de la existencia de esta enfermedad, descrita en el Antiguo Testamento, en los papiros de Ebers y en los escritos de Pliny. Esta fue la enfermedad que azotó a fines del siglo XVII al Norte de Europa y trajo severos problemas con los marineros, sobre todo cuando se realizaban viajes de exploración en tiempos muy largos⁸⁰.

A continuación se enlistan los acontecimientos más relevantes con respecto a la historia del A.A.

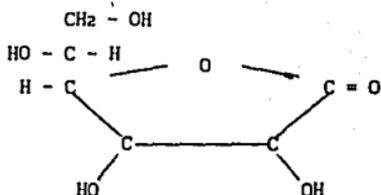
Año.

- 400 A.C. Hipócrates describe la sintomatología del escorbuto.
- 1757 El médico Lind demuestra que incorporando naranjas y limones a la dieta se puede prevenir los síntomas del escorbuto.
- 1804 En Britania se hizo obligatorio una ración diaria de Jugo de naranja o de limón a todos los marineros Británicos¹³.
- 1906 El escorbuto se conoce como una enfermedad debido a una dieta deficiente.
- 1928 Szent-Gyorgyi aisla una substancia de las glándulas adrenales del puerco y la llama "Ac. Hexurónico".

- 1930 Szent-Gyorgyi demostró que la misma substancia esta presente en la pimienta dulce y su nombre era vitamina C.
- 1932 Con esfuerzo independiente, Haworth y King establecieron la estructura química de la vitamina C.
- 1933 En Basle, Switzerland y Reichstein sintetizaron el A.A., el cual era idéntico a la vitamina C natural.
- 1936 La vitamina C se empezó a producir en una gran escala industrial.
- 1970 Pauling atrajo la atención de todo el mundo con su controvertido Bestseller "Vitamina C y el resfriado".
- 1981 Ohshima y Bartsch reconocen que en humanos la vitamina C inhibe la formación de nitrosamidas, siendo estas una de las principales causas del cáncer.
- 1986 Piñskowska, K. Gajcy H y Kozlorowska J., establecieron la acción protectora del Ac. Ascórbico contra la mutagenicidad de la aminopirina más nitrito¹⁴.
(Datos recopilados, de las ref 1 y 2).

2.2. MONOGRAFIA

Fórmula estructural:



Acido Ascórbico

Fórmula condensada: $C_6H_8O_6$

PM. 176.12

Sinónimos y Acrónimos:

Originalmente llamado ácido hexurónico, vitamina C, L-ascórbico, L-xiloascórbico ácido, vitamin C, cantaxin, cebión, .3-oxo-L-gulofuranolactona-(forma enólica), vitamina antiescorbútica, ácido cevitamínico.

Descripción: Polvo blanco o cristales delgados amarillos. Si se exponen a la luz se oscurecen. En estado seco es muy estable pero en solución se oxida rápidamente.

Solubilidad: Altamente soluble en agua, parcialmente soluble en alcohol; insoluble en cloroformo, éter, benceno.

Pf = 190 °C Aprox.

Densidad = 1.65 g/ ml.

pH = 3(5mg/ml) solución acuosa.

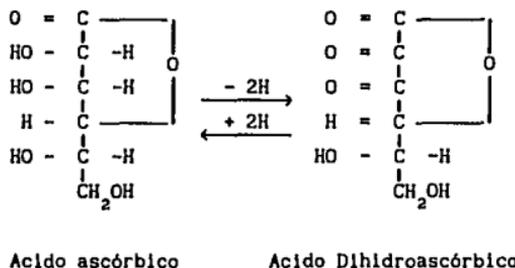
pH = 2(50mg/ml) solución acuosa.

pK₁ = 4.17.

pK₂ = 11.57

2.3. ESTABILIDAD.

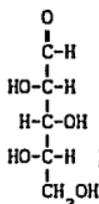
La vitamina es estable en su forma cristalina durante años pero en solución acuosa se oxida, especialmente en medio neutro o alcalino siendo más estable en medio ácido, esta oxidación es catalizada por una acidascorbicoxidasa que existe en las coles, pepinos, corteza suprarrenal, etc. Sin embargo, se pueden conservar materias alimenticias con pérdidas mínimas de su contenido mediante manipulaciones cuidadosas y almacenaje adecuado. Por ejemplo, el jugo de naranja conserva el 90% de su vitamina después de 24 horas en refrigeración en frascos con cierre no hermético.



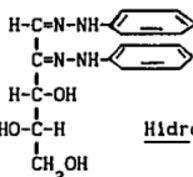
2.4. SINTESIS.

Las plantas y los animales pueden sintetizar el ácido ascórbico a partir de la D-glucosa, excepto los cobayos y los primates incluyendo al hombre. La enzima L-gulón oxidada está ausente en las especies incapaces de producir la vitamina. La enzima convierte la L-gulonolactona en 3-ceto-L-gulonolactona.

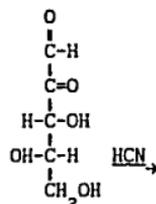
Para la síntesis de esta substancia llevada a cabo por Hawarth y por col., parten de la xilosa¹⁶.



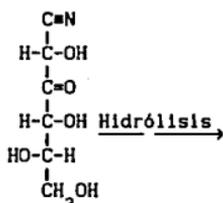
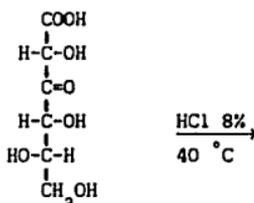
1-Xilosa



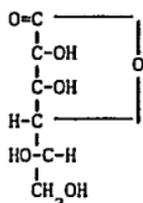
1-Xilosazona



1-Xilosona

Cianhidrina de la
L-Xilosona

Ac. 3-Ceto gulónico



Ac. Ascórbico

2.5. FUENTES DE LA VITAMINA C.

Desde hace tiempo, se ha demostrado que las fuentes naturales de esta vitamina son las frutas frescas y los vegetales. Los cereales y las legumbres secas no la contienen. Las semillas secas, están desprovistas de ésta, pero si se pone a germinar se sintetiza en ellas la vitamina.

En la tabla 1 de composición de alimentos, contiene datos sobre la cantidad de vitamina C en mg. contenida en 100g de porción comestibles (P.C.).

TABLA 1.

VERDURAS			
Alimento	mg vit C por 100g P.C.	Alimento	mg vit C por 100g P.C.
Acelga	34	Aguacate	17
Aji fresco	91	Aji seco	32
Ajo	9	Alcachofa de Jerusalén	6
Alfalfa, brotes tiernos	162	Apio silvestre	8
Berenjena	5	Berro	44
Bersa común	125	Bledo	109
Calabaza China	27	Calabaza tierna	46
Cebolla madura	10	Cebolla tierna	74
Cilantro	75	Col de Brusselas	82
Col China	24	Col común	43
Coliflor	82	Chayote	20
Epazote	11	Escobella	90
Espárrago	8	Espinacas	46
Frijol	26	Garambullo, flor de	40
Guandú	49	Haba	28
Hierbabuena	64	Jengibre	2
Jicama	21	Lechuga	7
Lenteja de agua	5	Maguey	59
Mora	61	Mostaza	62
Nabo	126	Nopal	16
Orégano	12	Papaya	14
Papas con cáscara	20	Papas sin cáscara	16
Pepino	14	Perejil	146
Pimienta	69	Quelite	--
Tomate maduro	23	Tomate verde	18
Rábano (hojas)	122	Rábano raíz	28
Verdolaga	23	Zanahoria entera	5

FRUTAS			
Alimento	mg vit C por 100g P.C.	Alimento	mg vit C por 100g P.C.
Albaricoque	10	Plátano amarillo	15
Plátano verde	31	Caña de azúcar	2
Capulín	13	Cereza	15
Ciruela	6	Coco	4
Chico-zapote	15	Chirimoya	17
Dátil semiseco	1	Durazno cáscara	28
Durazno sin cáscara	17	Fresa	70
Granada	8	Grosella	4
Guanábana	30	Guayaba entera	218
Guayaba pulpa	72	Higo maduro	4
Lima	40	Limón	51
Mamey	16	Mandarina	33
Mango maduro	53	Melón	29
Membrillo	17	Naranja jugo en agua	42
Naranja dulce fruta	59	Naranja dulce jugo	53
Papaya madura	46	Sandía	5
Toronja	43	Tuna	22
Uva	17	Zapote negro	29
Zarzamora	18		
CARNES			
Alimento	mg Vit C por 100g P.C.	Alimento	mg vit C por 100g P.C.
Higado de conejo	20	Higado de res	11
Higado de carnero u oveja	18		

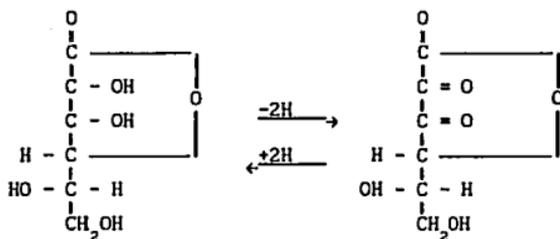
CEREALES			
Alimento	mg vit C por 100g P.C.	Alimento	mg vit C por 100g P.C.
Almidón de maíz	00	Arroz	00
Harina de arroz	00	Avena	00
Cebada	Tr.	Centeno	(0)
Maíz, masa, tortilla	(0)	Pan	0
Sorgo grano	0	Trigo	(0)

- Acido Ascórbico reducido.
- Indica falta de información.
- () Denota "valor imputado."
- Tr. Significa una cantidad de nutrimentos que, por lo reducido, no merece ser medida con exactitud ¹⁷.

2.6. FARMACOLOGIA.

El ácido ascórbico no posee grupo carboxilo y sus propiedades ácidas se deben al grupo hidroxilo enólico en el carbono 3, cuyo hidrógeno es reemplazado por el metal de la sal sódica. La estructura química de ácido ascórbico se parece a la de un monosacárido. Posee un anillo lactónico y dos carbonos asimétricos en las posiciones 4 y 5, por lo que tiene actividad óptica; siendo la forma L (levógira) biológicamente activa. La forma D (destrógira) es inactiva, establecido por Grisould en

La vitamina C se oxida fácilmente pasando a la forma deshidrogenada, siendo ambas formas fisiológicamente activas y encontrándose las dos en los líquidos del cuerpo. El grupo enediol del ácido ascórbico, que es el que pierde hidrógeno para producir la forma deshidrogenada como puede verse en las fórmulas en la fig. 1, es el radical que puede estar relacionado con el funcionamiento de esta vitamina.



Acido ascórbico (forma reducida)

Acido deshidroascórbico

Fig. 1 Oxidación de la vitamina C

2.6.1. Absorción, distribución y excreción del ácido ascórbico.

El ácido ascórbico se absorbe casi totalmente en el tracto intestinal como lo prueba la ausencia de cantidades apreciables de la sustancia en las heces, en problemas digestivos como la diarrea, se ve disminuida la absorción y parece ser que en el tubo gastro intestinal se destruyen cantidades variables de ácido ascórbico especialmente en la clorhidria.

Después de absorbido el ácido ascórbico se le encuentra en la sangre en notables cantidades. Normalmente le contiene tanto el suero como los glóbulos sanguíneos, durante el proceso de absorción, la cantidad de ácido ascórbico es mayor en el suero que en los glóbulos, pero una vez acabada ésta, la mayor cantidad es intracelular. Por eso en el análisis del ácido ascórbico en sangre, la concentración resulta ser más estable⁴.

Las concentraciones mayores se encontraron en el tejido glandular y las menores en las grasas musculares y el tejido adiposo.

Básicamente se concentran en donde hay gran actividad metabólica como la hipófisis, glándulas suprarrenales, timo (en joven), hígado, cerebro, glándulas sexuales y tiroides (Sollman, 1957), el papel que desempeña el ácido ascórbico en las glándulas endócrinas no se conoce.

El ácido ascórbico es de gran importancia ya que pasa de la ingesta a la leche materna conteniendo esta 60 mg/l, por lo que debe suministrarse sistemáticamente ácido ascórbico o jugo de naranja a los niños alimentados con leche de vaca, ya que en comparación con la de vaca contiene 20 mg/l (Keeley, Neil, 1965).

Existe un umbral renal para el ácido ascórbico, que se excreta cada vez que la ascorbemia exceda el valor de 1.4mg/100ml. En los casos de deficiencia de esta vitamina, cuando los tejidos no están saturados, el nivel sanguíneo es bajo, la ingestión del ácido ascórbico no provoca casi excreción renal, pues los tejidos toman la vitamina e impiden la elevación del tenor sanguíneo, a la inversa de lo que sucede cuando existe saturación del organismo en que la ingestión de la vitamina C rápidamente llega a sobre pasar

Excreción: La vitamina C es metabolizada y destruida parcialmente en los tejidos, normalmente en un 50 a 70 % de la cantidad requerida, y el resto se excreta especialmente en la orina, donde la concentración máxima es de 3 a 6 horas después de la ingestión (Sollmann, 1957).

Toxicidad: A pesar de ser una de las vitaminas menos tóxicas, se ha encontrado que produce diarrea, úlcera gástrica y efectos negativos en interacción con la Bleomicina (Antibiótico antineoplasma)¹⁸.

2.6.2. Requerimientos diarios del Acido Ascórbico.

Debido a que no existe un exceso de ácido ascórbico que se almacene en el organismo humano, deberá suministrarse regularmente.

En la tabla 2, se muestran los requerimientos de ácido ascórbico en la dieta diaria.

13
TABLA 2

	Vitamina C mg/día
Adultos	60-100
Prenatales	+ 20
Lactancia	+ 40
Fumadores de :	
Canadá	85
Francia	120
Nueva Zelanda	75

2.6.3. Papel fisiológico.

Aunque sin duda el ácido ascórbico interviene ampliamente en el metabolismo, no puede ser sintetizado por el hombre ni por otros primates. La vía de la biosíntesis en los animales es la urónica (que no es la misma que la de las plantas).

A los animales que son incapaces de sintetizar al ácido ascórbico, presumiblemente les falta el sistema enzimático necesario para convertir el ácido L-gulónico en ácido ascórbico. En este sentido el escorbuto puede ser considerado como el resultado de un defecto hereditario del metabolismo de los carbohidratos.

El estudio del ácido ascórbico marcado en varias posiciones con ^{14}C en ratas y cobayos se ha visto que el ácido ascórbico es ampliamente oxidable hasta convertirse en $^{14}\text{CO}_2$, que se elimina con la respiración. Sin embargo, esto no sucede con el hombre. En él, el ácido ascórbico desaparece lentamente, teniendo una vida media de aproximadamente 16 días, esto se correlaciona bien con el hecho de que se necesitan de 3 a 4 meses para que se presente

escorbuto en el hombre sujeto a una dieta que no contenga ácido ascórbico.

En el hombre la conversión del ácido ascórbico en oxalato, puede representar la mayor parte del oxalato urinario endógeno.

La deficiencia grave del ácido ascórbico produce el escorbuto. Casi todas las alteraciones patológicas de esta enfermedad por carencia, afectan casi exclusivamente a los tejidos conjuntivos de origen mesenquimatoso (huesos, dentina, cartilagos, musculos, refuerza la piel y los tejidos vasculares, conjuntivo laxo). El escorbuto se caracteriza por defecto en la formación y en el mantenimiento de las sustancias intercelulares,

lo que a su vez es causa de los síntomas típicos, tales como hemorragias, aflojamiento de los dientes, mala cicatrización de las heridas y huesos que pueden fracturarse fácilmente¹².

El papel funcional mejor conocido del ácido ascórbico es el mantenimiento de las sustancias intercelulares normales del cartilago, de la dentina y del hueso, como se mencionó anteriormente. Se han ido acumulando pruebas experimentales que asignan un papel específico al ácido ascórbico en la síntesis del colágeno⁴, especialmente en lo que se refiere a la síntesis de la hidroxiprolina a partir de un precursor de la prolina. Existen también varios trabajos que señalan una posible función del ácido ascórbico en los sistemas oxido-reducción, acoplado al glutatión, al citocromo c, a los piridín nucleótidos o a los flavín nucleótidos, se han encontrado niveles considerables en el TPN⁷. También se ha señalado que el ácido ascórbico interviene en la oxidación de la tirosina, en el metabolismo de los esteroides adrenales y en el de diversos medicamentos.

Como también puede hacer efectos de los fármacos sobre la biodisponibilidad de ácido ascórbico, así como también en otros

nutrientes. Solm y Menden, de la Universidad de Giessen (BRD), revisaron 1652 artículos publicados hasta 1981 sobre el efecto de los fármacos sobre la biodisponibilidad de nutrientes esenciales, en particular vitaminas y minerales. El objeto de la investigación era demostrar la importancia de considerar la posibilidad de una deficiencia de estos nutrientes inducida por fármacos.⁸¹

Los fármacos pueden obstaculizar la biodisponibilidad de los nutrientes induciendo náuseas, alterando el sabor, modificando el apetito y de aquí reduciendo la ingesta, y además al interferir con la absorción, distribución, metabolismo, o excreción.

Prácticamente todos los tipos de fármacos pueden afectar la biodisponibilidad de nutrientes, pero Solm y Menden escogieron siete grupos que consideraron podían afectar hasta cierto grado el nivel de minerales y vitaminas : son los anoréxicos, los antiácidos y otros agentes anti-úlceras; los diuréticos los agentes uricosúricos, los laxantes, y los agentes que queman grasas. Así mismo la sulfipirazona eleva la eliminación de la vitaminas C.

El tratamiento médico crónico y la desnutrición o las condiciones que predisponen a una desnutrición, como la malignidad o la cirrosis, son factores de riesgo que agravan la insuficiencia nutritiva inducida por fármacos y que pueden determinar si la salud de un paciente está o no seriamente afectada por la carencia de nutrientes. Las personas de edad avanzada tienen un riesgo aún más alto, por la probabilidad de un consumo mayor de fármacos y por encortarse con un estado de nutrición menos adecuado que las personas jóvenes. Es mas, las actividades de las enzimas hepáticas disminuyen con la edad, así como la capacidad excretora de los fármacos. Los recién nacidos también presentan un riesgo

similar debido a la inmadurez de las enzimas que metabolizan los fármacos. Los médicos también deben tener en cuenta el riesgo de inducir una deficiencia de nutrientes al prescribir medicamentos a pacientes con síndromes de mala absorción, o condiciones que elevan los requerimientos de nutrientes específicos, tales como anemia hemolítica, dermatitis herpetiforme, o psoriasis²⁰.

Puede haber efectos de fármacos sobre la biodisponibilidad de la vitamina C así como también en otros nutrientes (ver tabla 3).

TABLA 3.⁸¹

GRUPO DE FARMACOS QUE PUEDEN AFECTAR LA BIODISPONIBILIDAD DEL ACIDO ASCORBICO.

Agenteanalgésicos/antiinflamatorios
Anorexos
Antibióticos
Anticovulsivos
Anticoceptivos (orales)
Glucocorticoides
Agentes psicotrópicos
Hipnóticos
Sulfonamidas
Laxantes
Uricosúricos

La corteza adrenal contiene gran cantidad de ácido ascórbico, que desaparece rápidamente cuando la glándula es estimulada por la hormona adrenocorticotrópica. Un agotamiento semejante del ácido ascórbico de la corteza adrenal se observa cuando se inyectan animales de experimentación (cobayos) con grandes cantidades de toxina diftérica. También se pierde ácido ascórbico con las infecciones y con la fiebre, especialmente cuando existen toxinas bacterianas. Todas estas observaciones sugieren que el ácido ascórbico puede tener un papel importante en la relación del organismo ante el estrés.

En otro de los procesos que se requiere la vitamina C; interviene para un apropiado funcionamiento de los leucocitos. Los leucocitos luchan contra las infecciones englobando y matando a las bacterias por el proceso llamado fagocitosis. La vitamina C mejora la movilidad de los leucocitos, por esto penetran rápidamente en los sitios de infección.

Existen evidencias de que la vitamina C mejora la inmunidad⁴². Así como interviene en la absorción del hierro, del que es más fácil de asimilar cuando proviene de la carne, pero en la dieta diaria la cantidad de carne es mínima. El hierro es esencial para producir y mantener la hemoglobina, el componente de los eritrocitos que lleva a todas partes del cuerpo el oxígeno¹⁰.

2.6.3.1. Patología de los radicales libres y su prevención con vitaminas antioxidantes.

La vitamina C se emplea en la profilaxis de las enfermedades así como también el betacaroteno, y la vitamina E.

La llamada cadena respiratoria en las mitocondrias, es una forma efectiva que ha encontrado la naturaleza para sacar provecho de los enlaces de hidrógeno ricos en energía. Sin embargo, en este proceso vital para la producción de energía la naturaleza no puede prevenir la formación de los radicales libres^{21,22}.

Los radicales libres son compuestos altamente reactivos y tóxicos al encontrarse en exceso. Entre los componentes más importantes del organismo que pueden ser dañados por los radicales libres podemos mencionar a los ácidos nucleicos y a las estructuras de las membranas celulares^{23,24}.

PRECURSORES DE RADICALES LIBRES

Radicales libres: Compuestos químicos con uno o más electrones desapareados moléculas altamente reactivas que pueden causar daños al generar radicales libres.	$\left\{ \begin{array}{l} O_2^- \text{ Anión Superóxido} \\ OH \text{ Radical Hidroxilo} \\ ROO \text{ Radical Peróxido} \\ 1 O_2 \text{ Oxígeno Singlete} \\ H_2O_2 \text{ Peróxido de Hidrógeno} \end{array} \right.$
--	---

Bajo condiciones normales, el cuerpo no sólo forma radicales libres en la cadena respiratoria. Otras reacciones bioquímicas en las cuales interviene el oxígeno, o las prostaglandinas²⁵ y la fagocitosis²⁶ también son fuentes de radicales libres. Además, las radiaciones, ionizantes, los contaminantes ambientales (NO_2 , NO , O_3 , SO_2) y ciertos fármacos y compuestos tóxicos también pueden generar radicales libres²⁷.

Sin embargo, bajo condiciones fisiológicas el organismo humano puede prevenir el daño producido por los radicales libres a través de sus mecanismos de protección, los cuales incluyen algunas enzimas, tales como: catalasa, dismutasa de superóxido y la peroxidasa de glutatona. Estas enzimas son capaces de catalizar las reacciones que transforman a los radicales libres y a sus precursores en sustancias inocuas. Los antioxidantes hidrosolubles (Vitamina C, Glutatona, Acido Úrico) y los liposolubles (Betacarotenos y vitamina E) también protegen al organismo. Estos compuestos actúan ya sea atrapando y, de este modo, neutralizando los radicales libres o protegiendo los tejidos vivos del daño producido por el ataque de los radicales libres. A continuación se menciona el tipo de defensa que aporta en nuestro caso la Vitamina C.

DEFENSA ANTIOXIDANTE CONTRA LOS RADICALES LIBRES ²⁸.

Vitamina C : {
- Elimina el radical hidroxilo.
- Estabiliza el anión superóxido
- Elimina el oxígeno singlete.

Se sugiere que la necesidad del organismo de protección de los radicales libres aumentan bajo ciertas condiciones ambientales o físicas. Las reacciones enzimática de protección en las células no pueden aumentar más allá de su nivel óptimo. Sin embargo, la ingesta de vitamina C se puede ajustar a las necesidades.

Problemas de salud asociados al daño por radicales libres.

Existen evidencias recientes que demuestran que los radicales libres intervienen en la generación de: cáncer, enfermedades isquémicas al corazón y arterioesclerosis ^{27, 29, 30, 31, 32}. Además,

se pone énfasis en que los radicales libres están involucrados con el desarrollo de la artritis, la formación de las cataratas³³, con la retinopatía y en general con el envejecimiento y los problemas relacionados con la edad³⁴.

En la actualidad está aumentando la literatura científica y el número de ensayos clínicos que se están realizando para dilucidar el efecto de los antioxidantes en la prevención de las enfermedades. Al mismo tiempo, las autoridades se están volviendo más conscientes del valor de los micronutrientes en la prevención de ciertas enfermedades, tal como ocurre con el Instituto Nacional del Cáncer en Estados Unidos.

2.6.3.2. La Vitamina C en las principales enfermedades mortales.

En la tabla 4 se muestran los porcentajes de muertes por enfermedades cardiovasculares y cáncer en algunos países del mundo.

TABLA 4

País	Año	Causas de Muerte %	
		Enfermedades Cardiovasculares	Cáncer
Finlandia	1979	53.6	20.7
Alemania Occidental	1981	50.8	22.0
Estados Unidos	1982	50.3	21.1
Reino Unido	1981	49.5	22.5
Nueva Zelanda	1980	48.7	20.5
Sulza	1981	48.0	25.5
España	1979	46.1	19.6
Argentina	1979	44.2	17.2
Japón	1981	42.6	23.1
Francia	1980	37.4	22.7
Italia	1981	47.1	22.9
México*	1988	45.53	35.72

Fuente : Estadística de la salud mundial, OMS, 1983.

* Estadística de egresos hospitalarios, IMSS, 1988.

Es alarmante apreciar que cerca del 70% de los humanos son víctimas de las enfermedades cardiovasculares y del cáncer. Por lo tanto, es lógico centrar la atención en estas dos enfermedades.

En la actualidad, el Instituto Nacional del Cáncer en Estados Unidos está apoyando un impresionante número de estudios relacionados con el betacaroteno y con las vitaminas E y C, lo cual pone de manifiesto la gran prioridad que se está dando a estos micronutrientes³⁵.

Estudios epidemiológicos asocian a la concentración de vitamina C en el plasma con la protección frente al cáncer de estómago y cervix (displasia)^{36,37,38}.

Se ha demostrado que la Vitamina C bloquea eficientemente la formación de las nitrosaminas cancerogénicas. Por lo tanto es de esperar que la vitamina C proteja contra las reacciones entre los nitritos agregados a ciertos alimentos y las aminas contenidas en forma natural en la dieta^{30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40}. Recientemente se demostró que la vitamina C previene la formación de las nitrosaminas a partir de las aminas nitrosables encontradas en nuestro ambiente⁴¹.

Experimentos con animales y cultivos de células indican que la vitamina C puede interferir con los promotores de tumores⁴².

2.6.3.3. Arteriosclerosis y enfermedades isquémicas al corazón.

Los estudios epidemiológicos muestran una relación inversa entre los niveles de Vitamina C y Vitamina E en el plasma y las enfermedades cardiovasculares.

En una comparación cultural cruzada se encontró que las personas que viven en países que tienen una alta incidencia de mortalidad por enfermedades cardiovasculares tienen niveles bajos de Vitamina E y C, menores en plasma, a los que viven en países con una baja incidencia de mortalidad⁴³. Estos resultados implican una fuerte relación entre la incidencia de enfermedades cardiovasculares y los nutrientes antioxidantes.

Se acepta ampliamente que las lesiones en la pared interna de los vasos sanguíneos, pueden representar un primer paso en la cascada de eventos que conducen a la formación de la placa arterio esclerótica (agregación de las plaquetas, proliferación de las células musculares, depósito de colesterol a través de las lipoproteínas de baja densidad, etc.). El estrechamiento resultante del lumen de los vasos sanguíneos pone en riesgo el suministro de oxígeno al tejido afectado y en el caso de las arterias coronarias, es probable que este desorden conduzca a una enfermedad isquémica al corazón. Se piensa que las lesiones de la pared interna de los vasos sanguíneos son producidos por una presión sanguínea alta y por compuestos tóxicos.

Existen evidencias experimentales que sustentan el concepto de que los antioxidantes están involucrados en la integridad fisiológica del sistema cardiovascular, así como el limitar la amenaza de riesgo para la vida en las situaciones patológicas producidas por las enfermedades isquémicas al corazón^{45,46}.

La acción benéfica de los antioxidantes puede incluir: Suspropiedades de eliminar radicales libres y de estabilizar las membranas celulares que permiten prevenir el posible daño a las células de endotelio.

En personas de 60 a 69 años se ha encontrado que niveles altos de vitamina C en la sangre se correlacionan en forma positiva con niveles altos de colesterol asociados a lipoproteínas de alta densidad⁴⁶. Dado que no se aumentó el colesterol total, se concluye que se redujo el colesterol asociado a las lipoproteínas de baja densidad que está involucrado en la generación de las placas arterioscleróticas.

El posible efecto reductor del daño que ejercen los antioxidantes en situaciones patológicas, tal como isquemia miocárdica silenciosa, puede tener una importancia crucial para reducir la mortalidad. Según una descripción reciente, la isquemia miocárdica silenciosa se define como una alteración transitoria del suministro de sangre al miocardio, lo cual produce un disturbio en su función y en su actividad eléctrica, sin que se produzca el típico dolor de pecho⁴⁷. Se considera que la isquemia silenciosa es una etapa primaria de malignidad, seguida a menudo por una falla cardíaca severa.

2.6.3.4. El estilo de vida y la Vitamina C.

El tabaquismo y el alcoholismo reducen los niveles de ácido ascórbico en el organismo. Se ha observado que los fumadores tienen niveles de Vitamina C, en el plasma, considerablemente menores a los no fumadores⁴⁸.

Los alcohólicos crónicos generalmente están mal nutridos debido a la ingesta inadecuada de nutrientes, incluyendo a las vitaminas.

Algunas condiciones ambientales, tales como aumento de la exposición a las irradiaciones UV o a los contaminantes, así como el consumo de ciertos alimentos, por ejemplo; la carne ahumada, también puede producir un aumento de la demanda de ácido ascórbico así como también de otros antioxidantes.

Asumiblemente, existen evidencias de que el ejercicio físico puede aumentar las necesidades del A.A., como los demás antioxidantes.⁴⁹

2.6.3.5. Combinación de la Vitamina C y otros antioxidantes.

o Existe evidencia " in vitro " de que hay un efecto sinérgico entre las propiedades antioxidantes de las Vitaminas E y C.⁵⁰

o Experimentos " in vitro " han demostrado que la Vitamina C es capaz de regenerar a la Vitamina E.⁵¹

o Se ha demostrado que la Vitamina C produce un efecto de ahorro de selenio⁵²; este es un componente de la peroxidasa de glutatión, enzima importante en el mecanismo de defensa a los radicales libres.

o Las investigaciones de laboratorios sugiere que el betacaroteno, las vitaminas E y C tienen distintos mecanismos de acción en la profilaxis del cáncer y de las enfermedades cardiovasculares.

2.6.3.6. Prevención de formación de compuestos N-nitrosos por medio de la vitamina C.

Los compuestos N-nitrosos reconocidos cancerígenos. Pueden ingerirse enteros con el alimento, o pueden ser sintetizados por el organismo. La aclorhidria o la hipoclorhidria favorece la invasión bacteriana y de esta forma promueve la formación de uno de los precursores de los compuestos N-nitrosos. Se piensa que esta es la razón de la alta frecuencia de cáncer gástrico en pacientes con un elevado pH gástrico, por ejemplo, los sujetos que

han sido sometidos a una gastrectomía o una vagotomía, los que sufren de una anemia perniciosa, o los que padecen de gastritis atrofica crónica. Actualmente se cuenta con la evidencia de que la vitamina C reduce la formación de compuestos N-nitrosos en pacientes con gastrectomía.

Los compuestos N-nitrosos se forman por la combinación de nitritos con una substancia que contenga nitrógeno, como la urea, una amida, o más comúnmente, una amina; las nitrosamidas son el tipo prevaeciente de compuestos N-nitrosos. La reacción, conocida como nitrosación, tiene lugar perfectamente en un pH ácido, pero también puede desarrollarse en un pH neutro. Las aminas se encuentran en abundancia en los alimentos y fármacos más comunes. Los nitritos se encuentran naturalmente hasta cierto grado en alimentos, pero a menudo se adicionan a los productos cárnicos para evitar el desarrollo de Clostridium botulinum. El nitrito, sin embargo, se forma en su mayor parte por la reducción del nitrato.

2.7. Usos clínicos del Acido Ascórbico.

Cancerología : Actúa sobre efectos mutagénicos, previene el cáncer intestinal.

Cardiología : Actúa sobre los niveles altos de colesterol y lípidos totales.

Psiquiatría : Se emplea para el tratamiento enpacientes maniáticos depresivos, tiene acción sobre el stress.

Medicina interna : Escorbuto, anorexias, dolores musculares, predisposición a las infecciones.

Parasitología : Antimalaria

- Convalecencia: Manifestaciones alérgicas, fragilidad capilar, úlceras gástricas y duodenal, afecciones reumáticas.
- Cirugía : Mala cicatrización de las heridas, quemaduras.
- Ginecología y Obstetricia: Embarazo y lactancia (Menorragias).
- Pediatría : Escorbuto infantil (enfermedades Moller Baslow).
- Oftalmología : Afecciones corneales, hemorragias oculares.
- Dermatología : Hemorragias cutáneas -Púrpura- Sudamina.
- Odontología : Gingivitis, Estomatitis piorrea, hemorragias gingivales, retraso en la cicatrización de heridas.
- Inmunología : Tiene efectos sobre la inmunidad celular humoral en niños asmáticos.
- Otorrinolaringología : Epixtasis, tratamientos de las hemorragias en las intervenciones; otorrinolaringológicas.

2.8. Métodos analíticos para la determinación del ácido ascórbico en muestras biológicas.

A través de la última década, han aparecido numerosas publicaciones donde se describen análisis de ácido ascórbico en muestras biológicas. La división de la química de los carbohidratos, en 1980, durante el Segundo Congreso Químico, un simposio sobre el ácido ascórbico, su química, metabolismo y usos.

En este simposio, Sauberlich y colegas, presentaron un trabajo que discutía las ventajas de los métodos de cromatografía de líquidos (LC) sobre los métodos espectroscópicos⁵¹, los métodos enzimáticos se les ha dedicado ya, una sección, en un volumen reciente, para determinación del ácido ascórbico⁵².

Este resurgimiento con nuevos procedimientos analíticos resulta de la importancia de esta vitamina en los estudios nutricionales, en muestras biológicas.

	Métodos cromatográficos.
	Métodos enzimáticos.
Métodos de análisis.	Métodos electroquímicos.
	Método por espectroscopía.

2.8.1. Métodos cromatográficos.

En comparación con los métodos de análisis por espectroscopía y electroquímica, se ha discutido que en estos métodos de análisis no se pueden distinguir, el ácido ascórbico del dihidroascórbico (DHAA), y el d-isoascórbico (IAA) también conocido como ácido eritórbito, u otros compuestos oxidables, este método de separación ha empleado una mayor selectividad de análisis. La técnica de cromatografía ha sido discutida en algunos detalles; ya que involucra a la cromatografía en papel y placa fina, cromatografía de gases, y la cromatografía de líquidos.

2.8.1.1. Cromatografía en papel.

Numerosos métodos de cromatografía en papel, han sido reportados para la determinación cuantitativa y cualitativa del ácido ascórbico. De Ritter ha revisado estos procedimientos⁵³.

Uno de los métodos iniciales de la cromatografía en papel, trató de la identificación adecuada del ácido ascórbico, empleando reactivos y solventes como eluyentes. Mapson, reportó la primera separación cualitativa del ácido ascórbico y el ácido dihidroascórbico⁵⁴. Por medio de una solución amoniacal de nitrato de plata fría, fue identificado por pruebas organolépticas, la presencia del ácido ascórbico y se determinó la presencia del ácido dihidroascórbico después de calentarlo.

El método reportado por Mitchell y Petterson⁵⁵ fue empleado para la determinación del ácido ascórbico, en la orina de humanos. En este método se empleó el 2,6-Diclorofenol-Indofenol para la medición del ácido ascórbico y el ácido eritórbico, después de aislar cada compuesto por el método cromatográfico en papel; se obtuvo una recuperación del 101% y 108% fue reportado en la orina de rata⁵⁶.

2.8.1.2. Cromatografía en capa fina.

Esta técnica ha sido más empleada que la cromatografía en papel para la cuantificación del ácido ascórbico. Por ejemplo, Saari y col., estudiaron la oxidación del ácido ascórbico usando ¹⁴C empleándose un densímetro y un detector radiográfico⁵⁷.

Esta fina determinación del ácido ascórbico, muestra un interesante y atractiva renovación en los próximos años de avance de esta técnica de separación incluye el incremento de la sensibilidad y resolución, habilidad para correr al mismo tiempo cromatogramas en paralelo, capacidad del empleo del densímetro y el detector fluorométrico.

Lyle y Tehrani⁵⁹ describieron otro método de cromatografía en placa fina, que involucra la pirólisis; se coloca directamente en la zona de capa fina, una flama ionizante en una cromatografía de gas, este método fue lineal entre el rango de 0.2-3.0 mcg de ácido ascórbico.

2.8.1.3. Cromatografía de gases.

El descubrimiento y aplicación de la cromatografía de gas para el análisis de huellas orgánicas, produce dramático mejoramiento en sensibilidad y selectividad. La conductividad térmica y el detector de flama fueron el mejor avance, desafortunadamente, los compuestos polares, como es el mismo ácido ascórbico, no puede ser fácilmente analizado por esta técnica.

Sweet et al.⁶⁰ reportaron la primera técnica por cromatografía de gas para el análisis del ácido ascórbico.

2.8.1.4. Cromatografía de líquidos.

La cromatografía de líquidos (CL) ha sido empleada extensamente para el análisis del ácido ascórbico. Esta técnica combina alta selectividad y sensibilidad con un rápido análisis de muestreo y no requiere de derivatización. Un mínimo de revistas

han aparecido recientemente en las cuales mencionan el método CL para el análisis del ácido ascórbico⁶¹. Se realizó en fluidos biológicos, en suero, plasma y leucocitos de humanos, la determinación del ácido ascórbico por el uso invertido de la parte iónica CL con una detección amperométrica⁶². Las muestras fueron desproteínadas antes de analizarse, se recobró un 97-100% entre un rango de 0.1-5.0 mcg/ml. Muchas drogas comunes y metabolitos no interfieren en este análisis.

2.8.2. Método electroquímico.

La oxidación eléctrica del ácido ascórbico a un electrodo es irreversible, EC el tipo de los electrodos⁶³ involucra la pérdida de $2e^-$ y $2H^+$ para formar el ácido dihidroascórbico. Este producto reacciona rápidamente por una vía de hidratación para formar el ácido dikitogulónico. El ácido ascórbico tiene una diferencia electroanalítica rápida pero un promedio constante con muchos tipos de electrodos. Por lo que da como resultado una serie de métodos electroanalíticos. Estos procedimientos están basados en las técnicas dinámicas electroanalíticas y ha sido evaluado por muchos años⁶⁴.

2.8.3. Método enzimático.

El primer método enzimático empleado para la determinación del ácido ascórbico, se confió en el aislamiento de la enzima del material fabricado. Se han reportado pocas prácticas empleando este método para la determinación del ascorbato, pero la enzima no fue comercialmente aprovechable. Lee y Dawson⁶⁵ presentaron un profundo reporte sobre el aislamiento y caracterización sobre la

oxidación del ascorbato. Un procedimiento enzimático para la cuantificación del ácido ascórbico en jugos de frutas ha sido reportado⁶⁶ y está basado en la diferencia de la absorbancia antes y después de la incubación. El método obtuvo resultados satisfactorios y fue lineal entre 1 y 10 mcg/ml, con un promedio recobrado de $98 \pm 0.8\%$. Para obtener una mayor sensibilidad y para estabilizar la enzima, se incubó por 30 min. a una temperatura de 30°C ⁶⁷. Este proceso tiene resultados comparables en aquellos donde se usan los indicadores, 2,6-diclorofenol-indofenol o 2,4-dinitrofenilhidrazina.

Rescientemente, Liu y col. han aprovechado comercialmente el uso de la oxidación del ácido ascórbico para desarrollar un adecuado método para tratar muestras clínicas de suero y plasma⁶⁶. En este procedimiento, la cuantificación del ácido ascórbico es específica por el tratamiento de una de las muestras del par hecha por la enzima, pero la muestra se hace reaccionar con fierro II y el reactivo complejométrico 2,4,6-tris, (2 piridy)-S-triazina. La diferencia en la absorbancia 593 nm de estas muestras, es proporcional por la original concentración del ácido ascórbico. El método fue lineal entre 0.01 y 0.10 mg/ml y tuvo una precisión de 2.8%. La mejor ventaja del método fue:

- 1) En presencia de compuestos endógenos en las muestras biológicas no hubo interferencia.
- 2) Fue innecesaria la desproteinización de la muestra.
- 3) El procedimiento es completo en 25 min. con una rutina de laboratorio clínico.

2.8.4. Método por espectroscopía, empleando 2,6-Diclorofenol-indofenol (DCIP).

La primera aplicación del DCIP en el análisis del ácido ascórbico, se reportó en 1932 por Tillmans y col⁶⁹. Después de numerosas modificaciones, el método todavía consiste en el monitoreo de la absorbancia del DCIP a 518 nm antes y después de la adición de la muestra. Otra forma de mejorar la especificidad, comprende el seguimiento de la cinética de reacción entre la vitamina y el DCIP. Hiromi y coautores, usaron la relación lineal entre la constante aparente de velocidad de primer orden para la reducción del indofenol para determinar la concentración del ácido ascórbico^{70,71}. La reacción del ácido ascórbico en exceso con DCIP fue lineal entre 0.50-50 mcg y se puede realizar para el análisis del jugo de naranja.

2.8.4.1. Iones metálicos.

Otra clase de reacciones redox colorimétricas comprenden la reducción de los iones metálicos para provocar una solución colorida estable. Por ejemplo, el ácido ascórbico puede ser determinado en las preparaciones farmacéuticas usando ferrocianuro de potasio⁷² Pelizzeti y col.,^{73,74} han reportado la cinética y los mecanismos entre el ácido ascórbico y muchos complejos oxidantes de metales iónicos útiles potencialmente.

La mayoría de los métodos redox de un ión metálico, comprenden la reducción de Fe (III) a Fe (II) por la vitamina. Se forma un complejo de Fe (II) intensamente coloreado después de la adición de un agente quelante, la absorbancia es monitoreada en la absorción máxima del complejo y es directamente proporcional a la concentración del ácido ascórbico; los agentes quelantes más comunes del Fe(II) son:

α, α' -Dipiridina
2,4,6,-Tripiridil-S-Triazina (TPZ)
Ferrocina

Zannoni y col. han publicado un micrométodo para la determinación del ácido ascórbico en plasma y muestras de tejido⁷⁵. Este proceso detecta cantidades de 0.1 mcg de ácido Oscórbico y requiere 0.01 ml de muestra. El complejo es estable al menos por 2 horas.

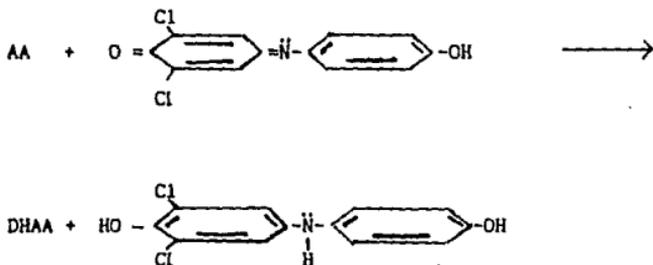
Okamura reportó un procedimiento para la determinación simultánea de los ácidos ascórbico y dihidroascórbico en el plasma^{76,77}. En ambos procedimientos el ácido dihidroascórbico es reducido a ácido ascórbico con ditiotreitól, las concentraciones de ascorbato y del dihidroascorbato son determinadas por diferencias, se hace necesario la precipitación del Fe a partir de la muestra de orina y tratado con carbón activado para remover las sustancias interferentes. Se encontró una excelente similitud entre este procedimiento y un método con dinitrofenilhidracina.

CAPITULO III

PARTER EXPERIMENTAL

El reactivo redox estándar usado para el análisis del ácido ascórbico en una variedad de tipos de muestras, es el 2,6-diclorofenolindofenol (DCIP) las soluciones del reactivo son azules a pH 7 y rosa en ácido. La estequiometría de la reacción redox fué propuesta primero por Tillmans, la reacción es rápida y de primer orden, la constante de velocidad total fue de segundo orden, dependiendo del pH, con un valor óptimo de 56.5×10^3 l/mol/s a pH bajo^{78,79}.

La primera aplicación del DCIP en el análisis del ácido ascórbico, se reportó en 1932 por Tillmans y col., Después de numerosas modificaciones el método todavía consiste en la determinación de la absorbancia del DCIP a 518 nm antes y después de la adición de la muestra.



Se determinó la longitud de onda de máxima absorción, tanto a la solución blanco como a las soluciones resultantes en sangre y plasma después de la extracción⁶⁸ (Ver figs. 1,2,3.).

3.1. Método analítico para la determinación del ácido ascórbico en plasma y sangre.

REACTIVOS :

- Acido metafosfórico HPO_3
Baker Analyzed Reactivo.
No. Lote 4247703.
- Acido ascórbico.
Merck pro-analysi.
NO. Lote 5250091.
- Acido fórmico.
Merck pro-analysi.
- Acido sulfúrico 95-97%
Merck grado reactivo.
No Lote 589537 N.
- Bicarbonato de sodio.
Baker reactivo analítico.
No. Lote 3506.
- 2,6-Diclorofenol-Indofenol.
Aldrich Chemical Company, Inc.
No. Lote 11981-4.

EQUIPO :

- Espectrofotómetro UV/VIS.
Beckman Modelo DU-50.
- Centrifuga IEC NH-SII.
Marca Damon/IEC División.

SOLUCIONES :

- Solución recién preparada de ácido metafosfórico al 10%.
- Solución indicadora de 2,6-Diclorofenolindofenol. Pesar 13 mg del indicador y 2.1 mg de bicarbonato de sodio y llevar a 100 ml con agua.

PROCEDIMIENTO :

Se extrae 5 ml de sangre venosa y se colecta en un tubo que contenga aproximadamente 140 UI de heparina. En un tubo de ensaye de 13x100 mm se coloca 1 ml de sangre se le adiciona gota a gota con agitación continua por 30 seg. 1 ml de solución de ácido metafosfórico al 10% y posteriormente se centrifuga a 2500 rpm, durante 6 minutos, se separa el sobrenadante y se vuelve a centrifugar bajo las mismas condiciones. Se toma una alícuota de 1 ml. de sobrenadante y se adiciona 1 ml de solución indicadora y se lee inmediatamente (no más de 1 min), en el espectrofotómetro, a una longitud de onda del visible de 518 nm.

Se prepara un blanco con agua destilada y la lectura de la muestra se corrige por diferencias con el blanco.

3.2. Validación y optimización del método.

3.2.1. Linealidad del sistema.

Para determinar la linealidad del método, se prepararon 7 curvas patrón de ácido ascórbico en medio acuoso en el intervalo de concentración de 5-100 mcg/ml. El criterio para establecer la concentración de la curva patrón se basó en las concentraciones reportadas de ácido ascórbico en plasma y sangre⁸⁰ (ver cuadro y gráfica 1).

3.2.2. Precisión del método.

Para determinar la precisión del método se analizaron 6 muestras el mismo día, tanto de sangre como de plasma, empleando plasma envejecido para evitar variaciones del A.A. (Ver los cuadros 2,3.)

3.2.3. Precisión del sistema.

Para determinar la precisión del sistema, se prepararon soluciones de ácido ascórbico en medio acuoso, las cuales fueron de 50,25,12 mcg/ml. Se analizaron 6 muestras de cada nivel de concentraciones por día, (ver tabla 5)

Para cada nivel de concentración se tomó una alícuota de 1 ml de las soluciones preparadas, se le adicionó 1 ml de HPO_3 al 10%, adicionándole 1 ml de solución indicadora, leyendo inmediatamente (no más de 1 min) a una longitud de onda de 518 nm, corriendo al mismo tiempo un blanco para hacer las correcciones necesarias.

3.2.4. Análisis de reproducibilidad de la cinética del ácido ascórbico en agua.

El análisis tiene como objeto, la determinación de la vida media del ácido ascórbico, en solución acuosa a 37 °C y la precisión de dicha cinética.

Procedimiento :

Se preparó una solución de ácido ascórbico en agua conteniendo 10 mcg/ml. En un vaso de precipitado de 100ml, se colocaron 20 ml de la solución calentando a baño maria a 37 °C al abrigo de la luz. Se tomaron muestras de 1 ml a los siguientes tiempos : 0, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5 y 6 horas. A cada una de estas muestras se le adicionó 1 ml de ácido metafosfórico al 10% e inmediatamente se introdujo a un frasco con agua fría. Este procedimiento se siguió en cada uno de los tiempos, hasta el momento de obtener la última muestra; se adicionaron 2ml del indicador DCIP y se tomó la lectura al mín, se corrió a la vez un blanco con el cual se hicieron las correcciones necesarias. Esta prueba se realizó en siete ocasiones en diferentes días. (ver tabla 6)

3.2.5. Exactitud del método en sangre.

Para determinar la exactitud del método en sangre; Se obtuvieron 30 ml de sangre venosa conteniendo 140 UI de heparina aproximadamente por cada 10 ml de sangre. Se preparo un estandar de 1000mcg/ml ; pesando 10 mg de ácido ascórbico, diluyendo con la mínima cantidad de agua y llevando a un volumen de 10 ml con sangre venosa.

Utilizando una pipeta automatica de volúmen variado se le adicionaron a muestras de 1 ml de sangre venosa volúmenes de la solución estandar preparada para obtener así las siguientes concentraciones teoricas por triplicado: 20, 25, 30, 35, y 40 mcg/ml de ácido ascórbico.comparandolas contra una muestra de sangre sin estandar. Siguiendo la seccion 3.1.(ver tabla 7 y gráfica 3)

3.2.6. Exactitud del método en plasma.

Se emplearon 70 ml de plasma envejecido de los cuales se tomaron 50 ml para disolver 50 mg de ácido ascórbico, obteniendo una solución de 1mg/ml, se tomó 1 ml de la solución obtenida y se llevó a 10 ml con plasma, obteniéndose una concentración de A.A. 100 mcg/ml a muestras de 1 ml se les adiciono por triplicado el volúmen necesarios para obtener conc. de 5, 10, 15, 20 y 25 mcg/ml de ácido ascórbico (ver tabla 8 y grafica 2).

3.2.7. Estabilidad del ácido ascórbico en muestras plasmáticas.

Para el estudio de estabilidad de ácido ascórbico en muestras plasmáticas se le extrajo a un voluntario, aparentemente sano y en ayuno, 70 ml de sangre venosa, la cual fue recolectada en 8 tubos de ensaye 13x100, conteniendo cada uno aproximadamente 140 UI de heparina, para un volúmen aproximado de 8 ml. Se mezcló suavemente la sangre con heparina para evitar una hemólisis y homogeneizar la muestra; para el estudio en plasma, se empleo plasma envejecido, en el cual adicionó aproximadamente 10 mcg/ml.

El análisis se realizó en distintos tiempos, los cuales fueron 0, 1, 2, 4, 8 y 24 hr. Trabajando 3 temperaturas que fueron 0 °C, y temperatura ambiente, para plasma y para sangre fue de 5 °C y temperatura ambiente, las muestras se analizaron por duplicado en cada tiempo señalado, tanto en sangre como en plasma. (ver tablas 9 y 10).

3.3. Determinación del ácido ascórbico en plasma y sangre de sujetos de diferentes edades.

El estudio se realizó en 83 sujetos aparentemente sanos, de 20 a 100 años de edad, se dividieron en 3 grupos, de los cuales, el primer grupo comprendidos entre los 20 y 30 años, el segundo de los 31 a los 50 y el tercero de los 51 años en adelante (ver tabla 11).

Se tomarán aproximadamente entre 5 y 7 ml de sangre venosa por voluntario en tubos de 13X100 heparinizados la cual se dividirá en tres tubos; los dos primeros contendrán alícuotas de 1 ml de sangre y el resto se utilizará para obtener el plasma, debiendo estar los voluntarios en ayuno, por lo que las muestras se analizarán como se describe en la sección 3.1.

CAPITULO IV

RESULTADOS

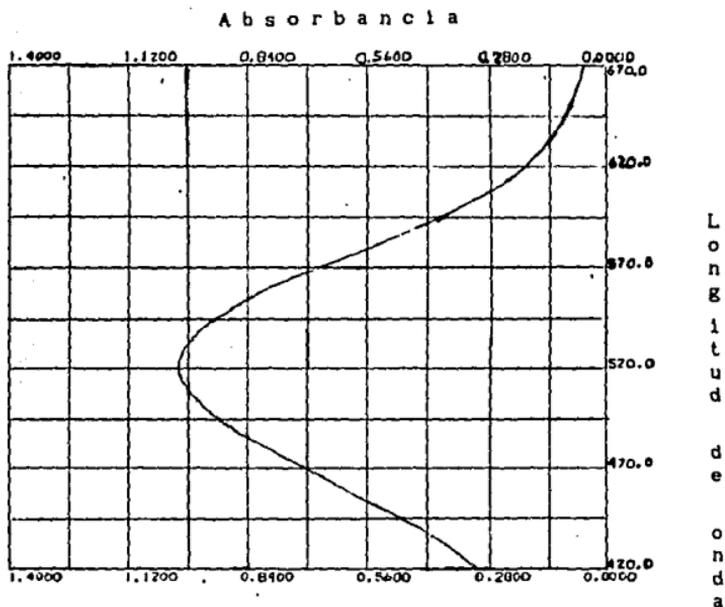


Fig. No. 1 Espectro de absorción para la solución del blanco de DCIP. Absorbancia por longitud de onda, de 420 a 670 nm.

Absorbancia

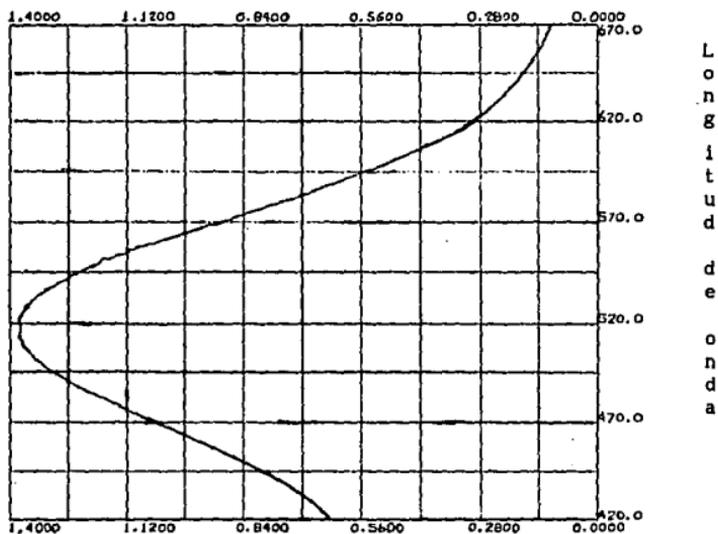


Fig.2 Espectro de absorción para la extracción en la muestra de sangre del DCIP. Absorbancia por longitud de onda, de 420 a 670 nm.

Absorbancia

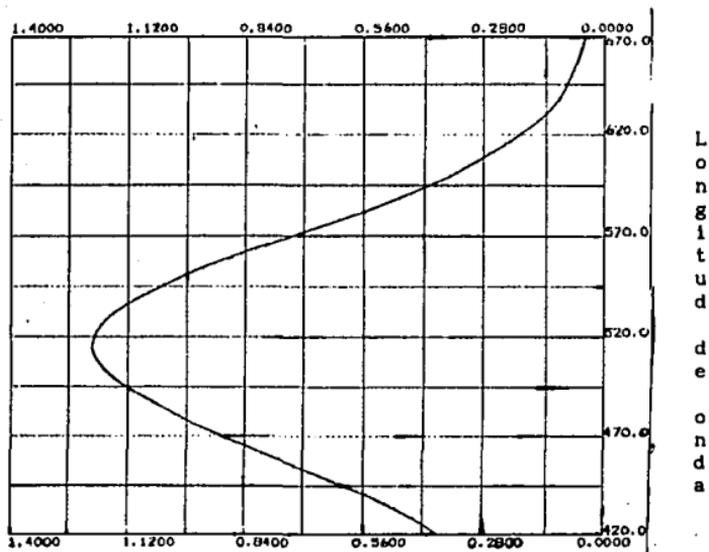


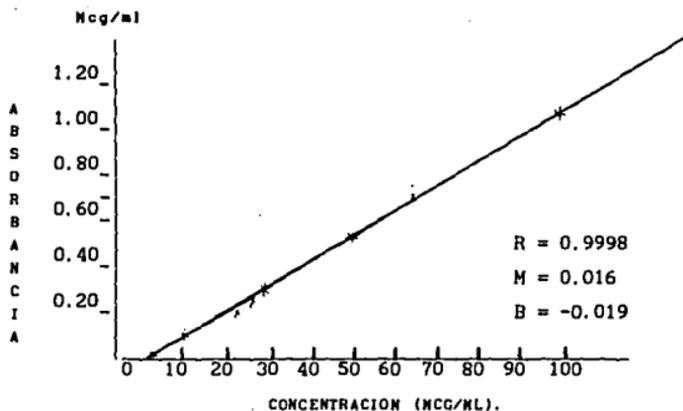
Fig. No.3 Espectro de absorción para la extracción en plasma de DCIP. Absorbancia por longitud de onda, de 420 a 670 nm.

CUADRO 1 LINEALIDAD DEL SISTEMA

CONC mg/ml	ABS 1	ABS 2	ABS 3	ABS 4	ABS 5	ABS 6	ABS 7	\bar{X}	DS	CV%
100.00	1.155	1.114	1.157	1.133	1.155	1.156	1.157	1.147	0.0168	1.4651
66.00	0.773	0.73	0.717	0.758	0.717	0.773	0.745	0.7447	0.256	3.437
50.00	0.581	0.551	0.579	0.562	0.579	0.581	0.58	0.5733	0.0119	2.08
28.00	0.333	0.297	0.318	0.306	0.318	0.330	0.324	0.318	0.0129	4.04
25.00	0.295	0.248	0.289	0.269	0.265	0.267	0.261	0.269	0.017	6.33
22.00	0.25	0.212	0.248	0.226	0.231	0.237	0.23	0.2334	0.0131	5.62
10.00	0.053	0.091	0.0093	0.094	0.092	0.095	0.091	0.0927	0.015	1.61
5.00	0.04	0.042	0.041	0.036	0.041	0.038	0.04	0.0397	0.0021	5.19
r	0.9997	0.9996	0.9993	1.00	0.9975	0.9991	0.995	0.9998		
r ²	0.9996	0.9998	0.9988	0.9999	0.9989	0.9992	0.999	0.9996		
m	0.0117	0.0114	0.0116	0.0116	0.0116	0.0119	0.0118	0.0116		
b	0.009	-0.026	-0.013	0.022	-0.021	-0.021	-0.022	-0.019		

LINEALIDAD DEL SISTEMA

Gráfica No 1



CONC. MCG/KL.	ABS X
100.00	1.147
66.00	0.744
50.00	0.573
28.00	0.318
25.00	0.269
22.00	0.233
10.00	0.093
5.00	0.039

4.1. Precisión del sistema.

En la tabla 5 de precisión se encuentran los valores obtenidos al preparar 6 estándares en agua durante 6 días a las siguientes concentraciones de 50, 25, y 12 mcg/ml.

TABLE 5
A b s o r b a n c i a s

Días	Muestras						Resultados		
Conc. 50 mcg/ml.									
	1	2	3	4	5	6	X	DS	CV%
1	0.756	0.744	0.760	0.760	0.758	0.801	0.756	0.06	0.795
2	0.751	0.725	0.756	0.730	0.658	0.751	0.728	0.33	4.600
3	0.660	0.654	0.629	0.631	0.687	0.669	0.647	0.02	2.110
4	0.750	0.753	0.730	0.747	0.740	0.750	0.745	0.01	1.051
5	0.762	0.750	0.748	0.752	0.771	0.754	0.755	0.08	1.054
6	0.756	0.744	0.750	0.750	0.747	0.773	0.745	0.02	2.982

Conc. 25 mcg/ml.

1	0.305	0.303	0.303	0.282	0.303	0.317	0.302	0.09	3.156
2	0.310	0.293	0.310	0.317	0.271	0.309	0.302	0.02	5.181
3	0.324	0.313	0.303	0.277	0.310	0.317	0.306	0.02	5.150
4	0.380	0.379	0.393	0.389	0.396	0.387	0.387	0.01	1.589
5	0.324	0.330	0.327	0.325	0.335	0.324	0.328	0.004	1.205
6	0.310	0.307	0.300	0.303	0.313	0.320	0.313	0.006	1.527

Conc. 12 mcg/ml.

1	0.150	0.140	0.152	0.138	0.169	0.159	0.149	0.007	4.842
2	0.195	0.171	0.188	0.178	0.184	0.176	0.182	0.008	4.384
3	0.155	0.161	0.148	0.158	0.144	0.156	0.154	0.006	3.806
4	0.134	0.141	0.130	0.132	0.140	0.139	0.136	0.004	3.090
5	0.196	0.188	0.184	0.179	0.193	0.166	0.184	0.010	5.376
6	0.161	0.165	0.154	0.151	0.165	0.157	0.159	0.005	3.339

4.2 Precisión del método.

Para establecer la precisión del método se realizaron pruebas en una misma muestra sanguínea, las que se analizaron en el mismo día, obteniendo los siguientes resultados.

Precisión en plasma

CUADRO No. 2

No.	Muestra	Abs.	
1		0.1120	
2		0.1140	
3		0.1090	
4		0.1020	
5		0.1180	
6		0.1060	
X = 0.110		DS = 0.005	CV% = 4.54

Precisión en sangre

CUADRO No. 3

No.	Muestra	Abs.	
1		0.274	
2		0.250	
3		0.265	
4		0.243	
5		0.234	
6		0.285	
X = 0.259		DS = 0.178	CV% = 2.34

4.3. En la Tabla no. 6 se presentan los valores de porcentos de ácido ascórbico obtenidos, a partir de los cuales se determinó la cinética de reacción que fué de primer orden y su vida media de 2.5 horas; en medio acuoso, a 37 °C al abrigo de la luz.

TABLA 6 Análisis de reproducibilidad de la cinética del Acido Ascórbico en agua.

Tiempo horas	1	2	3	4	5	6	7	X	SD	CV%
0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	00	00
0.25	92.3	96.57	87.4	89.3	89.83	93.4	97.6	92.34	3.5179	3.80
0.5	79.67	81.71	84.8	80.8	82.3	82.5	86.04	82.345	2.0483	2.4814
1.0	71.00	73.14	70.1	68.65	69.00	75.69	76.07	71.6642	3.2276	4.5078
1.5	62.90	63.42	62.50	57.142	60.2	70.46	71.79	64.130	4.9896	7.7804
2.0	55.2	57.14	58.2	50.045	53.5	59.10	58.59	55.9678	3.0426	5.4363
2.5	52.5	54.28	56.3	48.494	47.4	47.28	47.808	50.580	3.446	6.8132
3.0	40.9	41.14	47.5	40.678	46.0	39.47	40.199	42.269	2.9052	6.8731
4.0	32.3	31.42	35.3	30.937	36.0	27.89	30.09	31.1991	2.6453	8.269
5.0	24.3	26.28	21.656	27.00	24.578	22.7	25.07	24.4977	1.7389	7.0982
6.0	22.3	20.00	18.90	18.234	17.82	17.20	18.43	18.9830	1.5783	8.314

TABLA No. 7

EXACTITUD DEL METODO EN SANGRE

% RECUPERADO

CONC. DE A.A. (mcg/ml)	1	2	3	X	Des	T _r (Calculada)
20	98.80	99.60	98.40	98.93	0.61	3.034
25	94.44	88.24	95.68	92.78	3.99	3.134
30	97.67	98.53	99.80	98.67	1.07	2.15
35	97.43	99.14	99.83	98.82	1.23	1.66
40	100.90	98.65	99.20	99.60	1.17	0.59

$$T_{(0,05.2)} = 4$$

15

TABLA No. 8

EXACTITUD DEL METODO EN PLASMA

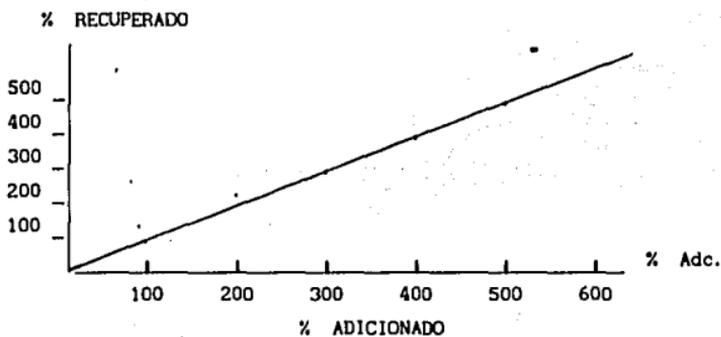
§ RECUPERADO

CONC. DE A.A. (mcg/ml)	1	2	3	X	Des	T (Calculada)
5	97.8	97.124	85.36	93.43	6.99	- 1.63
10	101.90	110.9	108.25	107.02	4.62	2.628
15	101.12	99.13	96.73	98.99	6.63	- 0.293
20	97.01	96.32	98.71	97.35	1.23	3.73
25	96.81	98.67	97.44	97.64	0.9456	4.29

$$T_{(0.05, 2)} = 4.302$$

LINEARIDAD DE LA MUESTRA EN PLASMA

GRAFICA No. 2



LINEARIDAD DE LA MUESTRA EN SANGRE

GRAFICA No. 3

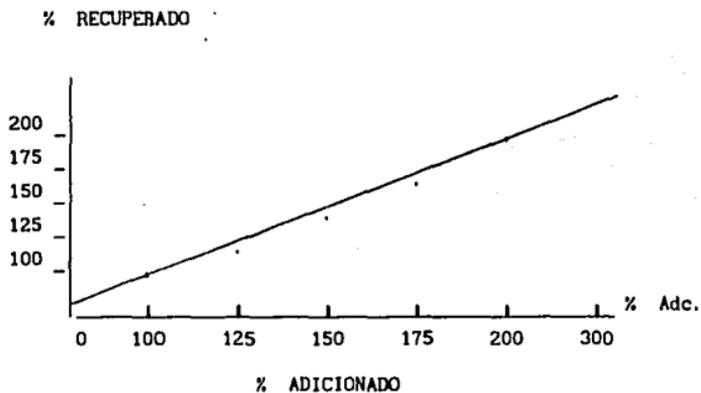


TABLA No. 9

ESTABILIDAD DEL ACIDO ASCORBICO EN SANGRE

T.A.

INICIAL	1 Hr		2 Hr		4 Hr		8 Hr		24 Hr	
Conc. (mcg/ml) %	Conc. (mcg/ml)	%	Conc. (mcg/ml)	%	Conc. (mcg/ml)	%	Conc. (mcg/ml)	%	Conc. (mcg/ml)	%
31.778 100	18.490	59.244	16.492	52.842	12.968	41.550	10.735	41.551	- - - - -	- - - - -
30.642 100	18.073	57.908	17.527	56.158	12.539	40.176	9.705	31.096	- - - - -	- - - - -
\bar{X} 31.21 100	18.282	58.576	17.010	54.500	12.753	40.863	10.200	36.323	- - - - -	- - - - -

T. 5°C

	Conc. (mcg/ml)	%								
- - - - -	25.951	83.150	24.335	77.973	16.283	52.171	15.851	50.788	11.296	36.192
- - - - -	24.017	76.950	23.711	75.971	16.383	52.492	16.079	51.518	11.397	36.518
\bar{X}	24.984	74.920	24.023	76.972	16.333	52.332	15.965	51.153	11.347	36.355

Nota:

T.A. = Temperatura ambiente

T. 5°C - Temperatura a 5 grados centígrados

\bar{X} = Media de la concentración de Ac. Ascórbico en mcg/ml

TABLA No. 10

ESTABILIDAD DEL ACIDO ASCORBICO EN PLASMA

T.A.

INICIAL		1 Hr		2 Hr		4 Hr		8 Hr		24 Hr	
Conc. (mcg/ml)	%	Conc. (mcg/ml)	%	Conc. (mcg/ml)	%	Conc. (mcg/ml)	%	Conc. (mcg/ml)	%	Conc. (mcg/ml)	%
25.422		23.797	94.918	11.301	45.095	7.569	30.192	3.728	14.896	---	---
24.721	100	23.104	92.152	10.716	42.742	7.336	29.261	4.191	16.714	---	---
\bar{X} 25.072	100	23.451	93.535	11.009	43.919	7.453	29.726	3.959	15.805	---	---

T 0°C

	Conc. (mcg/ml)	%	Conc. (mcg/ml)	%	Conc. (mcg/ml)	%	Conc. (mcg/ml)	%	Conc. (mcg/ml)	%
-----	25.073	100.004	12.882	51.378	9.831	39.212	6.193	24.701	4.423	17.642
-----	24.778	98.827	12.684	50.589	10.287	41.031	5.898	23.525	4.816	19.209
\bar{X}	24.926	99.412	12.783	50.984	10.059	40.122	6.046	24.113	4.620	18.426

Nota:

T.A. = Temperatura ambiente

T. 0°C = Temperatura a 0 grados centígrados

 \bar{X} = Media de la concentración del Ac. Ascórbico en mcg/ml

CARACTERÍSTICAS Y RESULTADOS OBTENIDOS DE VOLUNTARIOS.

TABLA 11

Sexo	Primer grupo	No.	Edad Años	Estatura Mt.	Peso Kg	Conc. mcg/ml Sangre	Conc. mcg/ml Plasma	Radio Plas/Sang mcg/ml
F	I	1	27	1.58	58	32.462	7.55	0.232
F	I	2	24	1.50	56	21.552	6.984	0.323
F	I	3	30	1.58	65	36.586	26.793	0.733
F	I	4	27	1.58	58	37.058	19.963	0.539
F	I	5	24	1.60	57.5	22.413	9.869	0.440
F	I	6	27	1.58	56	4.672	2.567	0.549
F	I	7	29	1.58	62	34.183	17.258	0.505
F	I	8	24	1.50	57	24.389	4.458	0.182
F	I	9	26	1.45	45	15.454	10.128	0.655
F	I	10	30	1.58	62	35.515	22.800	0.642
F	I	11	27	1.45	47	32.164	5.960	0.185
F	I	12	26	1.60	57	25.978	3.598	0.139
F	I	13	20	1.54	65	23.358	12.075	0.544
F	I	14	24	1.64	72	24.303	9.183	0.378
F	I	15	25	1.55	61	15.111	10.643	0.704
F	I	16	29	1.68	65	14.337	10.128	0.706
M	I	17	25	1.70	63	14.760	19.409	0.528
M	I	18	23	1.73	65	26.365	9.869	0.374
M	I	19	28	1.50	47	37.920	24.432	0.644
M	I	20	24	1.62	65	21.039	13.478	0.641
M	I	21	20	1.70	72	22.155	9.183	0.414
M	I	22	20	1.73	70	14.509	8.238	0.568
M	I	23	29	1.70	78	17.602	6.691	0.380
M	I	24	24	1.68	70	18.719	5.660	0.302
M	I	25	20	1.65	54	20.867	9.869	0.473
M	I	26	30	1.70	70.5	18.289	10.042	0.549
M	I	27	27	1.64	67	27.396	16.399	0.599

M	I	28	20	1.64	61	19.148	11.760	0.614
M	I	29	24	1.66	76	18.118	3.512	0.194
M	I	30	29	1.81	89.5	15.884	4.715	0.297
M	I	31	26	1.74	86.5	18.805	15.197	0.808
M	I	32	24	1.68	70	18.719	12.018	0.642

Segundo grupo

F	II	33	32	1.50	62	11.244	4.028	0.358
F	II	34	32	1.50	60	12.447	4.372	0.351
F	II	35	39	1.57	46	30.188	19.148	0.634
F	II	36	39	1.64	82	34.681	22.997	0.663
F	II	37	45	1.72	80	37.405	29.286	0.783
F	II	38	33	1.55	57	38.779	29.286	0.755
F	II	39	34	1.47	45	22.585	16.915	0.745
F	II	40	35	1.60	78	22.327	14.337	0.642
F	II	41	42	1.55	53	26.709	16.227	0.607
M	II	42	39	1.67	82	36.589	31.863	0.871
M	II	43	36	1.65	82.5	39.209	26.537	0.677
M	II	44	37	1.75	73	13.049	9.869	0.756
M	II	45	41	1.60	52	19.750	5.402	0.273
M	II	46	43	1.70	75	20.094	13.135	0.654
M	II	47	34	1.56	79	18.032	8.753	0.485
M	II	48	32	1.65	88	19.922	9.869	0.495
M	II	49	39	1.72	68	16.485	12.447	0.755
M	II	50	32	1.51	50	18.891	10.471	0.554
M	II	51	45	1.63	78	20.094	11.416	0.568
M	II	52	41	1.70	68	15.197	12.104	0.796
M	II	53	42	1.56	67	22.241	15.884	0.714
M	II	54	33	1.75	82.5	17.430	5.918	0.339
M	II	55	45	1.64	77.5	23.272	13.656	0.587
M	II	56	36	1.77	92	26.881	15.540	0.578
M	II	57	36	1.54	85	21.21	6.262	0.295

Tercer grupo

F	III	58	74	1.55	56	29.63	7.293	0.246
F	III	59	60	1.58	63	29.20	24.620	0.843
F	III	60	75	1.40	53.3	7.979	20.523	2.572
F	III	61	85	1.56	61.8	3.341	5.920	1.772
F	III	62	81	1.45	56.8	5.231	34.784	6.649
F	III	63	81	1.62	61.1	9.182	28.255	3.077
F	III	64	68	1.39	44.5	19.097	9.354	0.490
F	III	65	72	1.56	52	13.478	7.482	0.555
F	III	66	84	1.62	48.7	24.131	12.963	0.537
F	III	67	80	1.49	53.2	14.939	13.564	0.908
F	III	68	75	1.52	53.5	23.10	2.567	0.111
M	III	69	52	1.65	64	23.702	12.705	0.536
M	III	70	57	1.65	81	20.523	5.316	0.259
M	III	71	51	1.67	74	18.032	12.447	0.690
M	III	72	78	1.55	49.5	12.877	4.114	0.319
M	III	73	68	1.78	48.9	15.368	7.121	0.463
M	III	74	100	1.65	57	21.898	5.488	0.250
M	III	75	88	1.565	44.7	11.416	6.519	0.571
M	III	76	82	1.52	46.8	35.901	14.595	0.406
M	III	77	67	1.50	40	8.667	17.602	2.031
M	III	78	78	1.52	49	24.905	18.801	0.755
M	III	79	81	1.52	50.7	18.891	13.736	1.375
M	III	80	89	1.50	53.5	14.767	4.801	0.325
M	III	81	69	1.70	49	25.764	4.286	0.166
M	III	82	79	1.51	60.9	9.784	8.409	0.859
M	III	83	71	1.60	49.7	13.660	20.179	1.478

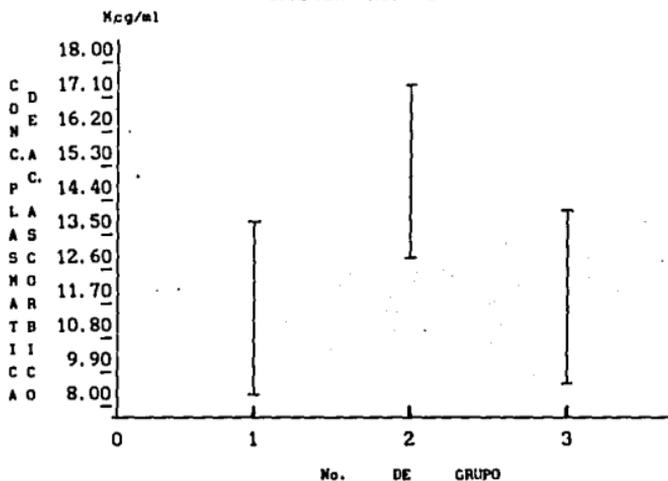
ANALISIS DE VARIANZA PARA PLASMA

	G L	S C	S M	F
TOTAL	82	4569.81		
TRTS	2	159.00	79.5	1.4419
ERROR	80	4410.81	55.14	

$$F_{t(0.05, 60)} = 3.15$$

GRAFICAS DE COMPARACIONES MULTIPLES DIFERENCIAS MINIMAS SIGNIFICANTE (DMS) EN MUESTRAS DE PLASMA

GRAFICA No. 4



No. de trts.	N	Media	Varianza	Desv. est.
1	32	11.282	38.704	6.221
2	25	14.629	64.149	8.010
3	26	12.436	66.854	8.175

El número de grupo se estableció con respecto a las tres diferentes edades, el grupo 1 corresponde a jóvenes (20-30 años), el grupo 2, de adultos (30-50 años) y con respecto al grupo 3 se refiere a adultos mayores de 50 años.

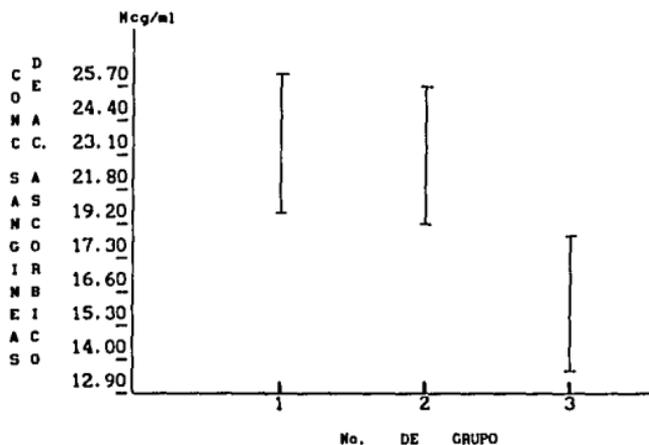
ANALISIS DE VARIANZA PARA SANGRE

	G L	S C	S M	F
TOTAL	82	6053.75		
TRTS	2	628.20	314.099	4.6314
ERROR	80	5425.55	67.819	

$$F_{t(0.05,60)}=3.15$$

GRAFICAS DE COMPARACIONES MULTIPLES DIFERENCIAS MINIMAS SIGNIFICANTES. (DMS) EN MUESTRAS DE SANGRE.

GRAFICA No. 5



No. trt.	N	Media	Varianza	Des. est.
1	32	23.495	67.53	8.217
2	25	23.388	70.12	8.373
3	26	17.517	65.95	8,1211

El número de grupo se estableció con respecto a las tres diferentes edades, el grupo 1 corresponde a jóvenes (20-30 años), el grupo 2 de adultos (30-50 años), y con respecto al grupo 3 se refiere adultos mayores de 50 años.

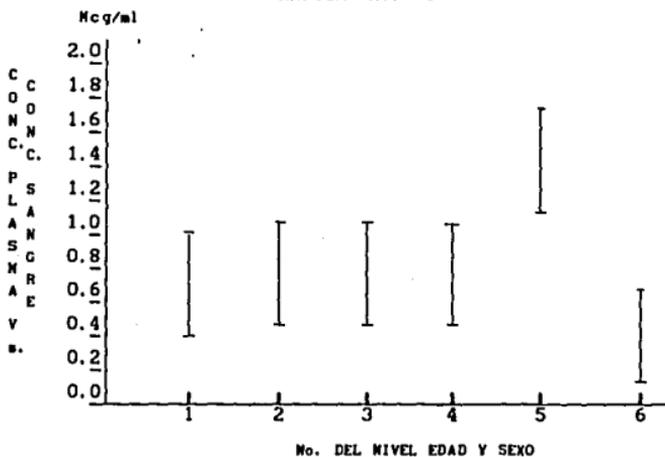
ANALISIS DE VARIANZA
 PARA CONCENTRACION DE PLASMA / CONCENTRACION DE SANGRE
 EN DIFERENTES NIVELES DE EDAD Y SEXO.

	G L	S C	S M	F _c
TOTAL	82	6052.80		
TRTS	5	842.12	168.43	2.4889
ERROR	77	5210.68	67.67	

$$F_{t(0.05,60)} = 2.37$$

GRAFICA DE COMPARACIONES MULTIPLES DE TUKEY'S DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS HONESTAS (DSH)

GRAFICA No. 6



Nivel: 1 Jóvenes femeninos, 2 Jóvenes masculinos, 3 Adultos femeninos, 4 Adultos femeninos, 5 Ancianos femeninos, 6 Ancianos masculinos.

COMPARACIONES MULTIPLES

Nivel	Media	No. de muestras	Separación
6	0.3476	15	a
4	0.6612	16	ab
1	0.6810	16	ab
3	0.7058	9	ab
2	0.7358	16	ab
5	1.2587	11	b

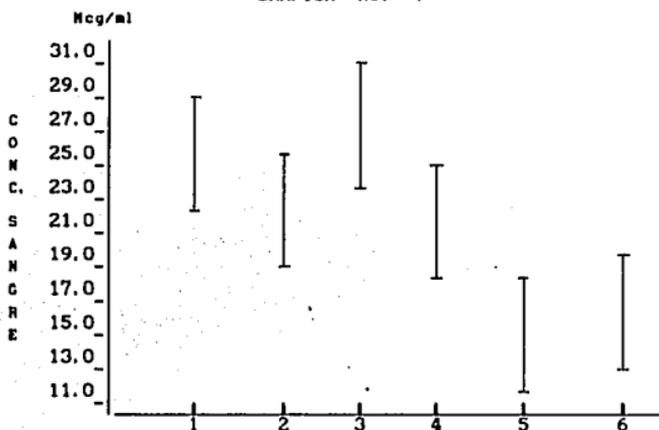
ANALISIS DE VARIANZA
 PARA CONCENTRACION EN SANGRE Vs. DIFERENTES EDADES Y SEXO

	G L	S C	S M	F _c
TOTAL	82	40284.67		
TRTS	5	36300.79	7260.15	140.323
ERROR	77	3983.88	51.74	

$$F_{t(0.05, 60)} = 2.37$$

GRAFICA DE COMPARACIONES MULTIPLES: TUKEY'S (DSH)

GRAFICA No. 7



No. DEL NIVEL EDAD Y SEXO.

Nivel: 1 Jóvenes femeninos, 2 Jóvenes masculinos, 3 Adultos femeninos, 4 Adultos masculinos, 5 Ancianos femeninos, 6 Ancianos masculinos.

COMPARACIONES MULTIPLES

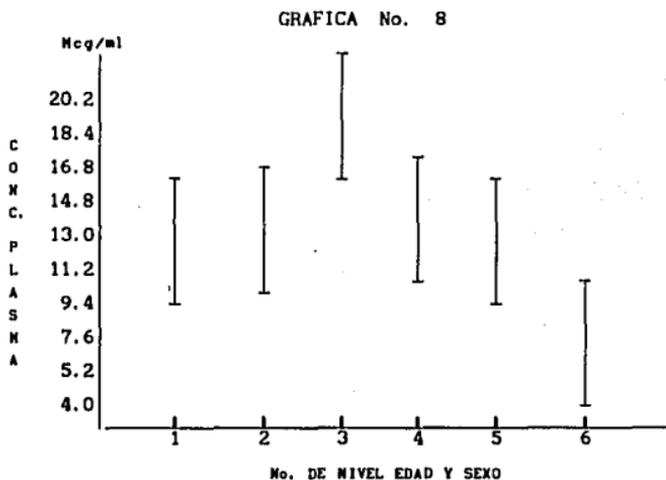
Nivel	Media	No. de muestras	Separación
5	14.8316	11	a
6	16.9597	15	ab
4	22.0767	16	abc
2	22.9845	16	bc
1	25.8567	16	c
3	26.6363	9	c

ANALISIS DE VARIANZA
PARA CONCENTRACION EN PLASMA Vs DIFERENTES EDADES Y SEXO

	G L	S C	S M	F _c
TOTAL	81	4557.40		
TRARS	5	439.58	87.916	1.6226
ERROR	77	4117.82	54.180	

F = 2.37

COMPARACIONES MULTIPLES : TUKEY'S



Nivel:1 Jóvenes femeninos, 2 Jóvenes masculinos, 3 Adultos femeninos, 4 Adultos masculinos, 5 Ancianos femeninos, 6 Ancianos masculinos.

COMPARACIONES MULTIPLES

Nivel	Media	No. de muestra	Separación
6	7.4678	15	a
5	12.2224	11	ab
1	13.0844	16	ab
2	13.2393	16	ab
4	13.6889	16	ab
3	18.1569	9	b

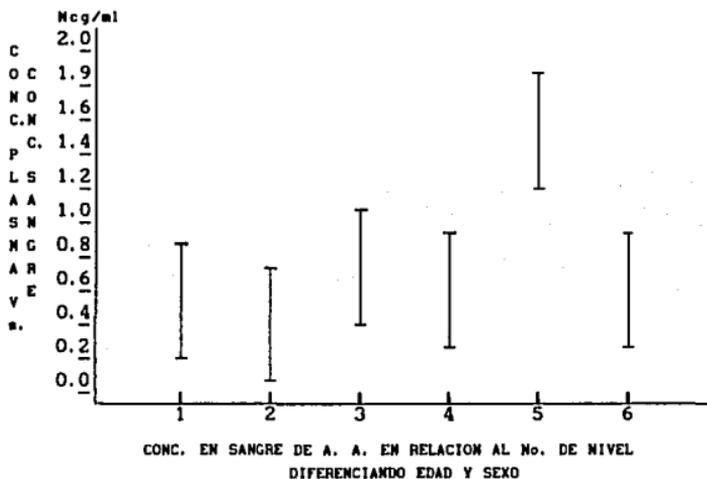
ANALISIS DE VARIANZA
 PARA CONCENTRACION PLASMA / CONCENTRACION SANGRE
 Vs. CONCENTRACION. SANGRE CON DIFERENTES NIVELES EDAD SEXO.

	G L	S C	S M	F _c
TOTAL	82	6052.801		
TRATS	5	842.124	168.425	2.49
ERROR	77	5210.678	67.671	

$$F_t(0.05, 60) = 2.37$$

COMPARACIONES MULTIPLES : TUKEY'S (DSH)

GRAFICA No. 9



Nivel: 1 Jóvenes femeninos, 2 Jóvenes masculinos, 3 Adultos femeninos, 4 Adultos masculinos, 5 Ancianos femeninos, 6 Ancianos masculinos.

COMPARACIONES MULTIPLES

Nivel	Media	No. de muestras	Separación
2	0.5126	16	a
1	0.5524	16	a
4	0.5920	16	a
6	0.6175	15	a
3	0.7349	9	a
5	1.4792	11	b

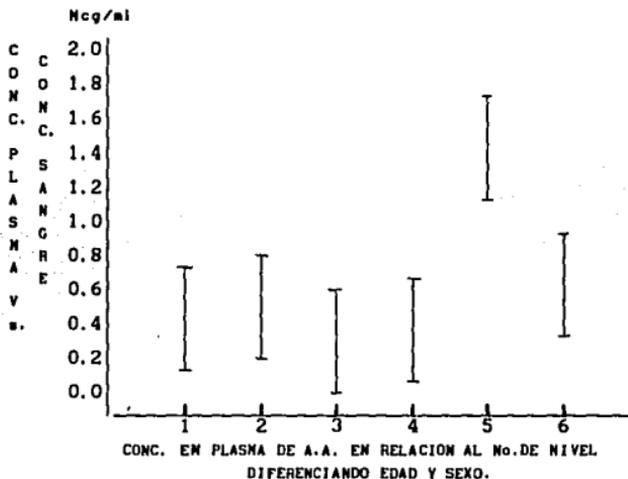
ANALISIS DE VARIANZA
 PARA CONCENTRACION PLASMA / CONCENTRACION SANGRE Vs.
 CONCENTRACION PLASMA EN DIFERENTES EDADES Y SSEXO.
 EDADES Y SEXO

	G L	S C	S M	F _c
TOTAL	82	4570.289		
TRATS	5	413.046	82.609	1.530
ERROR	77	4157.243	53.990	

$$F_{t(0.05, 60)} = 2.37$$

COMPARACIONES MULTIPLES : TUKEY'S (DSH)

GRAFICA No. 10



Nivel: 1 Jóvenes femeninos, 2 Jóvenes masculinos, 3 Adultos femeninos, 4 Adultos masculinos, 5 Ancianos femeninos, 6 Ancianos masculinos.

COMPARACIONES MULTIPLES

Nivel	Media	No. de muestras	Separación
3	0.3406	9	a
1	0.5453	16	a
4	0.5632	16	a
2	0.5809	16	a
6	0.8289	15	a
5	1.4665	11	b

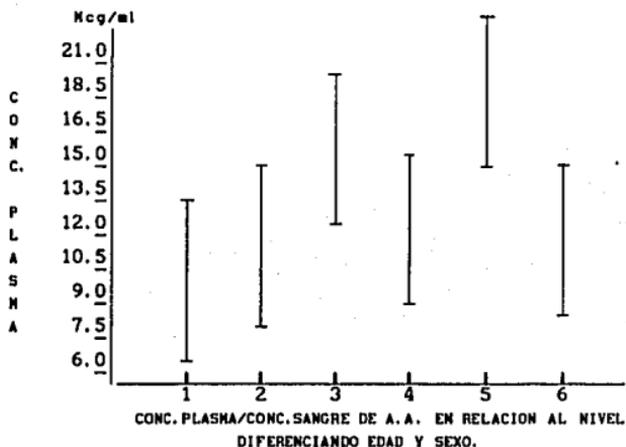
ANALISIS DE VARIANZA
 PARA CONCENTRACION PLASMA Vs. CONCENTRACION PLASMA /
 CONCENTRACION SANGRE DIFERENCIANDO EDAD Y SEXO.

	G L	S C	S M	F _c
TOTAL	82	4570.289		
TRTS	5	413.045	82.609	1.5301
ERROR	77	4157.243	53.990	

$$F_{t(0.05, 60)} = 2.37$$

COMPARACIONES MULTIPLES : TUKEY'S (DSH)

GRAFICA No. 11



Nivel: 1 Jóvenes femeninos, 2 Jóvenes masculinos, 3 Adultos femeninos, 4 Adultos masculinos, 5 Ancianos femeninos, 6 Ancianos masculinos.

COMPARACIONES MULTIPLES

Nivel	Media	No. de Muestras	Separación
1	9.8513	16	a
2	11.1041	16	a
6	11.7567	15	ab
4	12.7567	16	ab
5	15.4179	9	ab
3	17.4545	11	b

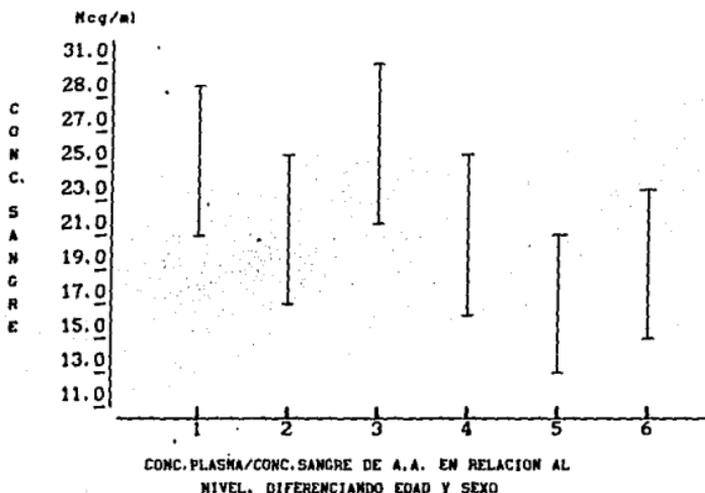
ANALISIS DE VARIANZA
PARA CONCENTRACION SANGRE Vs. CONCENTRACION PLASMA/CONCENTRACION
SANGRE EN DIFERENTES EDADES Y SEXO.

	G L	S C	S M	F _c
TOTAL	82	6052.66		
TRTS	5	842.17	168.43	2.48
ERROR	77	5210.50	67.67	

$$F_{t(0.05,60)} = 2.37$$

COMPARACIONES MULTIPLES : TUKEY'S (DSH)

GRAFICA No. 12

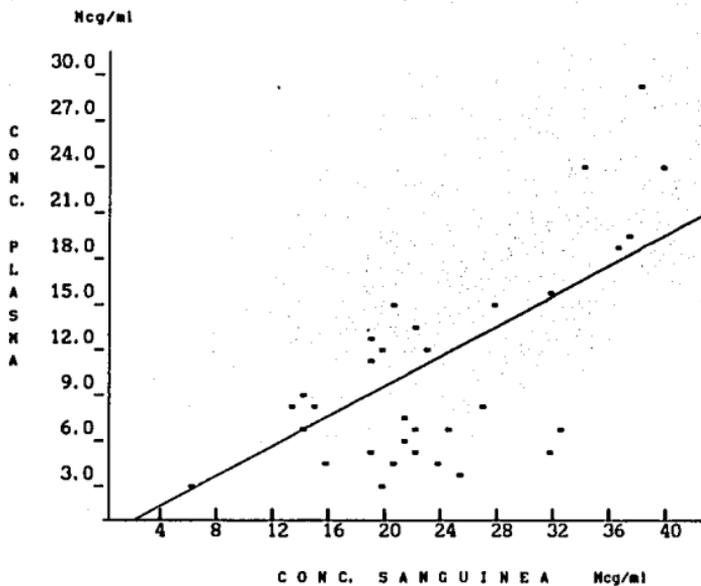


Nivel: 1 Jóvenes femeninos, 2 Jóvenes masculinos, 3 Adultos femeninos, 4 Adultos masculinos, 5 Ancianos femeninos, 6 Ancianos masculinos.

Nivel	COMPARACIONES MULTIPLES		
	Media	No. de muestras	Separación
5	16.3006	11	a
6	18.4109	15	ab
4	21.7776	16	ab
2	22.0192	16	ab
1	24.9690	16	ab
3	26.2641	9	b

CORRELACION DE LA CONC. PLASMÁTICA DE ACIDO ASCORBICO
Vs. CONC. SANGUINEA DEL MISMO EN 32 JOVENES.

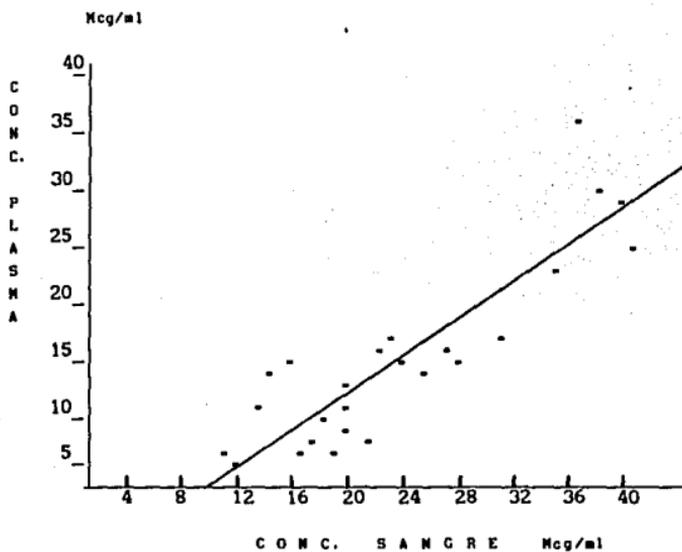
GRAFICA No. 13



CORRELACION = 0.685

CORRELACION DE LA CONC. PLASMÁTICA DE ACIDO ASCORBICO
Vs. CONC. SANGUINEA DEL MISMO EN 25 ADULTOS

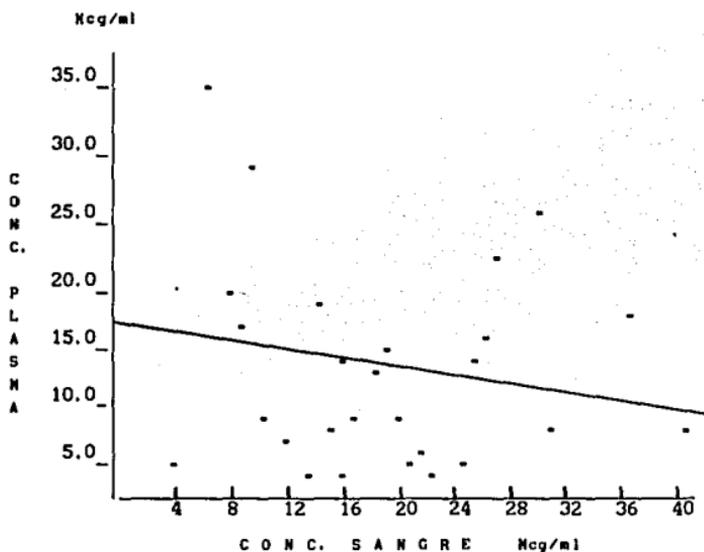
GRAFICA No. 14



CORRELACION = 0.925

CORRELACION DE LA CONC. PLASMÁTICA DE ACIDO ASCORBICO
Vs. CONC. SANGUINEA DEL MISMO EN 26 ADULTOS MAYORES
DE 50 AÑOS

GRAFICA No. 15



CORRELACION = - 0.1908

TABLA No. 12

TABLA DE CONTINGENCIA EN PLASMA

N	Conc. A. A. mcg/ml							Tot reng	
	0-5	6-10	11-15	16-20	21-35	26-30	31-35		
JF	F	3	4	5	2	1	1	0	16
	F ^o	2.506	4.627	4.048	2.51	0.58	0.964	0.3855	
	z ^e	0.097	0.085	0.224	0.104	0.304	0.001	0.3855	
JM	F	2	7	3	3	1	0	0	16
	F ^o	2.506	4.627	4.048	2.51	0.58	0.964	0.3855	
	z ^e	0.102	1.224	0.271	0.95	0.304	0.964	0.3855	
ADF	F	2	0	1	3	1	2	0	9
	F ^o	1.41	2.60	2.28	1.41	0.33	0.542	0.217	
	z ^e	0.246	2.60	0.718	1.792	0.984	3.922	0.217	
ADM	F	0	6	6	2	0	1	1	16
	F ^o	2.506	4.627	4.048	2.51	0.58	0.964	0.3855	
	z ^e	2.506	0.4074	0.941	0.104	0.58	0.001	0.979	
ANF	F	1	4	2	0	2	1	1	11
	F ^o	1.723	3.181	2.73	1.723	0.398	0.663	0.265	
	z ^e	0.3033	0.210	0.053	1.723	6.45	0.171	2.038	
ANM	F	5	3	4	3	0	0	0	15
	F ^o	2.35	4.34	3.80	2.389	0.542	0.904	0.361	
	z ^e	2.99	0.413	0.010	0.156	0.542	0.904	0.361	
Tot.col		13	24	21	13	3	5	2	Tot. 83

$X^2 = 38.71$ con 30gl Obtenida
 $X^2 = 43.0$ Teórica
 S(0.95, 30)

TABLA No. 13

TABLA DE CONTINGENCIA EN SANGRE

		Conc. A. A. mcg/ml								Tot reng
N		0-5	6-10	11-15	16-20	21-25	26-30	31-35	36-40	16
JF	F	1	0	3	0	5	1	4	2	
	F ^o	0.578	0.771	2.891	3.86	3.869	1.734	1.157	1.642	
	z ^e	0.3081	0.771	0.004	3.86	0.330	0.310	6.985	0.136	
JM	F	0	0	1	8	3	2	0	2	16
	F ^o	0.578	0.771	2.891	3.86	3.869	1.734	1.157	1.542	
	z ^e	0.578	0.771	1.236	4.44	0.195	0.041	1.157	0.136	
ADF	F	0	0	2	0	2	2	1	2	9
	F ^o	0.325	0.434	1.626	2.169	1.952	0.976	0.651	0.867	
	z ^e	0.325	0.434	0.086	2.169	0.00118	1.05	0.187	1.481	
ADM	F	0	0	2	8	3	1	0	2	16
	F ^o	0.578	0.771	2.891	3.86	3.869	1.734	1.157	1.542	
	z ^e	0.578	0.771	0.271	4.44	0.195	0.311	1.157	0.136	
ANF	F	2	2	2	1	2	2	0	0	11
	F ^o	0.398	0.530	1.988	2.651	2.386	1.193	0.7951	1.060	
	z ^e	6.45	4.077	0.000	1.03	0.062	0.546	0.795	1.060	
ANM	F	0	2	5	3	3	1	1	0	15
	F ^o	0.5421	0.723	2.711	3.614	3.253	1.627	1.09	1.445	
	z ^e	0.5421	2.256	1.933	0.104	0.020	0.242	0.007	1.445	
Tot col		3	4	15	20	18	9	6	8	Tot 83

$$\chi^2 = 55.51 \text{ con } 35\text{gl}$$

$$\chi^2 = 55.8$$

S(0.95,40)

CAPITULO V

ANALISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIONES

- 1.- La valoración⁴ del ácido ascórbico utilizando el indicador 2,6 Diclorofenol-indofenol a una longitud de onda de 518 nm, nos permitió cuantificarlo de una forma confiable.
- 2.- Estableciendo de acuerdo a los valores reportados en la literatura⁴ intervalos de 5-100 mcg/ml; el método mostró ser lineal al realizarse 7 curvas en días distintos obteniendo un coeficiente de correlación de 0.9998 con una pendiente de 0.0116 e intercepto de -0.019.
- 3.- Al determinar la precisión del sistema los coeficientes de variación determinados fueron de 2.09, 2.70, 4.14% para las concentraciones de 50, 25 y 12 mcg/ml respectivamente; en donde se puede observar que al determinar la precisión de menor concentración presentó una mayor diferencia.
- 4.- Para la determinación de la precisión del método en plasma, se empleó plasma envejecido del cual se obtuvieron valores de absorbancia de 0.102 a 0.118, obteniendo una media de 0.110, una desviación estandar de 0.005 y un % de coeficiente de variación de 4.54.

- 5.- La precisión del método en sangre se determinó en un mismo día analizando 6 muestras de las cuales se obtuvieron valores de absorbancia de 0.234 a 0.285 obteniendo una desviación estándar de 0.0178 con un coeficiente de variación de 2.34% .
- 6.- Para la determinación de la exactitud del método en plasma se adicionó ácido ascórbico, preparando muestras con concentraciones de : 5, 10, 15, 20 y 25 mcg/ml. Al aplicar el estadígrafo T " student " a los valores obtenidos contra el 100% de recobro se encontraron valores de T menores que el valor T de tablas con un alfa de 0.05.
- 7.- Para la determinación de la exactitud del método en en sangre se adicionó ácido ascórbico, preparándo muestras de concentraciones de: 20, 25, 30, 35 y 40 mcg/ml. Al aplicar el estadígrafo T de " student " a los valores obtenidos comparados con el 100% de recobro se obtuvieron valores menores a los de tablas con una alfa de 0.05.
- 8.- La estabilidad del ácido ascórbico en plasma resultó ser muy baja, ya que a la hora, a temperatura ambiente se degradó en un 6.47%, y a una temperatura de 0 °C fue de 1.59%. Bajo las mismas condiciones el ácido ascórbico en sangre se degradó en un 26.8% en 1 hora y a 5 °C se degradó en un 20%.

Por lo anterior las muestras se deberán analizar lo antes posible para tener resultados confiables no debiendo prolongarse su análisis 1 hora después de la extracción sanguínea.

- 9.- A los resultados obtenidos de ácido ascórbico en 83 voluntarios, clasificados en 3 diferentes edades (tabla 11) se aplicó un análisis de varianza obteniendo en sangre variaciones estadísticamente significativas no sucediendo lo mismo en plasma (gráfica 4, 5). Se obtuvieron valores de F de 4.63 y 1.44 para sangre y plasma respectivamente, siendo el valor de tablas de 3.15 con un alfa de 0.05.
- 10.- Por lo anterior se decidió realizar análisis de varianza a las conc. de ácido ascórbico en sangre con respecto a las concentraciones del mismo en plasma considerando tanto la edad como el sexo como variables, encontrando en las gráficas no. 6,7,9,10 y 12 diferencias estadísticamente significativas obteniendo valores de F de 2.48, 140.32, 2.49, 1.53, 2.48, respectivamente. Para cada gráfica, comparados con un valor de F de tablas de 2.37 con un alfa de 0.05, siendo este menor en todos los casos.

Este estudio nos condujo a determinar que grupos de edad-sexo serían los responsables de estas diferencias, por lo que se decidió a efectuar un análisis de comparaciones múltiples Tuckey's (DSH).

En la relación de conc. en plasma con respecto a la edad, los resultados de las comparaciones múltiples mostraron que el grupo de jóvenes contenía los valores más bajos del ácido ascórbico (gráfica no.4), esto es, los valores obtenidos fueron diferentes a los esperados, por lo que, se puede observar, que a estas edades existe una mala ingesta no solo de vitamina C sino también de otros micronutrientes que resultan ser esenciales para el buen funcionamiento del organismo. También podemos mencionar el tipo de actividades que se realizan a esta edad

Al relacionar conc. sanguínea de ácido ascórbico con respecto a edad-sexo se encontró que el grupo que presenta las diferencias fue el correspondiente a los ancianos, que presentó el valor menor. (gráfica 5). Probablemente las condiciones de biodisponibilidad para la vitamina C sean diferentes al transcurso del tiempo.

Cuando se relacionó conc. plasma/conc. sangre, en diferentes edades y sexo, se encontró que los grupos responsables de estas diferencias fueron los correspondientes a los dos grupos de ancianos, mostrando los valores más altos las ancianas y los más bajos los ancianos (gráfica 6). Este tercer grupo nos está presentando diferencias notorias con los dos grupos restantes; por lo que podemos presuponer que a esta edad el contenido de ácido ascórbico varía con respecto al sexo, como no sucede en los dos grupos restantes; existe una diferencia de aproximadamente un 20% de mortalidad entre mujeres y hombres relacionados con problemas cardiovasculares esencialmente de isquemias e infartos al miocardio, en esta edad hoy en

nuestro país, por lo que es conveniente hacer mención de la necesidad de la ingesta de este micronutriente.

La relación conc. sangre en relación edad-sexo, mostró que los grupos responsables de estas diferencias fueron los tres grupos femeninos donde el grupo 5 (ancianas) fue menor en donde el grupo de adultos presentó las mayores conc. con una mínima diferencia con el grupo de jóvenes, siendo que el de ancianos fue el que presentó los valores más bajos (gráfica 7). Observándose que existe una tendencia en donde los valores más bajos son en hombres, podemos hacer mención de los problemas cardiovasculares (isquemias e infartos al corazón) y de cáncer, los % en mortandad en ambos casos es mayor en hombres que en mujeres.

En la relación conc. plasma contra las diferencia edad-sexo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. (gráfica 8). Donde podemos observar que el grupo que presenta las conc. más altas son las de mujeres adultas.

En la relación conc. plasma/conc. sangre contra conc. sangre, el grupo responsable de las diferencias fue el grupo correspondiente a los ancianos, mostrando una tendencia en los grupos femeninos de presentar los valores más altos. (gráfica 9).

En la relación conc. plasma/conc. sangre contra conc. plasma el grupo responsable de las diferencias correspondió a las ancianas, donde el grupo donde fue menor a la relación conc. plasma/ conc. sangre de ácido ascórbico presentó correspondiente a mujeres adultas, con una tendencia del grupo masculino a contener las

mayores relaciones. (gráfica 10). Mostrando que al relacionar el radio del ácido ascórbico contra plasma existe una gran diversidad en las mujeres y ancianas que en el resto de los niveles. Donde se puede presuponer que están gastando mayores conc. de ácido ascórbico las mujeres adultas que ningún otro grupo por las diversas actividades que a esta edad requiere de acuerdo al rol social que pertenesca.

La relación de conc. plasma contra conc. plasma/conc. sangre en los diferentes grupos edad-sexo, no presentó diferencias, pero presentó tendencias de ambos sexos a aumentar con respecto a la edad donde el grupo de mujeres adultas y ancianas mostraron los valores más altos (gráfica 11). En esta gráfica se puede observar claramente que los niveles más bajos de ácido ascórbico en plasma en relación al radio (plasma/sangre) fueron en jóvenes esto enfatiza aún más la mala alimentación de nuestros jóvenes a temprana edad y en esta etapa de aprendizaje, los factores posibles de estos resultados, se pueden deber a una dieta deficiente, ob tener una serie de vicios (fumar ingerir bebidas alcoholicas) tener una vida muy tensionada o estresada, además practicar algún deporte, siendo que todos y cada uno de estas situaciones requieren un gasto de este micronutriente.

En la relación conc. sangre contra conc. plasma/conc. sangre, el grupo responsable correspondió a mujeres jóvenes y adultas siendo que las ancianas presentaron los valores más bajos (gráfica 12). Podemos observar una mayor concentración del ácido ascórbico en jóvenes que en ancianos por razones probablemente de absorción, razón por la cual esta vitamina no logra realizar todas

sus funciones fisiológicas en una persona adulta como en un joven a pesar de contener valores más altos en plasma las personas de la tercera edad.

- 11.- Al correlacionar la conc. plasma contra/conc. sangre con respecto a las tres diferentes edades, se encontró que : para jóvenes fue de 0.685 observando ligeras dispersiones con respecto a los valores obtenidos (gráfica 13), en adultos resultó de 0.925 (gráfica 14), encontrando similitud a los valores reportados en la literatura presentando una relación de ácido ascórbico 1:2 con respecto a la concentración plasma-sangre (4) se cumple esta relación en adultos siendo menor en el de jóvenes e invirtiéndose en alguno de los casos obtenidos en ancianos determinándose un valor de correlación de -0.1908. Posiblemente la razón de estos valores en ancianos pudiera deberse a la medicación, estado de salud, actividades y tal vez a su alimentación. (gráfica 15).

- 12.- Se calcularon los valores de X^2 tanto en plasma como en sangre obteniéndose los valores : para plasma fue de 38.71 siendo el valor de tablas de 43.8 con un alfa de 0.95, y en sangre resultó ser de 49.46 siendo el valor de tablas de 55.8 con un alfa de 0.95.

Al haber obtenido los resultados de este estudio podemos observar que:

Los niveles mínimos requeridos para un buen funcionamiento del organismo, en nuestros voluntarios, estan en su gran mayoría por encima de lo establecido ; Esto implicaría que nuestra población no presentaría

ningún síntoma por las deficiencias de esta vitamina y los hechos son otros; como se ha comentado ya anteriormente, una de las enfermedades más relevantes en la que parece estar bien vinculado el ácido ascórbico es, en los problemas cardiovasculares y de cáncer principalmente, como también en problemas de anemias (hipoférricas), reumatismo entre otros, en donde es un hecho que los jóvenes están adquiriendo aterosclerosis a edades tempranas, como sería a los 20 años de edad⁸⁴; en la Ciudad de México cuatro de cada cinco personas comprendidos entre los 30 y 40 años de edad, tienen ya aterosclerosis incipientes en las arterias coronarias, es una afección que causa la muerte a muchos hombres de 40 a 50 años de edad; o si bien no mueren, que es lo más frecuente, los invalida en la etapa más productiva de su vida. Observando que las concentraciones más bajas de ácido ascórbico se encontraron en jóvenes que en el resto de los grupos y era de esperarse lo contrario en donde podemos suponer alguno de los factores causantes de esta disminución, puede ser por estrés, tabaquismo o una dieta deficiente del mismo, sabiendo de antemano que estos factores gastan cantidades mayores a las requeridas normalmente por el organismo, tomando en cuenta que un número importante de jóvenes mexicanos viven bajo estas características.

Siendo que dentro de las 20 enfermedades más sobresalientes en nuestro México los problemas cardiovasculares ocupan el 6° lugar en el D.F. el 12° en los estados del norte y el 10° en los estados del sureste, las enfermedades de cáncer, a nivel intestinal, ocupa el 8° lugar en D.F.

Probablemente las cantidades mínimas de ácido ascórbico requerido por los mexicanos sea mayor a lo establecido en la literatura.

Los mexicanos presentan bajas conc. de este nutriente esencial a edades temprana por lo que se recomienda buscar una dieta mejor balanceada.

Procurar ingerir las verduras al vapor o sin que su tiempo de cocción sea demasiado, ya que esto degrada a dicha vitamina.

En este estudio no se pudo esclarecer a que nivel el ácido ascórbico, a una determinada edad la absorción de este se ve disminuida en los eritrocitos ya que no era nuestro objetivo.

Exhortando a realizar estudios con respecto a esta temática pero contemplando y controlando en forma mas estricta factores que pueden tener una afección directa con respecto al contenido del ác. ascórbico: tales como la dieta y tipo de actividades entre otros en una muestra de individuos mejor seleccionados.

Así como también invitando a los medios de difusión públicos y privados a que exorten a la comunidad a hacer conciencia de la importancia de saber balancear su dieta. Poniendo mayor interés en edades tempranas ya que a esta edad formaremos los cimientos de una vida futura mas sana y con un mejor aprovechamiento en cada una de nuestras actividades y etapas de vida.

Se sugiere que se realice un estudio con un número mayor de individuos cuidando una serie de factores que puedan ser causantes de variaciones en el estudio.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

- 1.- El método espectrofotométrico optimizado nos permitió cuantificar en forma confiable ácido ascórbico en fluidos biológicos, tales como plasma y sangre.
- 2.- El método fue lineal en un intervalo de 5-100 mcg/ml., encontrándose un coeficiente de correlación de 0.9998.
- 3.- Por lo que hace a la precisión del sistema, se encontró preciso con un coeficiente de variación aceptable dentro de los límites en fluidos biológicos.
- 4.- La precisión del método en plasma fue óptima, las respuestas encontradas fueron precisadas con un coeficiente de variación dentro de los límites aceptables.
- 5.- La precisión del método en sangre, fue también óptima encontrándose que el coeficiente de variación era igual a 2.34%.
- 6.- Al determinar la exactitud del método en plasma se encontró exacto.
- 7.- Al determinar la exactitud del método en sangre se encontró exacto.
- 8.- Las muestras plasmáticas y sanguíneas resultaron ser poco estables por lo que se deberán analizar antes de 2 horas manteniéndolas a una temperatura de 0° y 5°C .

- 9.- El análisis de varianza con respecto a la conc. de ácido ascórbico en los datos plásmaticos obtenidos en los tres grupos de edades, mostró que no existen diferencias estadísticamente significativas, no sucediendo lo mismo en los valores de sangre. Y observándose que los valores obtenidos en jóvenes resultaron contradictorios a lo esperado ya que presentan los grupos restantes los valores más altos.
- 10.- Al aplicar la prueba de comparaciones múltiples Tukey's a los datos plasmáticos y sanguíneos, las concentraciones del ácido ascórbico en plasma resultaron ser mucho menores para los valores de jóvenes y en ancianos; en tanto las comparaciones en sangre el grupo que presentó mayores diferencias de la relación fue el de las mujeres adultas.
- 11.- Se observó que la correlación conc. plasma vs. conc. sangre fue distinto para cada grupo de edades, presentando el grupo de jóvenes un valor bajo de 0.685 el de adultos fue bueno siendo el valor igual a 0.925 y el grupo de ancianos no presentó
- 12.- Los valores obtenidos de X^2 nos muestra que en relación a las gráficas paramétricas solo resultan ser explicativas para los 83 voluntarios analizados. Siendo que el porcentaje que se logró cubrir con respecto al número de voluntarios para analizar fue de un 83% .

CAPITULO VII

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Guthrie, H. A. Introductory Nutrition, 5th ed., St. Luis, Toronto, The CV Mos by Company. (Labs. Roche) (1983).
- 2.- Whitney, E. N., Hamilton, E. M. N. Understanding Nutrition, 3rd ed., St. Paul, New York, West publishing company. (Labs. Roche). (1984).
- 3.- Conn y Stumpf, Bioquímica Fundamental, Vitaminas que carecen de función coenzimática real, en : Vitamina C, 3ed., México, D. F., Edit. Limusa (1988). pp. 265-266.
- 4.- Litter, Manuel, Farmacología experimental y clínica, Farmacología del ácido ascórbico o Vitamina C en, ácido ascórbico, 5ed., Buenos Aires, México, D.F., Edit. Ateneo, (1977). pp. 1117-1118.
- 5.- Hurych, J. and Rencova J., Appearance and regulation of proline hidroxylase in the body. Cesk Fysiol, (1979). 28: 163-179.
- 6.- Polgar, P., et al, Stimulation of prostaglandin synthesis by ascorbic acid via hidrogen peroxide formation Prostaglandins. (1980), 19 : 693-700.
- 7.- Abrahamnau, V., Kawnsky, M. J., Vitamin C supplementation of total parenteral nutrition. Parenter. Enter. Nutr. (1983). 7 : 465-469.

- 8.- Rebolledo V. E., Cruz Paredes, J. M., et al., Influence of L- ascorbic acid on total blood levels of cholesterol and lipids in the rat. Acta Cient Compostelana. (1980). 16 : 87-90.
- 9.- Christensen, J. M., Chaannan, M. and Ayres, J. W., Effects of divalent amino acids on Iron absorption. J. Pharm. Sci. (1984). 73 : 1245-1248.
- 10.- Counsell, J. N., Horning, D. H., et al., Vitamin C, Ascorbic acid. London and New Jersey. Edit. Aplled Sciences Puplishers. (Labs. Roche). (1982).
- 11.- Anderson, R., et al., The effect of ascorbate on cellular humoral inmunity in asthmatic children. S. Afr. Med. J. (1980). 13 : 974-977.
- 12.- Marks, J., The vitamins, Their role in medical practice, M T P. edit. Press limited. (Labs. Roche) (1985).
- 13.- Machlin, L. J., Handbook of vitamins: Nutritional; Blochemical and clinical aspects, New York, N. Y., Besel. Edit. Marcel Dekker Inc., (Labs. Roche) (1984).
- 14.- Hanck, A. and Ritzel. G., Re-evaluation of vitamin C. Intl. J. Vitam. Nutr. Res. Suppl., 16 (1977). (Labs. Roche).
- 15.- USP, XXI Washintong, D. C. april 8-10, ascorbic acid description. (1975). p. 37.

- 16.- Harrow, P. H. Benjamin, Tratado de Bioquímica ác. ascórbico. México D.F., Edit. Atlante, S.A., (1952). pp. 172-174.
- 17.- Woot-Tsuenwu Leung, Tabla de composición de alimentos para uso de América Latina, INCAP, ICNND., México D.F., Edit. Interamericana. (1975). pp. 15-55.
- 18.- Dubick, M. A., Last, J. A., Cross, C.E., Drug Nutri. Interact. (1983). 2 : 105-115. (Tomado de la ref. no. 82)
- 19.- Tillotson, J. A. and O'Connor, R., Ascorbic acid requirements of the trained monkey (*Macaca Fascicularis*) as determined by blood ascorbate levels. Int. J. Vitam. Nutr. Res. (1980) 50 : 171-178.
- 20.- Chance, B., Sies, H. and Boveris, A., Hidroperoxide metabolism in mammalian organs. Physiol. Rev., (1979). 59 : 527-605.
- 21.- Halliwell, B., Oxygen radicals, A commonsense look at their nature and medical importance. Medical Biology. (1984). 62 : 71-77.
- 22.- Burton, G. W. and Ingold, K. U., Carotene and unusual type of lipid antioxidant. Science. (1984). 224 : 569-573.
- 23.- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C., Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochem. J. (1984). 219 : 1-14.

- 24.- Pryor, W. A., Free radical biology : Xenotoxics, cancer and aging, in : Vitamin E: Biochemical, hematological and clinical aspects. New York, Edit. Lubin B. and Maclin, L. J. Acad. Sci. (1982). 393 : 1-22.
- 25.- Anderson, R. and Lukey, P. T., A biological role for ascorbate in the selective neutralization of extracellular phycoocyte-derived oxidants. Annals of the N. Y. Acad. Sci. (1987). 498 : 229-247.
- 26.- Cross, C. E., Davis Conferences, Oxygen radicals and human disease. Annals of Int. Med (1987) 107 : 526-545.
- 27.- Salkeld, R. M., Nutrition, Cancer and cardiovascular disease. Roche Green Corner Resp. Rep. (1986) 405 : 107
- 28.- Kennedy, A. R., The effects antioxidants on the induction of malignant transformation in vitro, in : Vitamins, and cancer. edit. Meyskens, F. L. and Prasad K. N., Humana press. (1986) pp. 51-64.
- 29.- Burton, K. P., McCord, J. M. and Chai, G., Myocardial alterations due to free-radical generation. Am. J. Physiol. (1984) 246 : 776-783.
- 30.- Kako, K. J., Membrane damage caused by lipid peroxidation in myocardial ischemia. Jikeikai Med. J. (1985) 32 : 609-639.

- 31.- Harman, D., Free radical theory of aging : The free radicals. Diseases, Age. (1984) 7 : 111-131.
- 32.- Lohmann, W., Ascorbic acid and cataract, in: Third conference on vitamin C. Annals of the N. Y. Acad. Sci. (1987) 498 : 307-311.
- 33.- Cutler, R. G., Antioxidants. Aging and Longevity in : Free radicals in biology. London, edit. Academic Press. (1984) pp. 6, 371-428.
- 34.- Dewys, W. D., et al, The cromoprevention program of the Natinal Cancer Institute Vitamins and cancer, edit. Humana press. (1986) pp. 301-311.
- 35.- Stahelin, H. B., Rosel, F., Buess, E. and Brubacher, G., Dietary risk factors for cancer in the Basle study. Biblthea Nutr. Dieta. (1986) 37 : 144-153.
- 36.- Mattlin, C., Graham. S., et al, Diet and cancer of the esophagus. Nutr. Cancer. (1981) 2 : 143-147.
- 37.- Wasserthell-Smoller, S., Romney, S L., et al, Dietary vitamin C and uterine cervical dysplasia. Am. J. Epidemiol (1981) 114 : 714-724.
- 38.- Mirvish, S. S., Wallace, L., et al, Ascorbate nitrite reaction: possible means of blocking the formation of carcinogenic N-nitroso compounds. Science. (1972). 77 : 65-68.

- 39.- Archer, M. C., Hazards of nitrate, nitrite and N-nitroso compounds in human nutrition. Nutr. Toxicol. (1982). 1 : 327-381.
- 40.- Muggli R., Inhibition of in vivo piperazine nitrosation by ascorbate in volunteers (Synopsis of thesis Bellander T.). Roche Green Corner Res. Rep. No. B-107,478. (Labs. Roche)
- 41.- Glathaar, B. E., Horning, D. H. and Moser, V., The role of ascorbic acid in carcinogenesis, in : Essential nutrients in carcinogenesis. New York, edit. Plenum press. (1986).
- 42.- Gey, K. F., Brubacher, G. B. and Stahelin, H. B., Plasma levels of antioxidant vitamins in relation to ischemic heart disease and cancer. Am. J. Clin. Nutr. (1987). 45 : 1368-77.
- 43.- Myung-Suk, K. and Tai, A., O₂ free radical : cause of ischemia reperfusion injury to cardiac Na⁺ -K⁺ ATPase. Am. J. Physiol. (1987). 252 ; 252-257
- 44.- Guaduel, Y. and Duvelleroy, M. A., Role of oxygen radicals in cardiac injury due to reoxygenation. J. Mol. Coll. Cardiol. (1984) 16 : 459-470.
- 45.- Jacques, P. F., Hartz, S. C., et al. Vitamin C and blood lipoproteins in an elderly population, in : Third conference on vitamin C. Annals of the N. Y. Acad. Sci. (1987) 498 : 100-109.

- 46.- Cohn, P. F., Silent ischemia : A timely aspect in coronary artery disease. Hertz (1987). 12 : 314 - 317.
- 47.- Chow, C. K., Thacker, R. R. et al. Lower levels of vitamin C and carotenes in plasma of cigarette smokers. J. Am. Coll. Nutr. (1986). 5 : 305-312.
- 48.- Davis, K. J. A., Quintanilha, A. T., Brooks, G. A. and Pacher, L., Free radicals and tissue damage produced by exercise. Biophys. Res. Com. (1982). 107 : 1198-1205.
- 49.- McCay, P. B., Vitamin E : Interactions with free radicals and ascorbate. Ann. Rev. Nutr. (1985). 5 : 323-340.
- 50.- Machlin, L. J., Vitamin E, in : Handbook of vitamins, nutritional, biochemical and clinical aspects, 2ed. New York and Basel, edit. L.J. Machlin, M, Dekker Inc. (1984) pp. 99-145.
- 51.- Sanberlich, H. E., Green, M. D., & Omaye, S. T. Metalism and uses, in : ascorbic acid chemistry. P. A. Selb & B. M. Tolbert. Advan. Chem. Ser., (1980). 200 : 199-221.
- 52.- McCormick, D. B. & Wright, L. D., Chromatographic and spectral properties of lipoic acid and its metabolites, Methods in enzymology. New York, N.Y., Edit Academic Press, 62 D. Sección 1, (1979) pp. 129-134.

- 53.- De Retter, E., Chromatographic and extraction techniques for vitamin C assay. J. Assoc. Off. Agric. Chem., (1965). 48 : 985-991.
- 54.- Partridge, S. M. & Mapson, L. M. Nature (London). (1947) 164 : 479-480. (Labs. Roche).
- 55.- Mitchell, L. C. & Patterson, W. T., the separation and identification of L-ascorbic, D-isoascorbic, and D., glucoascorbic acid by paper chromatography, Assoc. Off. Agric. Chem. (1983). 36 : 1127-1130.
- 56.- Chen, Y. T., Isherwood, F. A. & Mapson, L. W., Quantitative estimation of ascorbic acid and related substances in biological extracts by separation on a paper chromatogram. Biochem. J. (1953) 55 : 821-823.
- 57.- Saari, J. C., Baker, E. M. & Suaberlich, H. E., Thin-layer chromatographic separation of the oxidative degradation products of ascorbic acid. Anal. Biochem. (1967). 18 : 173-177.
- 58.- Fenimero, D. C., & Davis, C. M., Anal. Chem., (1981). 53 : 252-266. Tomado de la ref. no. 82.
- 59.- Lyle, S. J. & Tehrani, M. S., Res. Dev. Topics., (1982) pp. 311-313. Tomado de la ref. no. 82.

- 60.- Sweely, C. C., Bentley, R., et al. Gas- liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugar and related substances. J. Am. Chem. Soc., (1963). 85 : 2497-2507.
- 61.- Thompson, J. N., Trace Anal. (1982). 2 : 1-67.
Tomado de la ref. no. 82.
- 62.- Lee, W., Hamernyk, P., Hutchinson, M., et al. ascorbic acid in lymphocytes: cell preparation and liquid chromatographic assay. Clin. Chem., (1982). 28 : 2165-2169.
- 63.- Perone, S. P., & Keeflow, M. J., Application of controlled potential techniques to study of rapid succeeding chemical reaction coupled to electro-oxidation of ascorbic acid. Anal. Chem. (1966). 38 : 1760-1763.
- 64.- Heyrovsky, J., & Zuman, P., Practical polarography. New York, N. Y., Edit. Academic press. (1968). p. 102.
- 65.- Rawal, U. M., Patel, U. S., & Desai, R. J., Biochemical studies on caractous human lenses. Ind. J. Med. Res. (1987). 67 : 161-164.
- 66.- Tono, T., & Fujita, S., Determination of ascorbic acid in foods by the spectrophotometric method based in difference spectra. Agric. Biol. Chem., (1981). 45 : 2947-2949.

- 67.- Tono, T., & Fujita, S., Spectrophotometric determination based on difference spectra of L-ascorbic acid in plant and animal foods. Agric. Biol. Chem. (1982). 46 : 2953-2959.
- 68.- Liu, T. Z., Clin, N., et al. Specific spectrophotometry of ascorbic acid in serum or plasma by use of ascorbate oxidase. Clin. Chem. (1982). 28 : 2225-2228.
- 69.- Tillmans, J., Hirsch, P., & Jackinsk., ADAC. (1932) 62 : 241-267.
- 70.- Hiromi, K., Fujimori, H., et al. A kinetic method for the determination of ascorbic acid with 2,6-Dichlorophenol-indofenol. Chem. Lett. pp. 1333-1336.
- 71.- Obata, H., Tokuyama, T., et al. A stoppet-flow method for the determination of ascorbic acid in orange juice containing trise reductone. Agric. Biologi. Chem., (1979). 43 : 2191-2192.
- 72.- Burger, N., & Kara-Gaspavec, V., Spectrophotometric determination of ascorbic acid with potassium hexacyanoferrate (III). Talanta. (1973). 20 : 782-785.
- 73.- Pellizetti, E., Mentastl, E., & Pramauro, E., Kinetics and mechanism of the oxidation of ascorbic acid by tris (1,10-phenanthroline) iron (III) and its derivatives in aqueous acidic perchlorate media. Inorg. Chem., (1976). 15 : 2900-2998.

- 74.- Pelizzati, E., Mentasti, E. & Bramauro, E., Outer-Sphere oxidation of ascorbic acid. Inorganic Chem., (1978). 17 : 1181-1186.
- 75.- Zannoni, V., Lynch, M., et al. Biochem Med. (1974). 11 : 41-48. Referencia tomada del art. no. 82.
- 76.- Okamura, M., An improved method for determination of L-ascorbic acid and L-dehydroascorbic acid in blood plasma. Clin. Chim. Acta. (1980). 103 : 259-268.
- 77.- Okamura, M., A specific method for determination of total ascorbic acid in urine by the α,α -dipyridil method. Clin. Chim. Acta. (1981). 115 : 393-403.
- 78.- Karayannis, M. I., Anal. Chem. Acta. (1975). 76 : 121-130. (Tomado de la ref. no. 82.)
- 79.- Karayannis, M. I., Comparative Kinetic study for-rate constant determination of reaction of ascorbic acid with 2,6-diclorophenol-indophenol. Talanta. (1976). 23 : 27-30.
- 80.- Sherman, C. H., et al. Ascorbic Acid (vitamin C) essentials of nutrition, 4ed. New York. edit. The Mac Millan Company. (1968). p. 192.
- 81.- Solm, A. and Menden, E., Wechselwirkurigen zwinschen Arzneimitteln und Ernahrung. Arzneimittel einfluss auf Bedarf und Versorgung mit essentiellen Nahrstoffen. Institut fur Ernahrungswissen schaft der Justus -Liebig -Universitat Giessen. (1983). p. 453. (Labs. Roche).

- 82.- Pachla, A. L. and Reynolds, L. D., Analytical methods for determining ascorbic acid in biological samples, Food products, and Pharmaceuticals. J. Assoc. Off. Anal. Chem. (1985). 68 : 1-10.
- 83.- Estadística de la salud mundial, OMS, 1983. (Labs. Roche).
- 84.- Estadística de egresos hospitalarios, IMSS, 1988.
- 85.- Cueto, G. L., Factores culturales de la Aterosclerosis. en : Medicina y Cultura. (1986) Art. Publicado en , The American British Cowdray Hospital.