

50524
95

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"



"ELABORACION DE UN TRANSPORTADOR DE OXIGENO
POR MEDIO DE LA UNION QUIMICA ENTRE LA
HEMOGLOBINA HUMANA Y EL ALMIDON"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

RICARDO TENORIO PAREDES

MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2003



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mis abuelos:

Isabel

Ignacio

A mis padres:

Maria Placida

Ricardo

A mis hermanos:

Rita

Daniel

Osiris

Viridiana

Zindy

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

"Con cariño y gratitud por la oportunidad que me brindaron de trabajar a su lado y mi agradecimiento por hacer posible la realización de este trabajo":

Dr. Adolfo Chávez Negrete

Q. Carlos Salvador Valadez Sánchez

Q.F.B. María Magdalena Rojas Uribe

M. en C. Raquel Retana Ugalde

Q. María Guadalupe Miranda Jimeno

M. en C. Rodolfo Carreón Sánchez

"A mi amigo y maestro I.Q. Rogelio Vidal por su gran amistad y valor incalculable de sus sabias enseñanzas"

"Con gran cariño y agradecimiento para todas aquellas personas que influyeron de manera muy especial a lo largo de mi carrera, a todos ellos mil gracias por su gran calidad humana, sus enseñanzas pero sobre todo por extender su mano y ofrecerme su amistad y cariño"

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

RICARDO TENORIO PAREDES

**ELABORACIÓN DE UN TRANSPORTADOR DE OXÍGENO POR MEDIO DE
LA UNIÓN QUÍMICA ENTRE LA HEMOGLOBINA HUMANA Y EL ALMIDÓN.**

DR. ADOLFO CHÁVEZ NEGRETE

DIRECTOR

Q. CARLOS SALVADOR VALADEZ SÁNCHEZ

ASESOR

Resumen.

Obtener un transportador de oxígeno con base en la hemoglobina humana a partir de paquetes globulares caducos con el objeto de subsanar la deficiente disponibilidad de sangre, su tipificación y el contagio de enfermedades ante las urgencias hemorrágicas. Sin embargo, la hemoglobina extraída de los eritrocitos (hemoglobina libre) es filtrada rápidamente por el riñón debido a su bajo peso molecular, por lo que se adhiere a un compuesto que la mantiene en el espacio intravascular por más tiempo.

La hemoglobina se extrae de los glóbulos rojos a través de hemólisis, centrifugación y filtración; con el fin de unirse a un polímero previamente eslabonado a un puente químico que sirve de unión entre la hemoglobina y el almidón, al que se le denomina hemoglobina-almidón, completándose el proceso con diálisis consecutivas, obtención del complejo puro por medio de cromatografía en columna, verificándose esta pureza debido a la cuantificación en espectrofotometría, co-oximetría, gasometría y electroforesis en gel de acrilamida, finalmente se realizan pruebas de esterilidad. Dando como resultado un método por el cual es posible obtener un complejo hemoglobina-almidón que se pueda utilizar como transportador de oxígeno.

INDICE

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 7 |
| 2. MARCO TEÓRICO | 9 |
| 2.1 Alternativas de la sangre homologa | 11 |
| 2.2 Tipos de transportadores de oxígeno | 12 |
| 2.3 Hemoglobina como transportador de oxígeno | 13 |
| 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 16 |
| 4. OBJETIVOS | 17 |
| 5. HIPÓTESIS | 17 |
| 6. METODOLOGÍA | 18 |
| 6.1 Diseño de investigación | 18 |
| 6.2 Criterios de selección | 18 |
| 6.2.1 Inclusión | 18 |
| 6.2.2 Exclusión | 18 |
| 6.2.3 Variables | 18 |
| 6.2.4 Procedimiento | 19 |
| 7. RESULTADOS | 22 |
| 8. ANÁLISIS DE RESULTADOS | 26 |
| 9. CONCLUSIÓN | 27 |
| 10. REFERENCIAS | 28 |
| ANEXOS | |
| ANEXO 1 | |
| 11. HEMOGLOBINA | 30 |
| 11.1 Química de la hemoglobina | 30 |
| 11.2 Estereoquímica de la hemoglobina | 31 |
| 11.3 Variantes de la hemoglobina | 32 |
| 11.3.1 Monóxido de carbono | 32 |
| 11.3.2 Metahemoglobina | 33 |
| 11.3.3 Hemoglobina fetal | 33 |
| 11.4 Variables clínicamente aceptados | 33 |
| 11.5 Significación clínica | 33 |
| Anexo 2 | |
| 12. CROMATOGRAFÍA | 35 |
| 12.1 Tipos de cromatografía | 35 |
| Anexo 3 | |
| 13. ESPECTROSCOPIA | 40 |
| 13.1 Principios espectrofotométricos | 40 |
| 13.1.1 Espectro ultravioleta | 40 |
| 13.1.2 Espectro visible | 41 |
| 13.1.3 Radiación infrarroja | 42 |
| 13.1.4 Ley de Beer | 42 |
| 13.1.5 Desviaciones de la ley de Beer | 42 |
| 13.1.6 Tipos de espectrofotómetro | 43 |
| | 46 |

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

| | |
|---|-----------|
| 13.1.7 Espectrofotómetro de doble haz | |
| 13.1.8 Mantenimiento y calibración | 46 |
| 13.1.9 Identificación espectroscópica | 46 |
| Anexo 4 | |
| 14. CO-OXIMETRÍA Y GASOMETRÍA | 49 |
| 14.1 Análisis espectral de la hemoglobina | 49 |
| 14.2 Co-oxímetro | 50 |
| 14.2.1 Principios de operación | 50 |
| 14.2.2 Limitaciones del co-oxímetro | 50 |
| 14.3 Análisis gasométrico | 51 |
| 14.3.1 Electrodo de pH | 53 |
| 14.3.2 Electrodo de $p\text{CO}_2$ | 54 |
| 14.3.3 Electrodo de $p\text{O}_2$ | 55 |
| 14.4 Calibración | 56 |
| 14.4.1 Calibración de pH | 57 |
| 14.4.2 Calibración de $p\text{CO}_2$ | 57 |
| 14.4.3 Calibración de $p\text{O}_2$ | 58 |
| 14.4.4 Precisión del electrodo | 58 |
| 14.4.5 Errores de calibración | 58 |
| 14.4.6 Fuentes de error de calibración | 59 |
| 14.5 Control de calidad | 59 |
| 14.6 Analizadores sanguíneos modernos | 59 |
| Anexo 5 | |
| 15. ELECTROFORESIS | 61 |
| 15.1 Electroforesis en geles | 61 |
| 15.2 Aplicaciones | 62 |
| Anexo 6 | |
| 16. ENLACE QUÍMICO | 63 |
| 16.1 Enlace iónico | 63 |
| 16.2 Enlace covalente | 64 |
| Anexo 7 | |
| 17. REACCIONES DE SUSTITUCIÓN | 65 |
| 17.1 Reacción $\text{S}_{\text{N}}2$ | 65 |
| 17.2 Reacción $\text{S}_{\text{N}}1$ | 65 |
| 17.3 Reacción nucleofílica aromática | 66 |
| 18. MECANISMO DE LA REACCIÓN | 67 |

1.- INTRODUCCIÓN.

Con la aparición de las diferentes enfermedades que pueden ser adquiridas por medio de transfusiones sanguíneas, la investigación médica actual se ha dado a la tarea de encontrar una solución a esta problemática.

Inicialmente a la sangre donada a los hospitales no se les aplicaba un análisis tan riguroso como los de hoy en día. Así, que en los inicios de la década de los ochentas, la posibilidad de adquirir el virus de la inmunodeficiencia humana (SIDA), alarmo a los bancos de sangre de todo el país. Cabe señalar que no solamente es el SIDA la causa de alarma, sino también, otras enfermedades de transmisión sanguínea como son los virus de la hepatitis B, hepatitis C, entre otros.

Aunado a esta problemática encontramos un gran déficit de concentrado eritrocitario en los hospitales de todo el país, calculándose este déficit en 100 millones de unidades al año.

Con base en esto, se trabaja en la posibilidad de encontrar un transportador de oxígeno con la suficiente calidad para ser tomado en cuenta como un sustituto sanguíneo. En varias partes del mundo se ha trabajado con diferentes elementos. El primer intento se realizó con hemoglobina bovina, pero con la aparición de la encefalitis espongiforme bovina ó enfermedad de las "vacas locas", tuvo que ser descartada. Se continuo la investigación con un derivado de la ingeniería genética partiendo de bacterias como *E. coli*, este posible origen de hemoglobina es también desechado ya que al hacer los ensayos clínicos de Fase I; los sujetos sometidos a este producto desencadenan reacciones secundarias.

Otro experimento que se utiliza son los compuestos sintéticos llamados perfluorocarbonos, a estos compuestos también se les ha encontrado la capacidad de acarrear el oxígeno en el espacio intravascular, sin disolverse en el plasma utilizando materiales que lo ayudan en esta función como los fosfolípidos, pero también se le han encontrado reacciones adversas.

Regresando a los transportadores de oxígeno basados en la hemoglobina, se encuentra otra opción, que es, la utilización de la hemoglobina humana obtenida de paquetes globulares con fecha de caducidad reciente. En el presente trabajo se realiza una adaptación de los diferentes métodos realizados a través de la historia, por diferentes personalidades de la investigación médica.

Aunque los transportadores de oxígeno realizados con hemoglobina humana, se llevan consigo un componente intravascular que es el óxido nítrico, lo que han desencadenado un problema sistémicamente observado en los pacientes que se les ha aplicado este tipo de sangre, como la hipertensión arterial. Para tratar de evitar que surja esta complicación, se realiza la obtención de una solución de

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

hemoglobina libre y sin impurezas. A través de hemólisis química y purificación por cromatografía.

La hemoglobina obtenida por este método, se hace reaccionar por medio de un "puente químico" con un polímero, para formar un complejo con alto peso molecular, que permita a la hemoglobina transportar el oxígeno por el espacio intravascular por mayor tiempo, evitando así la filtración por riñón. El producto se purifica por cromatografía en columna, obteniendo el complejo Hb-polímero puro, verificando la pureza por métodos de análisis gasométrico, cuantificación por co-oximetría, electroforesis y comparación espectrofotométrica con un estándar, finalmente se esteriliza al pasarla por una membrana de 0.22 μ , para poder ser utilizada en los ensayos con ratas.

La ventaja de este método es la utilización de paquetes eritrocitarios que se van a desechar. De esta manera se optimizarían las reservas de líquido plasmático de los bancos de sangre.

2.- MARCO TEÓRICO

Una breve revisión en la historia de la transfusión sanguínea servirá no sólo para enfocar el tema de manera adecuada, sino también para recorrer más de seiscientos años de progreso médico. Siempre se ha considerado la sangre esencial para el mantenimiento de la vida. Nuestros antepasados vivieron, sin duda, de ver cómo literalmente la vida se escapaba del cuerpo por heridas de guerra o caza. En el apogeo del Imperio romano se puso de moda el suicidio de los patricios dejándose desangrar, muriendo así de forma elegante y decorosa rodeado de sus amigos. Siglos después, los médicos pensaron que si se lograba encontrar un medio de transfundir sangre fresca se salvarían muchas vidas.

Hay que señalar que hasta 1628 no se tuvo conciencia de que la sangre fluía dentro de un sistema cerrado de arterias y venas. No debe extrañar, pues, que antes de esta fecha la manera lógica de utilizarla consistiera en beberla o bañarse en ella. Aunque la Biblia prohibía taxativamente a los judíos la ingestión de sangre, ninguna de las exhortaciones impidió a los romanos lanzarse a la arena para beber la sangre de los gladiadores agonizantes. En Egipto, los faraones y príncipes se bañaban en sangre humana como medida general de recuperación y, según Plinio, como cura específica de la lepra.¹

La primera administración de sangre en las venas de un ser humano tuvo lugar, según Villani, en 1492. Este acontecimiento ha sido objeto de muchas controversias, y existen varias versiones de él, incluida una, en la cual se afirma que la sangre fue bebida y no transfundida. No se sabe el nombre del médico ni su destino, pero es muy probable que no se le rindieran honores por su labor.

Otros investigadores de Alemania, Francia e Italia trabajaron activamente en este campo a principios del siglo XVII, pero el siguiente paso decisivo consistió en la descripción del sistema circulatorio, por William Harvey, en 1628. Antes de Harvey, se pensaba que la sangre se originaba en el hígado y que se movía de un lado al otro en los vasos sanguíneos hasta que se consumía. Resulta extraño imaginar cómo los primeros transfusionistas, en el supuesto de que pensarán así, predijeron esos beneficios tan extravagantes de la inyección de sangre desde el bazo del donante al receptor.¹

El libro de William Harvey *Exercitatio anatomica de motu cordis et sanguinis in animalibus* que se publicó en 1628, y posiblemente sea el tratado médico más importante jamás publicado. No sólo proponía una base racional para realizar la transfusión, sino que acaba definitivamente con el concepto galénico de la sangre y el aire, que hasta entonces había regido el pensamiento científico durante quince siglos. El descubrimiento de Harvey estimuló a realizar nuevos intentos de transfusión de sangre en Europa, cuya prioridad reivindicaron para sí distintas naciones. Se supone que Francesco Folli, de Florencia, efectuó una transfusión de sangre a un ser humano el 13 de agosto de 1654. Los franceses aducen que el monje benedictino Robert des Gabets hizo una transfusión con éxito en 1658. En Inglaterra, a partir de 1656, sir Christopher Wren empezó sus experimentos de

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

inyección de varias soluciones intravenosas en perros. Se servía de plumas de ave para canular los vasos sanguíneos, con lo cual proporcionó a sus contemporáneos un instrumento útil, aunque primitivo.¹

La primera transfusión animal-animál de la que se tiene verdadera constancia la practicó Richard Lower, miembro de la Royal Society, en 1665 y 1666. Lower, con la colaboración del Dr. E. King, realizó transfusiones de sangre de la arteria carótida de un perro a otro.

Aproximadamente al mismo tiempo J.B. Denis, médico de la corte de Luis XIV, transfundió 9 onzas de sangre de la arteria carótida de un cordero a un chico de 16 años, que había sido tratado con sangrías repetidas debido a una extraña fiebre y estaba casi moribundo. El chico mejoró considerablemente, y Denis volvió a transfundir con éxito por segunda vez a un receptor pagado. Pero estos logros suscitaron la oposición y los celos de muchos y la situación se hizo propicia para que no tardara en llegar el desastre. Se trataba de un enajenado que había soportado la primera transfusión de sangre de cordero sin problemas; pero la segunda, como era de esperar provocó una reacción. A pesar de ello, la esposa de este hombre rogó a Denis que realizara una tercera transfusión, en el curso de la cual murió el enfermo. Los enemigos de Denis no encontraron mejor ocasión y persuadieron a la viuda que denunciara a Denis por asesinato. Al final fue declarado inocente, pero el tribunal prohibió que se realizaran más transfusiones si no se contaba con la aprobación de la Facultad de Medicina de París, siendo así que la transfusión sanguínea quedó estancada durante cincuenta años en todo el mundo.¹

El resurgimiento de la transfusión sanguínea, a comienzos del siglo XIX, se atribuye a los trabajos del tocólogo inglés James Blundell. Al verse impotente ante la hemorragia posparto fetal, Blundell centro su atención hacia la posibilidad de transfundir sangre como medida salvadora. Después de haber realizado su trabajo, Blundell atrajo el interés mundial y por primera vez se encuentran referencias serias de la transfusión sanguínea en las publicaciones norteamericanas. Varios médicos norteamericanos reclamaron para sí el mérito de la práctica de transfusiones.

A finales del siglo XIX, varios médicos americanos intentaron practicar transfusiones de leche. Después de las primeras impresiones favorables se vieron obligados a confesar que era una práctica inútil y peligrosa. La introducción, por Bull (1884), de la solución salina isotónica como material de transfusión marcó el final de la era de la leche como posible sustituto sanguíneo.¹

El año de 1901 marca el inicio de la era moderna de la transfusión sanguínea. En este año, Kart Landsteiner publicó sus célebres estudios sobre los tres tipos de sangre de los seres humanos (A, B, O), a los que sus colaboradores de De Castello y Sturli añadieron un cuarto (AB) en 1902. Landsteiner admitió que la

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

incompatibilidad serológica entre el donante y el receptor podría ser la causa de la reacción de transfusión, pero fue siete años mas tarde cuando Ottenberg (1908) realizó unas pruebas de pretransfusión in vitro para determinar la compatibilidad. El descubrimiento del factor Rh, por Landsteiner y Wiener (1940), y los muchos progresos realizados posteriormente en inmunohematología sentaron las bases del actual conocimiento de la inmunología de la moderna y segura transfusión de sangre.

A pesar de estos avances, la práctica de la moderna transfusión no habría sido posible si no se hubiera efectuado progresos paralelos en las técnicas de extracción, almacenamiento y administración de sangre. La mayoría de estos importantes progresos se han realizado en los Estados Unidos; Rosenfield publicó una amplia revisión de la cronología de los hechos y acciones más interesantes de los anteriores investigadores de la transfusión de sangre.¹

2.1 ALTERNATIVAS DE LA TRANSFUSIÓN DE SANGRE HOMÓLOGA.

En los últimos años se han introducido en la terapéutica transfusional, procedimientos tendientes a evitar los riesgos potenciales de la transfusión homóloga; algunos se encuentran todavía a nivel de experimentación, por ejemplo la utilización de sustancias transportadoras de oxígeno como los carbonofluorados, soluciones de hemoglobina, hemoglobina de doble enlace o recombinante cuya efectividad no es aún satisfactoria y su toxicidad y costo no permiten su uso clínico extendido. Otros procedimientos son ya de uso común como la autodonación, que puede ser de distintas modalidades como:

- a) Autodonación preoperatorio: Esta es aplicable en pacientes que serán intervenidos quirúrgicamente en forma programada; dos semanas antes de la intervención quirúrgica se obtienen de 2 a 3 unidades de sangre que se conservan adecuadamente y que se utilizan de ser necesario en el trans o en el postoperatorio inmediato.
- b) Hemodilución normovolémica preoperatorio. Se lleva a cabo en pacientes con buen funcionamiento cardiopulmonar y hematocrito normal o alto, se realiza sangría para lograr un hematocrito de alrededor de 30, inmediatamente antes de la intervención quirúrgica, en el quirófano, restituyendo simultáneamente el volumen con una solución macromolecular (Dextran); la sangre se transfunde, si es necesario durante la operación o en el postoperatorio inmediato.
- c) Recuperación intra o postoperatoria de eritrocitos. Con equipos especiales se recupera la sangre acumulada en el lecho quirúrgico. Los glóbulos rojos son infundidos después de filtrarse y lavarse. Este procedimiento está contraindicado en operaciones contaminadas y oncológicas.²

2.2 TIPOS DE TRANSPORTADORES DE OXÍGENO

Por lo anterior la búsqueda de sustitutos sanguíneos data de mucho tiempo atrás, ya que, el uso de sustancias sintéticas portadoras de oxígeno es un tema de valor clínico potencial. Pero ha tenido un auge relevante de unas cuantas décadas a la fecha, en donde, compañías muy importantes han fabricado transportadores de oxígeno con base, en primera instancia, en hemoglobina bovina ya que su adquisición era fácil y abundante, sin embargo; al momento de la aparición de la enfermedad encefalitis espongiforme bovina conocida comúnmente como de las "vacas locas" todo intento de desarrollo, búsqueda y ensayos clínicos fueron totalmente suspendidos. Con base en esto, surge otra opción, que es la de utilizar la hemoglobina humana, la cual, es obtenida por medio de los paquetes celulares caducos de las instituciones interesadas.

A medida que avanzan estas investigaciones, surgen nuevas alternativas como son el uso de hemoglobina producida por ingeniería genética recombinante a partir de *E. coli*, sin embargo; se ha comprobado que existen varios problemas para poder avanzar en este rubro, en primer plano esta el alto costo del proceso, en segundo lugar no tiene el rendimiento necesario para cubrir los niveles de demanda, otro aspecto que hay que añadir, y es muy importante, es que en los estudios de Fase 1 se desencadenan reacciones pirogénicas debido a los lipopolisacáridos de origen bacteriano inmersos en la secuencia molecular de la hemoglobina.³

Un tipo más de compuestos son los no derivados de la hemoglobina, estos transportadores de oxígeno llamados perfluorocarbonos, que son compuestos inertes, no se disuelven en el plasma, y para su utilización como sustituto sanguíneo deben ser emulsificados con agentes que permitan que sus partículas se dispersen en la sangre (el más comúnmente utilizado son los fosfolípidos de la yema de huevo), experimentalmente estos compuestos pueden mantener la entrega de oxígeno en animales libres de glóbulos rojos permitiendo llevar el oxígeno a lugares donde un eritrocito no llega, esto debido a su menor tamaño (1/70 veces el tamaño del glóbulo rojo), pero tiene también varias desventajas, como es el hecho de que antes y después de la transfusión se han producido efectos secundarios. Y a largo plazo no se conoce la eliminación eventual de estos materiales del organismo.⁴

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.3 HEMOGLOBINA COMO TRANSPORTADOR DE OXÍGENO.

Desde el momento en el que se observó que la hemoglobina humana es una de las opciones más viables para utilizarse como acarreador de oxígeno, se han desarrollado diferentes métodos para obtener el compuesto óptimo para su utilización en los seres humanos.

Se han realizado experimentos para obtener hemoglobina libre de estroma en el que a partir de células rojas humanas, se separa la hemoglobina de todo tipo de restos celulares (hemólisis), se pueden obtener los cristales de la hemoglobina⁵, o bien, utilizarla en su fase líquida.⁶ Con base en estos estudios, la obtención de hemoglobina libre, se añaden otras investigaciones que tienen que ver con el aumento del peso molecular formando un compuesto con enlaces covalentes que mantenga por más tiempo en el espacio intravascular a la hemoglobina. Se han realizado complejos con diferentes polímeros como son el almidón, polietilenglicol y el dextran.⁷

Se utilizan polímeros para dar un mayor peso molecular, un mayor tiempo en el espacio intravascular y además aumentar la viscosidad de la hemoglobina. El almidón, es un coloide que se utiliza como expansor plasmático tanto en la medicina como en la cirugía, ya que la amilopectina (constituyente principal del almidón) tiene un peso molecular que oscila en los 250 000 daltons y es muy aceptado en diferentes países del primer mundo. Por su parte el polietilenglicol es utilizado para elaborar estos substitutos sanguíneos, y aunque, se han obtenido buenos resultados el imponderable es que resulta ser muy costoso en la elaboración de este producto.

Por otro lado esta el dextran que también se utiliza como expansor de plasma desde ya hace muchos años, al utilizarse para formar complejo con la hemoglobina, el dextran utilizado es el 1,6 alfa D glucosa, que contiene una distribución de residuos 1-3 alfa glucopiranosil, demostrando una gran alternativa para ser considerado como un acarreador de oxígeno.

Cabe mencionar que no solamente es el hecho de formar el complejo hemoglobina y un polímero, sino que además, es necesaria la utilización de un "puente" químico que permita formar un enlace adecuado en este complejo. Datos obtenidos en investigaciones anteriores señalan que un compuesto llamado cloruro cianúrico ($C_3N_3Cl_3$) es frecuentemente utilizado para la obtención de compuestos por substitución. Esta cloro-triazida (como es también conocido) reacciona fácilmente con compuestos que liberan rápidamente átomos de hidrógeno, que es el caso de las proteínas y los carbohidratos. Formando enlaces covalentes y liberando ácido clorhídrico (HCl). Es importante mencionar que conforme se van substituyendo los átomos de cloro su actividad toxicológica también decrece y puede utilizarse en estructuras biológicas.⁸

Durante todo este tiempo en que se han desarrollado diferentes métodos para la obtención de transportadores de oxígeno con base en la hemoglobina, sobresalen

algunos que por su importancia son de mucha utilidad, ya que, sirven como base o como un comparativo para este trabajo. Es de suma importancia mencionar que la utilización de hemoglobina libre de estroma que utilizan todas las investigaciones, están basadas en el trabajo de De Venuto que obtiene la hemoglobina por medio de cristalización, con valores aceptables de oxihemoglobina, metahemoglobina, pH, P_{50} , y no muestra actividad coagulante.

Partiendo de este punto es que se han podido desarrollar diferentes técnicas. Abuchowski enlaza suero bovino con polietilenglicol y con cloruro cianúrico como puente químico, este producto es obtenido por cromatografía en columna de intercambio iónico y es sometido a electroforesis en gel de acrilamida. Realizó pruebas en conejos obteniendo un producto que no ocasiona respuesta inmune.⁹

Cunnington, Chang y Wong realizan la síntesis del complejo hemoglobina-dextran por medio de la alquilación de la hemoglobina con N-bromoacetilaminodextran¹⁰, donde obtienen un muy buen rendimiento cercano al 90%, también obtienen complejo con pesos moleculares que van desde 20,000 hasta 200,000 daltons dependiendo de las concentraciones de dextran utilizadas¹¹, obteniéndose por medio de columna cromatográfica y cuantificándose por espectrofotometría y electroforesis. Fueron estos mismos investigadores más otros como Jenkins y Tam que utilizaron estos complejos hemoglobina-dextran en animales como conejos, perros y corderos. Se buscaron las propiedades inmunológicas aplicando el complejo dextran-hemoglobina tanto en especies homólogas como heterólogas. Lo que se encontró fue que el complejo es no inmunógeno en especies homólogas no así en las heterólogas en las que se formaron anticuerpos anti-hemoglobina. En lo que respecta a los estudios con hemoglobina acoplada al almidón, se han realizados solo dos investigaciones, la primera realizada en 1982 por Cerny y que sienta un precedente muy importante, ya que, logra unir este polímero con la hemoglobina obteniendo valores aceptables de oxihemoglobina, P_{50} y viscosidad, cuantificándolos por medio de electroforesis, densidad óptica, oximetría y espectrofotometría.

La segunda investigación es la que se lleva a cabo en el laboratorio de investigación ubicado en la Unidad de Investigación Biomédica en Cardiología (UICAR) del Centro Médico Nacional Siglo XXI (CMN SXXI) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Parte de esta investigación se presenta en este trabajo, en la cual se adaptan las anteriores técnicas para que nos sirvan como base para obtener un transportador de oxígeno para que pueda ser utilizado en humanos. La utilización de los paquetes eritrocitarios caducos, es una fuente muy viable de hemoglobina y así tratarlos para obtener un complejo de alto peso molecular que pueda cumplir con la función de transportar el oxígeno por el espacio intravascular (ver anexo 1). Como se mencionó anteriormente la mejor forma de obtener un complejo puro es por medio de la cromatografía en columna a través de un gel en este caso Sephacryl (ver anexo 2).

Con el fin de cuantificar esta molécula se emplean diferentes métodos como el de la espectrofotometría, por que la hemoglobina y los compuestos hemoglobinicos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

absorben luz del espectro visible siendo fácil de diferenciar en las gráficas que se obtienen después de las lecturas al espectro (anexo 3).

La co-oximetría y gasometrías que son muy importantes, ya que, los co-oxímetros modernos son espectrofotómetros que analizan de modo simultáneo cuatro fracciones de la hemoglobina: hemoglobina reducida (RHb), oxihemoglobina (HbO₂), carboxihemoglobina (HbCO), y metahemoglobina (MetHb), obteniendo valores muy confiables de las concentraciones en que se encuentran las cuatro fracciones mencionadas. En cuanto al gasómetro nos muestra un parámetro de la evaluación del equilibrio ácido-base de los pacientes y del funcionamiento de los alvéolos pulmonares en el intercambio de gases (ver anexo 4).

Por último es muy importante la cuantificación por gel en electroforesis, por que permite discriminar la composición química de un conjunto de elementos en sus fracciones, y además el gel de poliacrilamida es interesante como medio estabilizante de electroforesis. El gel resultante es bastante rígido y transparente, pero a diferencia del de agarosa el tamaño de un poro es lo suficientemente pequeño como para dar lugar a procesos de filtración en gel (ver anexo 5).

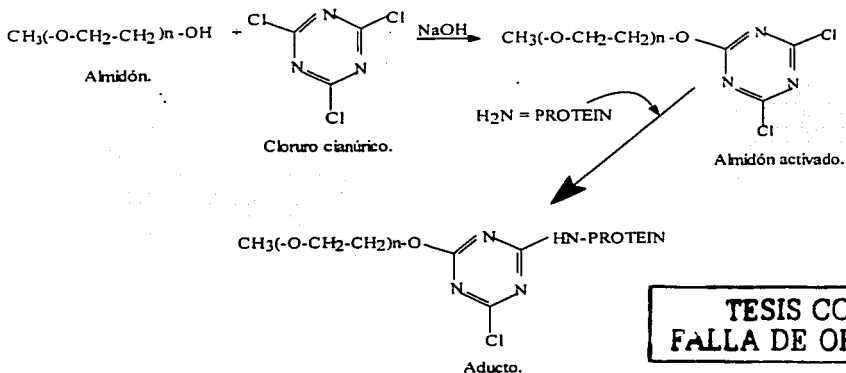


Figura 1. Estructura de la reacción para la formación del complejo Hb-almidón (ver anexos 6,7 y 8).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Conforme las instituciones de todo el mundo por medio de sus investigaciones, buscan afanosamente la forma de cómo conservar, alargar y mejorar las condiciones de vida para la sociedad. Es muy importante el tema de las transfusiones sanguíneas, ya que, como se ha mencionado hay una problemática bastante grande no solamente en cuestiones de enfermedades infectocontagiosas, en la tipificación, sino que también, en la carente disponibilidad que hay en casos de emergencia hemorrágica, en cirugías donde hay sangrado abundante, y también no se debe dejar de lado el tema en el que algunas religiones no se permiten las transfusiones sanguíneas.

En nuestro país hay una mala conciencia de donación altruista, principalmente por la poca información que existe, de la real necesidad que tienen las instituciones de obtener donaciones de sangre. En México existe un gran desabasto en cuanto a este tema se refiere, poniendo en una situación muy complicada a las instituciones del sector salud. Ya que en México se desechan alrededor del 4 % de paquetes al año, al no utilizarse y con el déficit de donaciones agrandan aún más el problema de las transfusiones sanguíneas.

Una manera de atacar este problema es la utilización de "sangre artificial" o también conocidos como "transportadores de oxígeno" ya que, estos productos que están en etapa de experimentación en algunos países (incluyendo México), están en las mejores condiciones de ser utilizados en ensayos clínicos, claro, con la salvedad de que tienen sus efectos secundarios, pero es necesario que alguno de estos transportadores de oxígeno sea el pionero para que en un futuro no muy lejano sea la base de más investigaciones y pueda cumplir con las necesidades y expectativas para lo que es creado.

En países del primer mundo como EUA y Alemania se realizan ensayos con hemoglobinas modificadas genéticamente, pero es sumamente costoso. Por ello, en nuestro país es necesario elaborar una metodología que permita obtener una molécula capaz de acarrear el oxígeno, y que su costo no sea tan elevado, así que una buena alternativa es la obtención de una molécula pura elaborada entre la unión química de la hemoglobina humana y un polisacárido (almidón) unidas covalentemente.

Por tal motivo se plantea el siguiente problema. ¿Es posible la formulación de una molécula capaz de transportar el oxígeno a través del espacio intravascular?

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4. OBJETIVOS.

El presente proyecto realizó los siguientes objetivos:

- Elaborar y estandarizar una metodología para la obtención de un complejo con propiedades físicas y químicas que pueda ser utilizado como un transportador de oxígeno, por medio de la unión química entre la hemoglobina humana y un polisacárido (almidón).
- Separar y obtener por medio de la cromatografía en columna una muestra pura del complejo hemoglobina-almidón.
- Verificar e identificar la pureza de este complejo aplicando las técnicas de electroforesis en gel de acrilamida y espectrofotometría.
- Cuantificar los parámetros finales utilizando los aparatos de Co-oximetría y gasometría.

5. HIPÓTESIS.

La hemoglobina humana es capaz de reaccionar químicamente con el almidón para formar una unión estable y obtenerse un complejo puro demostrándose a través de:

- a) Espectrofotometría y gel de poliacrilamida
- b) Cromatografía en columna
- c) Cuantificación de co-oximetría y gasometría

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6. METODOLOGIA

6.1. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN.

Tipo de estudio:

Experimental, utilizándose paquetes eritrocitarios caducos del hospital de cardiología del Centro Médico Nacional Siglo XXI (CMNS XXI).

6.2 CRITERIOS DE SELECCIÓN

6.2.1 Inclusión

1. Después de la reacción de Hb-almidón la concentración de la metahemoglobina no será mayor del 5%.
2. Paquetes eritrocitarios con fecha de caducidad no mayor a 15 días.

6.2.2 Exclusión

1. Paquetes ya utilizados y en mal estado.

6.2.3 Variables

- 1) Dependientes: hemoglobina y la concentración final de el complejo Hb-almidón.
- 2) Independientes: concentraciones iniciales de almidón y cloruro cianúrico
- 3) Constantes: temperatura, pH y presión.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6.2.4. PROCEDIMIENTO

Obtención de la hemoglobina libre.

Dentro de una campana de flujo laminar, tomar un paquete de eritrocitos con fecha de caducidad reciente, tomar con una jeringa un poco de sangre y cuantificar sus parámetros iniciales tanto en el gasómetro como en el co-oxímetro (porcentaje de metahemoglobina, oxihemoglobina, carboxihemoglobina, pH y carbonatos). El resto del paquete sanguíneo verterlo en un matraz erlenmeyer, con agitación magnética y constante, el matraz junto con el líquido deben estar en baño de hielo manteniendo la temperatura a 4°C, después se le agrega una cantidad equivalente de agua inyectable, y se mantiene la agitación por 15 minutos.

En seguida se pasa la sangre hemolisada a un contenedor para centrifuga. Inmediatamente se centrifuga a 4000 rpm con una temperatura de 4°C, por 30 minutos. Se decanta el sobrenadante en un embudo de tallo largo y a través de gasas estériles. Una vez obtenido la Hb-libre se cuantifican sus parámetros y se adiciona antioxidante (glutatión, N-acetil-cisteína-) en una concentración equivalente a la concentración que resulte de hemoglobina total, además se filtra a vacío en un filtro milipore de 0.22 micras para mantenerlo con el mínimo de contaminación.

Activación del almidón

Por otra parte en un matraz de tres bocas, donde en la primera entrada esta el electrodo del potenciómetro, la siguiente es para el nitrógeno y en la tercera se adiciona almidón en solución, además de cloruro cianúrico. Se burbujea con nitrógeno y se mantiene en agitación constante. También se agrega por goteo hidróxido de sodio (0.1 N) para mantener un pH alrededor de 6, todo esto a temperatura ambiente.

Al término de la agitación se procede a filtrar el compuesto al que le llamaremos almidón activado, con el fin de eliminar residuos de cloruro cianúrico.

Reacción de Hemoglobina almidón

En otro matraz de tres bocas se agrega el almidón activado y poco a poco se va adicionando la hemoglobina libre, las condiciones son similares al paso anterior. Al término de este paso se requiere la cuantificación de los parámetros antes mencionados.

Inmediatamente después de haber terminado este tiempo de agitación, se vierte el contenido del matraz en membranas para realizar una diálisis. La primera

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

diálisis será con agua destilada y durante 24 horas. La segunda también 24 horas pero con solución de diálisis peritoneal. Después de este par de diálisis se procede a medir sus parámetros, filtrar en papel Watman 40 y posteriormente en papel milipore de 0.22 micras

Purificación del complejo.

En una columna con dimensiones de 9 cm. de altura por 2 cm. de diámetro, se colocan 8 cm. de Sephacryl 300. Para equilibrar el Sephacryl 300 de la columna se hacen pasar 250 mL del buffer de fosfatos PBS. La muestra del complejo Hb-almidón que es empleada se diluye, mezclando 400 microlitros de este complejo con 600 microlitros de agua inyectable. A este mililitro obtenido se decanta con mucho cuidado en la columna. Una vez realizado este paso se hacen pasar por goteo 75 mL de PBS que nos servirán como eluyente, las alícuotas que tomaremos serán de un mililitro hasta completar toda la elución. Al terminar este proceso se lavara el contenido de la columna con 125 mL de PBS.

Todas las alícuotas tomadas se cuantificarán en el espectrofotómetro, haciendo un barrido con la absorbancia de 460 a 660 nm y así obtendremos la curva de concentraciones.

Verificación de la pureza del producto obtenido.

La electroforesis se realiza con una muestra de 10 microlitros del complejo Hb-almidón obtenida de la columna más beta-mercaptoetanol, otra muestra de 10 microlitros de hemoglobina libre y se compara con 5 microlitros pesos moleculares estándar. Las condiciones en que se corre el gel de poliacrilamida, sobre un buffer de fosfatos, son 130 minutos, 80 mA y 300 volts.

El gel de acrilamida es preparado a dos diferentes concentraciones: la primera de corrimiento preparada al 7.5%, en donde se utiliza 1500 microlitros de acrilamida bis, 2910 microlitros de agua inyectable, 1500 microlitros de Tris pH 8.8, 60 microlitros de Dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10%, 60 microlitros de Persulfato de amonio (APS) al 10% y 7 microlitros de N, N, N', N'-tetrametiletildiamina (TEMED). La segunda concentración es de 4% que es el gel introductorio, utilizando 390 microlitros de acrilamida bis, 1830 microlitros de agua inyectable, 750 microlitros de Tris pH 6.8, 30 microlitros de SDS al 10%, 30 microlitros de APS al 10% y 7 microlitros de TEMED.

Así se introduce a la cámara de electroforesis este gel y se adiciona el buffer de fosfatos hasta la parte media de la cámara. En seguida se adicionan las muestras a los pozos formados en el gel y se corre a las condiciones otrora mencionadas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Al terminar el corrimiento de las muestras sobre el gel, se extrae de la cámara de electroforesis y se tiñe con el colorante azul de Coomassie durante 20 minutos, al término de este tiempo el gel es depositado en solución decolorante por un tiempo similar al anterior (puede haber dos o más decoloraciones).

En seguida se filtra con vacío la preparación de Hb-almidón en diferentes filtros, primeramente en papel Wattman 40 y posteriormente en papel milipore de 0.22 micras estéril, esto para eliminar bacterias, y así mismo darle esterilidad al producto. Todo esto se confirma realizando cultivos microbiológicos de la muestra, principalmente en agar sangre.

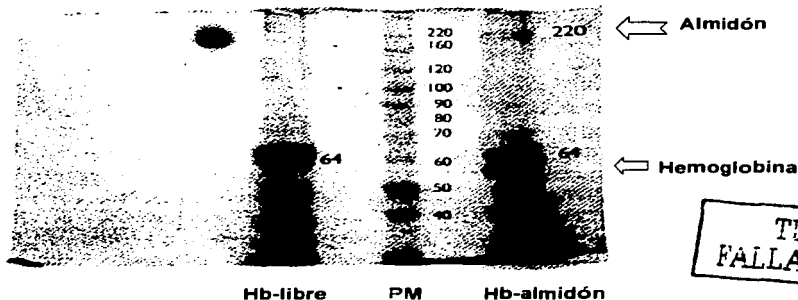
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

7. Resultados.

| Parámetros | Unidades de sangre caduca | Hb-libre | Hb-almidón |
|------------|---------------------------|-----------|------------|
| n | 17 | 17 | 10 |
| THb g/dL | 22.1±3.4 | 11.9±2.8 | 4.8±1.1 |
| %MetHb | 0.9±0.3 | 1.8±0.7 | 2.1±0.9 |
| %O2Hb | 31.6±15.7 | 57.7±25.4 | 74.5±20.6 |
| %COHb | 1.4±0.6 | 1.2±0.6 | 0.8±0.7 |
| %RHb | 64.3±20.6 | 41.7±25.1 | 21.1±20.2 |
| O2Ct vol% | 9.2±4.3 | 8.4±2.5 | 5.3±2 |
| %sO2m | 31.8±15 | 57.4±25 | 89.3±25 |
| O2cap vol% | 29.8±4.3 | 15.3±3.6 | 5.7±2 |
| pH | 6.37 ±0.07 | 6.36 ±0.1 | 6.29 ±0.04 |

Tabla 1. Valores obtenidos durante el proceso del conjugado de del de formación Hb-almidón

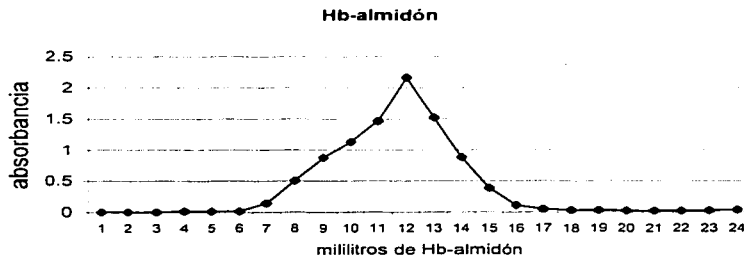
IMAGEN DEL GEL DE POLIACRILAMIDA



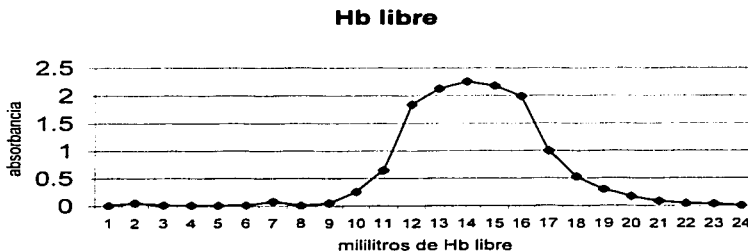
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

| Hb-almidón | | | Hb libre | | |
|------------|--------|--------|----------|--------|--------|
| 0 | 1.1297 | 0.0375 | 0 | 0.2587 | 0.5306 |
| 0.0045 | 1.4659 | 0.0288 | 0.0570 | 0.6467 | 0.2979 |
| 0.0002 | 2.1682 | 0.0228 | 0.0080 | 1.8421 | 0.1694 |
| 0.0158 | 1.5243 | 0.0221 | 0.0023 | 2.1249 | 0.0858 |
| 0.0123 | 0.8842 | 0.0129 | 0.0071 | 2.2548 | 0.0396 |
| 0.0162 | 0.3838 | 0.0278 | 0.0801 | 2.1741 | 0.0329 |
| 0.1455 | 0.1124 | 0.0365 | 0.0006 | 1.9922 | 0.0036 |
| 0.8783 | 0.0460 | | 0.0516 | 0.9995 | |

Tabla 2. Lecturas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm.

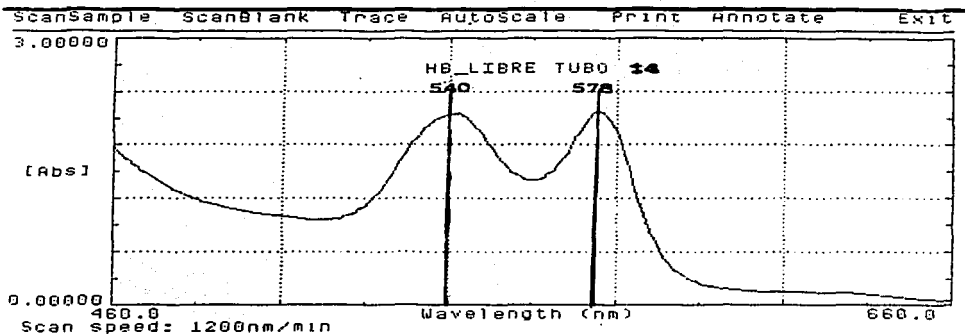


Gráfica 1. Curva de abs.-ml para el complejo hemoglobina-almidón.

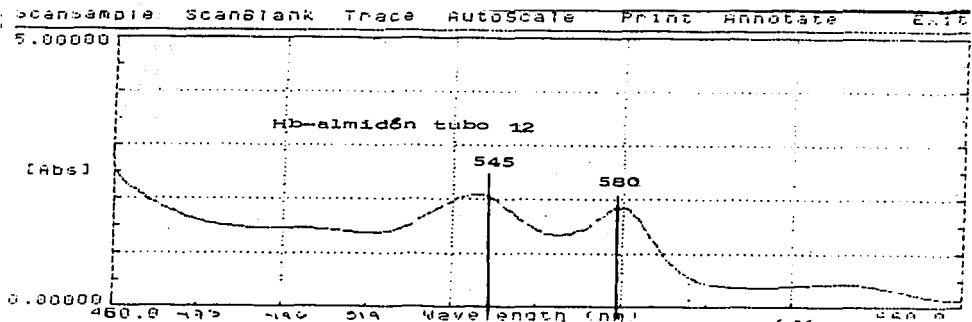


Gráfica 2. Curva abs.-ml para hemoglobina libre

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

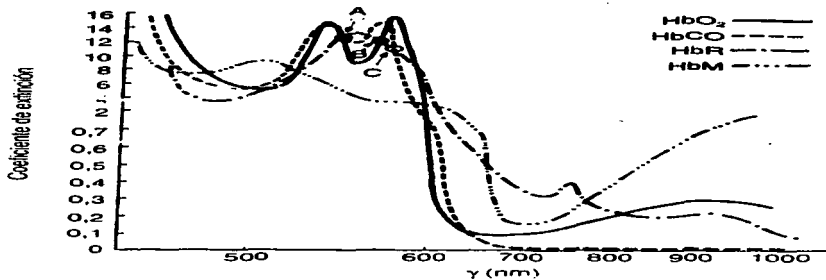


Gráfica 3. Curva de la hemoglobina libre en un barrido al espectro que va de 460 nm un 660 nm.



Gráfica 4. Curva de la hemoglobina-almidón en un barrido al espectro que va de 460 nm un 660 nm.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Gráfica 5. Análisis espectral de la hemoglobina, HbO₂ es oxihemoglobina, HbCO es carboxihemoglobina, HbR es hemoglobina reducida y HbMet es metahemoglobina.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

8. ANÁLISIS DE RESULTADOS.

La secuencia de la reacción muestra la variación en las concentraciones de los diferentes parámetros cuantificados, es notoria la relación que existe entre la disminución en la concentración de hemoglobina total y el aumento en el porcentaje de saturación de oxígeno y de oxihemoglobina en forma casi paralela. De igual forma las concentraciones de coxiemoglobina y hemoglobina reducida tienden a la baja, si se relaciona todo esto en conjunto observamos que las moléculas de hemoglobina están captando oxígeno, alterándose sus condiciones iniciales, y además, si le aunamos que la concentración de metahemoglobina también aumenta es más clara la muestra de la oxigenación de la molécula de hemoglobina. Hay que hacer hincapié en la concentración final del complejo Hb-almidón, la concentración es baja con respecto a la concentración inicial que obtuvimos de los hematies esto es porque no hay un porcentaje alto de unión entre las moléculas y que la hemoglobina libre es separada en la columna cromatográfica y sólo se toma la cuantificación del complejo. Pero esto no importa ya que a falta de concentración se aplica una cantidad mayor de volumen cuando se transfiere a los animales de experimentación.

Es muy importante la variación en el pH, mediante avanza la reacción este va disminuyendo, ya que al utilizarse el cloruro cianúrico como puente químico va liberando los iones cloruro que se unen a los iones hidronio que son también liberados tanto del almidón como de la molécula de hemoglobina, formando ácido clorhídrico (HCl), de ahí que los valores de pH van decreciendo durante la formación del complejo hemoglobina-almidón.

Al realizar el análisis estadístico se observa que los valores de la desviación estándar en algunos casos están muy cercanos a la media, esto debido a que en los experimentos realizados es muy difícil mantener condiciones anaerobias, lo que da como resultado que la molécula de hemoglobina se oxigene más rápido en algunos casos, además los paquetes caducos que se utilizan tienden a ser muy distintos en cuanto a los parámetros entre ellos, debido a esto es la variabilidad que hay entre los resultados y la consiguiente dispersión que muestra la desviación estándar con respecto a la media.

En lo que respecta al gel de poliacrilamida hay tres franjas señaladas como hemoglobina libre, pesos moleculares y hemoglobina-almidón. Al hacer un comparativo entre estos, se toma como base los pesos moleculares, si se observa con detenimiento que hay diferencias entre la franja de hemoglobina libre y la franja de hemoglobina-almidón, en la primera se observan diferentes bandas en la cual la que esta marcada con el número 64, y que es muy evidente, equivale a la hemoglobina ya que este es su peso molecular, las bandas más pequeñas y que aparecen por debajo de la de hemoglobina son fracciones de peso molecular más bajo y que no interesan para fines de este trabajo. Por lo que respecta a la hemoglobina-almidón se observan las mismas bandas otrora señaladas más una que esta por encima del peso molecular de la hemoglobina que es de un peso de 220 kd, esta banda indica la presencia de almidón, de tal manera que estas bandas indican que hay tanto hemoglobina libre como almidón que no se unieron y que están libres; además no se observa la banda que se le puede atribuir al

complejo hemoglobina-almidón ya que esta por encima del peso molecular de los 220 kd.

Tanto la hemoglobina libre como la hemoglobina-almidón fueron sujetos a purificarse por medio de una columna cromatográfica, en la cual los diferentes eluatos fueron sometidos a lecturas en el espectrofotómetro a 540 nm que es la región en el espectro visible en las cuales se detecta la concentración de hemoglobina; se obtuvieron curvas que señalan el máximo de absorción para cada tipo de hemoglobina, observamos que en la gráfica de hemoglobina libre hay un pico máximo de absorción alrededor de los 2.25 siendo mayor al del pico máximo de la hemoglobina-almidón alrededor de 2.16, esto se debe a que al estarse formando el complejo Hb-almidón la concentración de hemoglobina libre decrece, ya que el espectro lo que señala es la concentración de hemoglobina libre que hay en ambos casos. Después de obtener estas lecturas se realiza un barrido que va de los 460 nm a los 660 nm, este barrido es para los eluatos que contienen la absorbancia más alta, por ende la concentración más alta, además indica la pureza que tienen las muestras. Al hacer un comparativo entre las curvas obtenidas y las curvas teóricas determinamos que pertenecen a la curva de oxihemoglobina, que es la que interesa para este trabajo, el comparativo entre ellas muestra una gran similitud tanto en forma como en valores de longitud de onda de las bandas máximas de absorción que se pueden checar en la tabla 6, además de corroborar que la curva de el complejo hemoglobina-almidón difiere un poco tanto en concentración, o sea, valores de absorbancia, como en la longitud de onda de la primera banda de máxima absorción. Todo esto debido a lo señalado anteriormente que es la lectura de hemoglobina libre y la disminución en sus valores debido a la formación del complejo hemoglobina-almidón.

9. CONCLUSIÓN.

En conclusión, se muestra que por medio de esta metodología si es posible unir a la molécula de hemoglobina humana y a la molécula de almidón por medio de un puente químico, dando mayor peso molecular a la hemoglobina, ya que este método es sumamente reproducible, cuantificable, con un tiempo de realización adecuado y de bajo costo en comparación a los realizados en otros países. Además se sienta un precedente en la elaboración de "sangre artificial" demostrando la viabilidad de la unión de este polímero con la molécula de hemoglobina humana, y que sirva como base de posteriores experimentos para obtener un transportador de oxígeno ideal que pueda ser utilizado en seres humanos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

10. REFERENCIAS.

1. Miale J. B. "Hematología". 6ta ed. Ed. Reverté. España, Barcelona 1985:506-508,577-705.
2. Argüelles G. J. "Fundamentos de Hematología". Ed. Médica Panamericana. México, DF. 1994:250-252.
3. Chávez Negrete A. "Sustitución de sangre homóloga por coloide-hemoglobina (sangre artificial) en el choque hemorrágico". Las múltiples facetas de la investigación en salud 2. Ed. Sestante. México, DF. 2002: 27-44.
4. Sonnenwirt C. A. "Métodos y Diagnóstico del Laboratorio Clínico". Ed. Médica Panamericana. Argentina, Buenos Aires 1986:1036-1039.
5. De Venuto F. et al y col. "Characteristic of stroma-free hemoglobin prepared by crystallization". J. Lab. Clin. Med. 1977; 89:509-516.
6. Cerny L. C. et al. y col. "A Hydroxyethyl starch-hemoglobin polymer as a blood substitute". Clin. Hemr. 1982; 2: 355-365.
7. Siu-Cheung T. et al y col. "Soluble dextran-hemoglobin complex as a potential blood substitute". Proc. Natl. Acad. Sick. 1976; 73: 2128-2131.
8. Zerlotti E. et al y col. "Cross-linking of rat tail tendons with Chloro-s-triazines". Nature. 1967; 214:1304-1306.
9. Abuchowsky A. et al y col. "Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol". J. Biol. Chem. 1977. 252, 11: 3578-3581.
10. Cunningham P. G. et al y col. "Oxygen-binding and immunological properties of complexes between dextran and animal haemoglobins". Biochem. J. 1981.193: 261-266.
11. Chang J. E. and Wong T. F. "Synthesis of soluble dextran-hemoglobin complexes of different molecular sizes". Can. J. Biochem. 1977. 55: 398-403.
12. Wintrobe M. M. "Hematología Clínica". 4ta ed. Ed. Interamericana. Argentina, Buenos Aires 1979: 160-169.
13. Dacre J. V. "Hematología Clínica". 4ta ed. Ed. TORAY. España, Barcelona 1990: 31-42.
14. Gillespie R. "Química". Ed. Reverté. España, Barcelona 1990:40-43.
15. "Affinity Chromatography Principles and Methods". Amersham Pharmacia Biotech. Sweden, Uppsala 2001:7-19
16. Pavia D. "Introduction to Organic Laboratory Techniques". 3era ed. Ed. Harcourt Brace College Publishers. EUA, New York 1988:593-611.
17. Bender G. T. "Métodos Instrumentales de Análisis en Química Clínica". Ed. Acríbia. España, Barcelona 1987: 37-40, 77-80.
18. Anderson S. C. "Química Clínica". Ed. McGraw-Hill. México, D F. 1995:74-85.
19. Shapiro A. et al y col. "Manejo Clínico de los Gases Sanguíneos". 5ta ed. Ed. Panamericana. Argentina, Buenos Aires 1996: 29, 31,279-301.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

20. Bauer J. D. "Análisis Clínicos Métodos e Interpretación". Ed. Reverté. España, Barcelona 1986:577,578.
21. Henry J. B. "Diagnostico y Tratamiento Clínicos por el Laboratorio". Tomo 1. 7ma ed. Ed. Salvat. Barcelona, España: 104-107.
22. Colin N. "Interpretación Clínica del Laboratorio". 4ta ed. Ed. Panamericana. Bogota, Colombia: 182,183. 1993.
23. Volihardt C. "Química Orgánica". Ed. Omega. España, Barcelona 1992: 5-33.
24. Brady J. "Química, Biblioteca Científica y Tecnológica". Ed. Ciencia y Tecnología. México, D F. 1990: 143-175.
25. Beger H. "Manual de Química". Ed. Reverté. España, Barcelona 1987: 6-9, 135-157.

ANEXOS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

29-A

ANEXO 1

11. HEMOGLOBINA

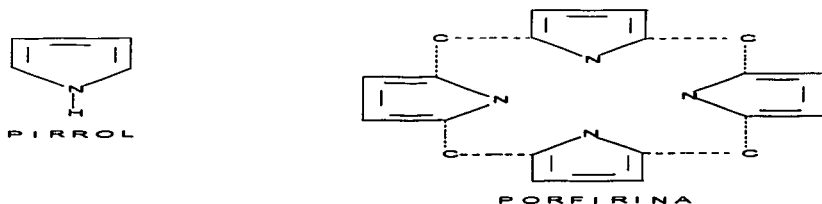
El hecho de utilizar a la hemoglobina como un transportador de oxígeno tiene muchas ventajas y también sus desventajas, de ahí la importancia de conocer las principales características de esta proteína.

La hemoglobina es el componente principal de los eritrocitos y es el responsable del color rojo de la sangre. Un solo eritrocito contiene aproximadamente 280 millones de moléculas de hemoglobina. El peso de la hemoglobina es alrededor de 64,500 veces mayor que las de un átomo de hidrógeno y está compuesto por más de 10,000 átomos de hidrógeno, carbono, oxígeno, azufre y nitrógeno. Además, cada molécula contiene cuatro moléculas de hierro, el factor más significativo en su capacidad de transportar oxígeno. Sin hemoglobina, los organismos grandes no podrían proveer de oxígeno adecuado a sus tejidos ni transportar el dióxido de carbono desde los tejidos a los pulmones.¹²

11.1 QUÍMICA DE LA HEMOGLOBINA.

Análisis químicos y radiológicos han revelado su estructura y han hecho más fascinante el estudio de esta molécula crucial. Cuando se unen cuatro anillos de pirrol en forma cíclica, a través de puentes metileno, se produce la porfirina. Estas sustancias son importantes en los sistemas biológicos, en especial porque son capaces de combinarse con metales. Una teoría básica de la química establece que pueden formarse compuestos químicos a través de uniones covalentes. Estas se forman entre los electrones de dos o más átomos. En general, el ion ferroso tiene seis valencias disponibles. Cuando un ion ferroso (Fe^{++}) se une a una porfirina, cada átomo de hierro está ligado por uniones covalentes de los cuatro nitrógenos de los grupos pirrol. El resultado es una sustancia conocida como hem.¹²

Figura 2. Estructura del pirrol y de porfirina.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los aminoácidos pueden unirse químicamente entre sí para formar cadenas largas. Las cadenas de aminoácidos (cadenas polipeptídicas) se conocen como moléculas proteicas. Cuando se combinan cuatro cadenas de aminoácidos específicos (dos cadenas alfa y dos cadenas beta) se produce la proteína globina. Esta molécula proteica contiene grupos nitrógeno del ciclo imidazol, que son capaces de formar uniones covalentes con iones metálicos.

Cada uno de los cuatro átomos de hierro en la molécula de hemoglobina puede unirse en forma reversible con el oxígeno. Cuando esto ocurre, la hemoglobina cambia de color, es decir, la oxihemoglobina hace que la sangre arterial aparezca color escarlata. La hemoglobina libre de oxígeno imparte un color púrpura a la sangre y se le conoce como hemoglobina reducida. El término reducido es inapropiado ya que, para los químicos, significa que se agregaron electrones a un átomo o grupos de átomos. En realidad, los átomos de hierro en la hemoglobina reducida y oxidada están en la misma condición eléctrica: en estado ferroso. Aunque desde el punto de vista químico es incorrecto, el término hemoglobina reducida se continuará usando para indicar a la molécula de hemoglobina libre de oxígeno.¹²

11.2 ESTEREOQUÍMICA DE LA HEMOGLOBINA.

La teoría química ha reconocido, desde hace tiempo, la posibilidad de que las relaciones espaciales entre las moléculas y los átomos dentro de ellas puedan afectar la actividad química. Pocas moléculas atestiguan esta teoría más que la hemoglobina. Es esencial pensar en esta molécula no solo en términos de química sino también en términos de sus relaciones espaciales tridimensionales. Aunque la estereoquímica de la hemoglobina no está comprendida totalmente, los análisis de difracción por rayos X ha dilucidado las bases sobre las cuales suelen desarrollarse un concepto firme.

Cada uno de los cuatro átomos de hierro en la molécula de hemoglobina se encuentra en el centro del anillo de porfirina y se conoce como hem. A su vez, cada uno de los cuatro grupos hem esta envuelto en una de cuatro cadenas de aminoácidos que constituyen, en forma colectiva, la porción proteica de la molécula (globina). Las cuatro cadenas contienen alrededor de 574 unidades de aminoácidos, que hacen posible que estas cadenas muy largas rodeen las moléculas hem y parezca que las hunden.

Dos de las cuatro cadenas se mueven hacia delante y hacia atrás, de modo que la brecha entre ellas se estrecha cuando se unen las moléculas de oxígeno. En forma inversa, el espacio entre los grupos hem se agrandan a medida que se libera el oxígeno de la molécula. La capacidad de la hemoglobina de combinarse en forma reversible con los átomos de oxígeno aumenta mucho la capacidad de transporte del oxígeno de la sangre, desde los pulmones hacia los tejidos. Así, la entrega de oxígeno a la célula depende en gran medida de la afinidad con la que la hemoglobina se une al oxígeno y lo libera de los eritrocitos.¹²

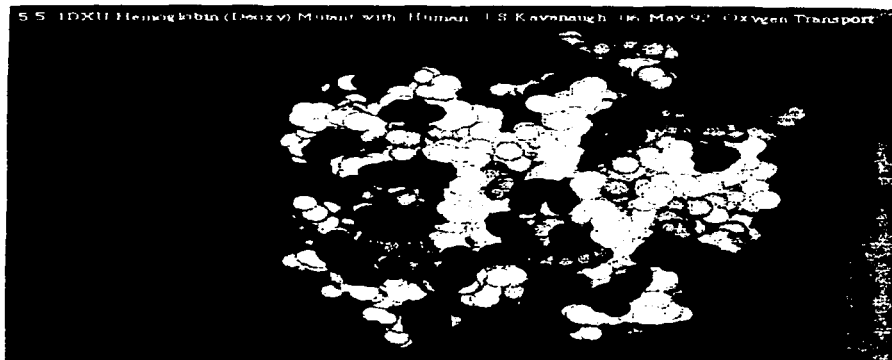


Figura 3. Estructura tridimensional de la hemoglobina

11.3 VARIANTES DE LA HEMOGLOBINA.

En la medicina clínica se encuentran numerosas condiciones que alteran los equilibrios normales hemoglobina-oxígeno. Desde luego, cualquier anomalía en la secuencia de aminoácidos de las cadenas globina (hemoglobinopatías) puede alterar la afinidad con el oxígeno. Además de estas, hay tres casos tan significativos que exigen una consideración específica:

- a) monóxido de carbono
- b) metahemoglobina, y
- c) hemoglobina fetal.

11.3.1 Monóxido de carbono (CO).

El monóxido de carbono es capaz de formar uniones covalentes con el ion ferroso. Cuando esto ocurre en uno o más de los grupos hem se forma la carboxihemoglobina. Los grupos hem así combinados son incapaces de combinarse con el oxígeno, pues el monóxido de carbono ocupa la sexta valencia. La afinidad de la hemoglobina por el monóxido de carbono es de 200 a 250 veces mayor que su afinidad por el oxígeno, además tanto la afinidad por el oxígeno que por el monóxido de carbono se ven afectadas por las presiones parciales de los gases a la que se expone la hemoglobina.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

11.3.2 Metahemoglobina.

Existe metahemoglobina cuando un ion ferroso (Fe^{++}) es oxidado al estado férrico (Fe^{+++}). Este proceso de oxidación hace que la hemoglobina se vuelva de color marrón. La metahemoglobina no puede combinarse en forma reversible con el oxígeno y, por lo tanto, no puede actuar como transportadora de oxígeno. Al igual que la carboxihemoglobina, la metahemoglobina aumenta la afinidad por el oxígeno de los lugares libres de hierro.

11.3.3 Hemoglobina fetal.

La hemoglobina fetal comprende aproximadamente el 85 % de la hemoglobina del feto de término y la diferencia química con la hemoglobina del adulto es la ausencia de las dos cadenas polipeptídicas beta y la presencia de dos cadenas polipeptídicas gamma. Se cree que las cadenas gamma afectan las relaciones fisicoquímicas en tal forma que aumenta la afinidad por el oxígeno. La hemoglobina F se oxida más rápidamente a metahemoglobina que la adulta.¹³

11.4 VALORES CLÍNICAMENTE ACEPTABLES.

Para el clínico que trata de decidir cuando instituir medidas de apoyo cardiopulmonar o intenta estimar la adecuación homeostática cardiopulmonar, pequeñas variaciones de los valores normales de tensión de dióxido de carbono arterial y del pH, no son, con frecuencia, clínicamente significativas. Esto no es más que el reconocimiento del hecho que los pacientes hospitalizados que necesitan mediciones de los gases sanguíneos, están en su mayoría, enfermos seriamente y bajo sospecha de tener varios grados de alteraciones ácido-base, ventilatorias o de oxigenación. Es por esto que se creo el concepto de "rangos aceptables" para la tensión de dióxido de carbono arterial y pH, siendo los siguientes:

pCO₂ = 30-50 mm de Hg.
pH = 7.30-7.50

11.5 SIGNIFICACIÓN CLÍNICA.

La afinidad de la hemoglobina por el oxígeno es afectada por varios factores fisiológicos, como la concentración de hidrogeniones, tensión de dióxido de carbono y temperatura.

En la hipoxemia, sus causas se pueden atribuir a que, la sangre no se intercambia en forma efectiva con el aire alveolar que entra en el ventrículo izquierdo con un contenido de oxígeno menor que la sangre que lo ha hecho adecuadamente. La manifestación clínica más habitual de enfermedad pulmonar es la derivación intrapulmonar y en general es responsable de la hipoxemia arterial que acompaña a la enfermedad pulmonar. Sin embargo es incorrecto aceptar que toda la hipoxemia es causada solamente por el aumento de la

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

derivación intrapulmonar; a menudo, la capacidad cardiovascular limitada (la capacidad de aumentar el volumen minuto cardíaco) está asociada con hipoxemia significativa.

Tomando en cuenta todas estas propiedades indicadas, se aprovechan las propiedades de la hemoglobina. Al hemolizar los eritrocitos debe de estar libre de toda posible contaminación como lo son las partículas de estroma, lípido estromal; ya que esta comprobado que estos residuos de estroma pueden desencadenar la activación de la coagulación. Precisamente al tener la hemoglobina libre es sumamente factible que sea excretada por los riñones, así que investigaciones recientes han podido formar un complejo en la que intervienen la hemoglobina libre y dextranos. Ya que estos son moléculas con alto peso molecular lo cual ayuda a que se retenga más en el organismo y ayude en la captación y distribución de oxígeno por todo el cuerpo.¹³

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANEXO 2

12. CROMATOGRAFÍA.

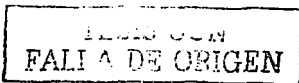
La cromatografía es un método físico, basado en la adsorción selectiva de gases o líquidos en la superficie de sólidos o en sus solubilidades relativas de líquidos, por medio del cual se pueden separar mezclas complejas en sus componentes.

El nombre cromatografía deriva de la palabra griega *chroma*, "color" porque el método se aplicó inicialmente para lograr la separación de sustancias coloreadas constituyentes de plantas.¹⁴

Hay diferentes tipos de cromatografía pero como anteriormente se señaló todos están basados en diferencias de solubilidades de las sustancias y en diferencias entre sus tendencias a ser adsorbidos, es decir, a adherirse a una superficie sólida.

12.1 Tipos de cromatografía.¹⁵

- a. **Cromatografía de adsorción.** Este proceso resulta muy adecuado para la separación y aislamiento de productos naturales coloreados, como los carotenos y clorofilas, que no se pueden separar mediante cristalización fraccionada. Esta clase de sustancias, químicamente similares y generalmente de distinta coloración, poseen en dilución una adherencia muy distinta, pero reversible, sobre determinados agentes de adsorción. Su separación se basa en la distinta velocidad de migración de la sustancia disuelta en el sistema constituido por la fase estacionaria (el agente de adsorción) y la fase móvil (el disolvente). Como adsorbentes se utilizan óxido de aluminio, gel de sílice, carbonato y óxido de calcio, azúcar en polvo y polvo de celulosa, entre otros. La nitidez de la separación de una fase estacionaria se puede mejorar notablemente añadiendo al portador una sustancia que reaccione de forma específica con un componente de la mezcla o que forme un complejo con él.
- b. **Cromatografía en gel.** Este método posibilita la separación de grandes moléculas de otras menores, utilizando como fase estacionaria un gel (Sephadex), que posee poros por los que pueden pasar moléculas pequeñas (difusión por poros). Las moléculas de mayores dimensiones que los poros emigran con el disolvente a través de la columna y aparecen en las primeras fracciones de líquido eluido. Puesto que por este método se separan las moléculas mayores de las más pequeñas, se designa a este tipo de fase estacionaria como tamiz molecular. Esto permite la separación de compuestos con masas moleculares relativas entre 700 y 200 000.
- c. **Cromatografía de reparto.** En este método se hace una aplicación cromatográfica del principio de reparto en contracorriente de Craig, que se basa en el reparto fraccionado de sustancias entre dos fases fluidas parcialmente miscibles, encontrándose la fase estacionaria fijada a un soporte. La fase móvil se bombea, con control de velocidad, a temperatura



constante y presión elevada y al final se determina el compuesto que sale por medio de la fotometría UV. Esta técnica se le denomina **cromatografía líquida de alta presión**, cuya abreviatura es **HPLC**, también es aplicable a la cromatografía de absorción, de intercambio iónico y de gel. Cuando la fase estacionaria contiene agua y como fase móvil se utiliza un disolvente orgánico, la velocidad de migración de las sustancias que se separan aumenta conforme disminuyen sus solubilidades en agua. Se puede utilizar también como fase móvil dióxido de carbono líquido y combinarse con la cromatografía de capa fina.

- d. **Cromatografía en papel.** Una clase especial de cromatografía de reparto es el método de la cromatografía en papel, que resulta especialmente adecuada para la separación de aminoácidos. Como soporte de la fase acuosa actúa la celulosa en forma de papel filtro especialmente preparado, que puede aceptar una humedad de un 6-7%. Una gota de la mezcla de sustancias disueltas se sitúa cuidadosamente en la parte inferior del papel y se seca. El papel se somete, en una cubeta cerrada, al vapor de una disolución saturada de un disolvente orgánico miscible parcialmente con agua. Como consecuencia de la actividad capilar del papel filtro, se adsorbe la dilución y la mezcla de sustancias se separan en una dirección. La relación entre la distancia recorrida por la sustancia desde el punto de partida y la distancia recorrida por el frente del disolvente se denomina **valor R_f**. Este valor depende de distintas variables, como temperatura, composición de ambas fases, constitución del papel, etc. Se pueden obtener cromatogramas de mezclas de sustancias por medio del método ascendente o descendente, así como observar las sustancias aisladas de la mezcla en general desee de ser coloreadas con un reactivo adecuado (revelador), en forma de manchas o anillos, además de utilizar lámparas con luz UV, a partir de cuyo tamaño se puede evaluar la cantidad de compuesto correspondiente.
- e. **Cromatografía en capa fina (CCF).** Se emplea una placa de vidrio o una lámina metálica, que se cubre con una película de unos 250 micrómetros de espesor de un adsorbente. A continuación se realiza de forma análoga a la cromatografía en papel. Por variación y preparación adecuada de la capa de adsorción se consigue el análisis de mezclas de sustancias tanto hidrófilas como lipófilas. La mayor ventaja de este método es, junto a su gran capacidad de separación, la rapidez del proceso que, en general, requiere de solamente 10-30 minutos.
- f. **Cromatografía de gases (GC).** Este proceso de separación se corresponde, en principio, con los métodos cromatográficos tratados hasta aquí, con la diferencia de que el intercambio de sustancias se produce entre una fase gaseosa y una sólida o líquida. Dependiendo del tipo de fase, se distingue entre cromatografía de adsorción de gases y cromatografía de reparto.¹⁵

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

g. Columna cromatográfica.

La columna cromatográfica es una técnica basada tanto en la adsorividad como en la solubilidad. Esta es una técnica de fase de partición sólido-líquido. Los sólidos pueden ser casi cualquier material que no se disuelva en la fase líquida asociada, aquellos sólidos más comúnmente utilizados son la sílica gel, alúmina, etc. Estos compuestos son usados en forma de polvo o en tierra fina.

Si estos polvos se agregan a una solución que contiene un compuesto orgánico, algunos de estos compuestos orgánicos adsorberán algunas partículas de los polvos.

Muchos tipos de fuerzas intermoleculares causan moléculas orgánicas para ligar al adsorbente. Estas fuerzas varían según su tipo. Los compuestos no polares se enlazan al adsorbente usando sólo las fuerzas de Van der Waals. Estas son fuerzas débiles, y las moléculas no polares no se enlazan fuertemente a menos que tengan un peso molecular extremadamente alto. Las interacciones más importantes son aquellas típicas de compuestos orgánicos.

Cualquiera de estas fuerzas como la de dipolo-dipolo o las que involucran interacciones directas como enlaces de coordinación, formación de sal o uniones de hidrogeno. Las fuerzas de interacción varían entre los compuestos. Por ejemplo, una amina fuertemente básica ligaría mas fuertemente que un compuesto que sea básico débil, de hecho, las bases fuertes y los ácidos fuertes actúan reciprocamente a menudo tan fuertemente que ellos disuelven el adsorbente en gran magnitud.¹⁵

Se puede utilizar una regla en la cual se dice que: el grupo funcional más polar, es el que se une más fuertemente al adsorbente. Una regla similar para la solubilidad es la que: los disolventes polares disuelven compuestos polares más efectivamente que los disolventes no polares; y los compuestos no polares son disueltos mejor por los disolventes no polares.

En este tipo de cromatografía la mezcla de compuestos a separar es introducida dentro de una columna que es llenada (empacada) con las finas partículas de los tipos de adsorbentes (esta es la fase sólida estacionaria), el adsorbente es continuamente lavado con un flujo de disolvente (fase móvil) que pasa a través de la columna.

El continuo flujo de disolvente a través de la columna, hace que los solutos (eluatós) fuera del adsorbente se desplacen hacia abajo de la columna, junto con el solvente (eluyente). Al pasar los solutos por el adsorbente, se establece un equilibrio entre el adsorbente, el soluto y el disolvente.

La constante de equilibrio que los diferentes compuestos muestran al estar bajando de la columna difiere en sus proporciones, ya que dependen, por un lado de su relativa afinidad por el adsorbente y por otro el disolvente. Como los

componentes de la mezcla se están separando, comienzan a formar bandas de corrimiento, en la que cada banda contiene un solo componente. Si la columna es bastante grande y los otros parámetros son correctamente escogidos (diámetro de la columna, adsorbente, disolvente, y proporción de flujo), las bandas se separan entre sí, dejando huecos donde sólo hay puro disolvente.

Factores que afectan la separación.

La cromatografía es un sofisticado método de separación de mezclas, pero esta versatilidad depende de varios factores que pueden ajustarse, como:

- Adsorbente
- Polaridad del o de los disolventes
- Tamaño de la columna, dependiendo del material a ser utilizado
- Proporción de elución (o flujo).

Si se utilizan estas condiciones adecuadamente se podrá obtener una separación adecuada de la mezcla. Cabe señalar, que el uso de adsorbentes y disolventes dependerá de la mezcla que se va a separar, utilizando las reglas de polaridad anteriormente señaladas. Dentro de la proporción de flujo también depende que cantidad de muestra se va a separar, ya que es directamente proporcional a la magnitud de equilibrio de la fase estacionaria y la fase móvil. Se pueden mencionar otros aspectos en los que son importantes para obtener una buena separación en la columna, estos son:

- 1) el empaquetamiento de la columna; donde debe estar libre de irregularidades, burbujas de aire y huecos,
- 2) la posición de la columna donde debe estar en posición vertical,
- 3) la velocidad en que esta adicionándose el disolvente, etc.¹⁶

| Absorbentes | Solventes |
|--------------------------------|------------------|
| Papel | Éter de petróleo |
| Celulosa | Benceno |
| Azúcar | Acetato de etilo |
| Sulfato de calcio | Acetona |
| Sílica gel | Etanol |
| Óxido de magnesio | Agua |
| Óxido de aluminio (alúmina) | Acido acético |

Crece la fuerza de interacción hacia los compuestos polares y se incrementa el poder del solvente hacia el grupo funcional polar.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Tabla 3. Adsorbentes y solventes más comunes en la columna.

Hidrocarburos

Éteres

Aromáticos

Cetonas

Aldehídos

Esteres

Alcoholes

Aminas

Ácidos y bases fuertes

Rápidamente (eluye con disolvente no polar)



Orden de elución

Lentamente (necesita un disolvente polar)

Tabla 4. Secuencia de elución de compuestos.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

ANEXO 3

13. ESPECTROSCOPIA.

13.1 PRINCIPIOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS.

Debido a que la espectrofotometría comprende mediciones con detectores de la radiación electromagnética que se transmite, es fundamental conocer las principales características de la radiación electromagnética. La luz es una forma de energía electromagnética comparable con las ondas de un estanque de agua quieta después de dejar caer un objeto. La longitud de onda es la distancia entre pico de onda a otro y varía alrededor de 0.1 nm (10^{-9}), para los rayos gamma, alrededor de 25 cm. para las ondas de radio. La configuración de onda continua de un pico al próximo se denomina ciclo y la frecuencia es el número de ciclos por segundo; la relación entre las dos características es fija e inversa. Las propiedades de energía de la luz se conocen como cuantos. Así, la intensidad de un haz de luz se refiere al número de cuantos generados por segundo.

Los átomos de cualquier molécula vibran constantemente con un patrón que no difiere del de las vibraciones generadas por las ondas de luz. Por lo general, la luz que atraviesa una sustancia que tiene una frecuencia de vibración similar tenderá a ser absorbida. La fracción de luz absorbida en una determinada longitud de onda se denomina coeficiente de absorción específica o coeficiente de extinción, en el que se expresan condiciones prescriptas para factores como pH, temperatura y solventes específicos. Las características de absorción en diversas longitudes de onda pueden ser dibujadas como un espectro, en esencia, un gráfico de la absorbancia de energías electromagnéticas de una molécula a diversas longitudes de onda. La radiación electromagnética consta de rayos gamma, rayos X y ultravioleta (UV), visible, infrarrojo (IR), microondas y ondas de radio. Los rayos gamma tienen mayor energía (longitud de onda corta) y las ondas de radio tienen menor energía (longitud de onda larga). En espectroscopia el término luz describe la forma visible de radiación electromagnética y también las formas de UV e IR de radiación electromagnética que son invisibles. En la mayor parte de los instrumentos de laboratorio de química clínica se emplea la radiación electromagnética UV y visible. Se utiliza la espectroscopia de IR en el laboratorio de toxicología para identificar y confirmar fármacos, o productos químicos tóxicos. Los rayos gamma se usan en contadores de ensayo radioinmunológico.¹⁷

13.1.1. Espectro ultravioleta.

La región ultravioleta del espectro cubre el intervalo de longitudes de onda comprendido entre los 200 nm y los 350 nm. Esta región se denomina ultravioleta por estar compuesta por radiaciones de longitud de onda más corta que la radiación violeta del espectro visible. La radiación ultravioleta es por lo tanto más energética que la visible. El intervalo de longitudes de onda que cubre es

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

pequeño siendo muy importante desde el punto de vista clínico ya que muchos compuestos de interés biomédicos absorben fuertemente esta región del espectro, por tanto este intervalo de longitudes de onda tiene amplia utilidad tanto en análisis cualitativos como cuantitativos. En la región ultravioleta muchos compuestos absorben radiaciones de manera preferente. Esta peculiaridad tiene su origen en el hecho de que la absorptividad molar de un compuesto varía bastante en un amplio intervalo de forma independiente de la concentración y por tanto característica.

Debido a que en la actualidad el análisis cualitativo por comparación es tan común e importante, la gran mayoría de los instrumentos empleados en ultravioleta son de doble haz y con registro incorporado. Los instrumentos con registro hacen posible la obtención de los espectros de absorción convenientemente. Además de los espectrofotómetros con registro, existen espectrofotómetros de haz sencillo y fotómetros de filtro de doble haz, siendo estos últimos, utilizados como detectores en cromatografía líquida.¹⁷

13.1.2. Espectro visible.

La espectroscopia visible es aquella que surge usando las radiaciones electromagnéticas de longitud de onda comprendida entre 380 nm y 800 nm. Se denomina espectroscopia visible porque este intervalo de longitud de onda puede ser detectado por el ojo humano. Si se observan los colores correspondientes a las longitudes de onda de radiación visible estos corresponden a la siguiente tabla 5.

| Intervalo de longitudes de onda de la radiación visible | Color percibido |
|---|-------------------|
| 380-435 nm | Violeta |
| 435-480 nm | Azul |
| 480-490 nm | Azul verdoso |
| 490-500 nm | Verde azulado |
| 500-560 nm | Verde |
| 560-580 nm | Verde amarillento |
| 580-595 nm | Amarillo |
| 595-650 nm | Naranja |
| 650-800 nm | Rojo |

TABLA 5. Colores correspondientes a radiaciones de diversas longitudes de onda.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Es importante recordar que la luz solar y la luz eléctrica son fuentes de radiación policromática, es decir fuentes de luz blanca. El color que se percibe de los objetos generalmente se origina por interacción entre la luz policromática y el objeto. Esta interacción es el resultado de las longitudes de onda no absorbidas y que por lo tanto son reflejadas a nuestros ojos.¹⁷

13.1.3. Radiación infrarroja.

La región infrarroja del espectro electromagnético va de aproximadamente 12500 a 50 cm^{-1} . La región de 4000 a 1000 cm^{-1} se utiliza para analizar compuestos orgánicos. Este análisis se basa en la absorción de energías vibracionales de los enlaces de las moléculas de la muestra. La región de 12500 a 4 000 cm^{-1} no sirve para este tipo de análisis.

13.1.4. Ley de BEER.

La ley de Beer expresa la relación entre la absorbancia, transmitancia porcentual y concentración de una sustancia en solución. Esta ley es una combinación del trabajo de Bouguer, Lambert, Bernard y Beer. Según Bouguer y Lambert la transmitancia luminosa (I/I_0) a través de una solución en una celda se reduce exponencialmente al aumentar la longitud de la trayectoria (diámetro de la celda). Y según Bernard y Beer, la absorbancia de una solución diluida es directamente proporcional a su concentración. Por tanto, mientras más alta sea la concentración de las moléculas de la muestra, mayor será el valor de la absorbancia.

La relación matemática de la ley de Beer en la que participa la energía radiante, la concentración y la longitud de la trayectoria esta dada por:

$$A = \log I_0/I = abc$$

En la ecuación a es una constante de proporcionalidad que se denomina **absortividad**, l es la trayectoria luminosa en centímetros y c es la concentración de la sustancia absorbida. La absorbancia carece de unidades; A es característica de una sustancia y una longitud de onda: $a = A/lc$ y A carece de unidades, las unidades de a son el recíproco de las de l y c .

13.1.5 Desviaciones de la ley de Beer.

La ecuación predice una relación lineal entre la absorbancia y la concentración. Los límites de la ecuación son los valores de la absorbancia igual a cero y los valores de la absorbancia igual a infinito. Así, cuando la ley de Beer se cumple, la representación gráfica de la absorbancia va de cero a infinito. La ley de Beer se cumple frecuentemente. Así pues se preparan las soluciones patrones y se determinan sus absorbancias. Los valores se ajustan linealmente. Ocasionalmente nos encontramos sin embargo con que las representaciones gráficas obtenidas de los valores experimentales no son lineales. Cuando esto ocurre se producen

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

desviaciones de la ley de Beer. Las gráficas que presentan estas desviaciones pueden ser útiles pero inconvenientes, así por ejemplo se requieren mucho más patrones para definir bien la linealidad.

Una de las desviaciones más comunes de la ley de Beer se produce cuando la radiación incidente no es lo suficientemente monocromática. La falta de monocromaticidad conlleva la presencia de radiaciones de longitudes de onda que el analito no absorbe.

Una segunda desviación se produce cuando el compuesto a determinar es fluorescente, otra posible desviación son las causadas por la energía radiante parásita de la luz. También es causa de desviaciones el uso de una longitud de onda inadecuada para el análisis o la originada como consecuencia de la variación en el porcentaje de ionización de un analito débilmente ionizable.¹⁷

13.1.6 Tipos de espectrofotómetro.

A mediados del siglo XVII Isaac Newton observó un "espectro" de color emitido por un prisma expuesto a la luz solar. En el siglo XIX se observó una relación entre los espectros de luz y electricidad, dado que el potencial entre dos electrodos en solución se modificaba cuando uno era iluminado. A comienzos del siglo XX esta observación ha sido desarrollada en una práctica célula fotoeléctrica para la medición de luz absorbida.

Los principios fotoeléctricos permiten traducir la intensidad de la luz en corriente eléctrica, que es la base de los espectrofotómetros modernos. Por ejemplo, una luz de intensidad dada que atravesara una sustancia específica determinaría alguna fracción de luz transmitida a una superficie metálica revestida de óxido. La corriente resultante sería directamente proporcional a la intensidad de la luz transmitida. Abrazando estos principios físicos, la tecnología de estado sólido de la década de los sesentas posibilitó los espectrofotómetros actuales.

Todos los espectrofotómetros tienen básicamente los mismos componentes, aunque la ubicación de los mismos varía según el instrumento. Estos componentes son: la fuente luminosa, monocromadores, filtros, rejilla de difracción, prismas, paso de banda, detector, celdas y detector de lectura.¹⁸

- **Fuente luminosa.** La fuente luminosa proporciona energía radiante que es absorbida por el compuesto que se investiga. Para que la fuente luminosa sea adecuada es necesario que cumpla con los siguientes requisitos:

- a) que produzca un haz de suficiente potencia.
- b) que proporcione un continuo de longitudes de onda en la región de interés y
- c) que sea estable.

La fuente luminosa ideal es una que produce un continuo de todas las longitudes de onda en el rango de interés. La lámpara de tungsteno proporciona un continuo de longitudes de onda en el UV de longitud de onda más larga y las porciones visibles del espectro, también libera cantidades significativas de calor. Es necesario utilizar abanicos

enfriadores para evitar la distorsión de componentes ópticos. La lámpara de tungsteno no se utiliza para realizar mediciones a menos de 350 nm porque a esas longitudes de onda la cubeta de vidrio de la lámpara absorbe luz. Este tipo de lámparas generalmente funcionan a 3000° K. A esta temperatura, parte del tungsteno se evapora del filamento y se deposita en el interior de la cubeta de vidrio en forma de hollín. Este depósito de hollín de tungsteno reduce la intensidad luminosa de la lámpara. En ese momento es necesario sustituirla para evitar modificaciones en el espectro. En espectrofotómetros más complicados se utiliza una lámpara de tungsteno-halógeno. Las lámparas de descarga de hidrógeno y deuterio que producen un espectro de emisión continua en la región UV son las fuentes más empleadas para el rango de longitudes de onda de 195 a 380 nm.

- **Monocromadores.** Los monocromadores se emplean para aislar el rango de longitudes de onda que se desea. En general constan de filtros, rejillas de difracción o prismas, en combinación con rendijas de entrada y de salida. La rendija de entrada del monocromador excluye la luz indeseable o extraña y evita que penetre a este. La rendija de salida sólo permite que atraviese un solo haz angosto del espectro a través de la celda. La eficiencia del monocromador depende del rango de longitudes de onda que pueda producir. Este rango de longitudes de onda se denomina paso de banda o ancho del paso de banda.
- **Filtros.** Los filtros son de dos tipos: de absorción y de interferencia. Los primeros absorben de manera selectiva las longitudes de onda indeseables. Los de interferencia se emplean en instrumentos que efectúan mediciones en determinadas longitudes de onda.
- **Rejilla de difracción.** Una rejilla de difracción es una superficie reflectora altamente pulida que contiene muchas muescas paralelas equidistantes y esquinas puntiagudas. Las rejillas que se emplean en espectrofotometría de UV y visible contienen de 600 a 2 000 muescas por milímetro. Una rejilla de difracción proporciona un ancho de paso de banda angosto y todo un espectro de longitudes de onda. Hay dos tipos de rejillas: las de transmitancia (fabricadas de vidrio) que transmiten luz y las rejillas de reflexión (hechas de aluminio) que actúan como espejos (también llamadas de difracción). La resolución de un espectro que se obtiene de una rejilla depende del número de muescas en la superficie pulida. Cuando la luz incidente choca contra las muescas, se forman muchos espectros diminutos, uno a partir de cada muesca. Los frentes de onda que se forman de estos espectros y se encuentran en fase se refuerzan uno a otro. Como resultado final se obtiene un espectro de líneas paralelas.

- **Prismas.** El prisma dispersa la radiación policromática (luz blanca) y forma un espectro continuo por refracción. Las longitudes de onda más cortas (luz violeta) se refractan más que las longitudes de onda más largas (luz roja) y producen un espectro continuo, no paralelo. En región visible se utilizan prismas de vidrio y en región UV se utilizan prismas de cuarzo o de sílice fundido, porque el vidrio absorbe longitudes de onda por debajo de los 340 nm.
- **Paso de banda.** La mayoría de los cromadores que se emplean en vez de transmitir una sola longitud de onda dejan pasar todo un rango de longitudes de onda. Este se identifica como paso de banda o ancho de paso de banda del instrumento. Mientras más angosto sea el paso de banda más pasa la luz. El paso de banda se define como el rango de longitudes de onda que un monocromador puede aislar entre puntos de un campo espectral, en el cual la transmitancia equivale a la mitad de la transmitancia máxima.
- **Detector.** El detector transforma la radiación electromagnética que transmite una solución en una señal eléctrica. Mientras más intensa sea la radiación electromagnética mayor será la señal eléctrica producida. Se utilizan cuatro tipos de detectores para medir la luz transmitida: la celda de capa de barrera, el fotodiodo de silicón, el fototubo y el tubo fotomultiplicador. La celda de capa de barrera y el tubo fotomultiplicador son los dispositivos que se emplean con mayor frecuencia en la región UV y visible del espectro.
- **Celdas.** Es el recipiente donde se coloca la solución en el instrumento para medir la absorbancia. Se fabrican de vidrio, cuarzo o plástico transparente. Las de vidrio o plástico desechable resultan satisfactorias para su uso en mediciones en la región visible. Para efectuar medidas en la región UV se requieren celdas de cuarzo o sílice fundido porque el vidrio no transmite la radiación UV. Existen celdas de diferentes formas, algunas tienen cortes transversales rectangulares, cuadradas o inclusive redondas. Las celdas de corte transversal cuadrado tienen dimensiones internas diversas, pero la longitud de la trayectoria en general es de 1 cm. Sin importar el diseño para mejorar la precisión y la exactitud la celda debe de estar limpia y libre de rayones, derrames o humedad en la superficie que entra en contacto con la trayectoria luminosa. Además, no deben de quedar burbujas de aire en el interior de la celda.
- **Detector de lectura.** La magnitud de la corriente eléctrica que procede del detector se registra con un medidor, un dispositivo para lectura digital o un registrador (transductor).¹⁸

13.1.7 Espectrofotómetro de doble haz.

Un espectrofotómetro de haz único consiste en un solo paso de luz más los componentes asociados anteriormente señalados. El espectrofotómetro de doble haz tiene los mismos componentes, y se denominan así porque, el valor de la intensidad de la radiación se determina mediante un segundo detector de referencia: los instrumentos de este tipo proporcionan una mayor exactitud que los de haz sencillo, ya que pequeñas variaciones en el valor de la intensidad de la lámpara afectan del mismo modo a ambos, a la muestra problema y a la de referencia.¹⁸

13.1.8 Mantenimiento y calibración.

En el trabajo diario en el laboratorio de análisis clínicos, es conocido que la mayoría de las mediciones químicas se realizan en el espectrofotómetro. Por lo que es muy importante su mantenimiento y calibración.

El tener un espectrofotómetro descalibrado y en mal estado implica entregar resultados erróneos para un paciente, por ello debe verificarse su calibración, así como su mantenimiento preventivo. Según la marca del aparato, nosotros mismos podemos calibrarlo o cuando menos chocarlos y reportarlos para su compostura.

Por procedimientos muy simples y poco costosos, se puede revisar el funcionamiento del aparato. Cabe mencionar, que no son métodos muy modernos ni muy exactos, pero nos dan una muy buena idea de su funcionamiento siendo entonces posible detectar los principales problemas que pueden ocurrir al mismo. Dentro de estas pruebas podemos mencionar a:

- o El disco de Newton
- o Linealidad espectrofotométrica
- o Exactitud espectrofotométrica, y
- o Calibración de cubetas.

13.1. 9 Identificación Espectroscópica.

La hemoglobina y los compuestos hemoglobínicos absorben luz del espectro visible. En general, la absorción de luz de longitud de onda corta es mayor que la de longitud de onda larga. Cada compuesto absorbe luz de diferente longitud de onda, según la coloración característica de algunos de los compuestos y de las bandas de absorción específicas observadas con el espectroscopio y el espectrofotómetro. Las bandas representan zonas de absorción máxima, determinadas por la valencia del hierro de la molécula y por el tipo de enlaces químicos. Los compuestos férricos con enlaces iónicos paramagnéticos (hemina, hematina y metahemoglobina), tienen bandas de absorción de la región encarnada del espectro; los compuestos férricos con enlaces covalentes diamagnéticos (cianometahemoglobina y hemicromos), muestran bandas en la región verde; y los compuestos ferrosos con enlaces diamagnéticos covalentes (heme, oxihemoglobina y carboxihemoglobina) poseen dos bandas intensas en la región amarillo-verde del espectro. Los productos de degradación de la hemoglobina que

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

no contienen hierro ni globina, también cuentan con espectros de absorción característicos.

El análisis espectroscópico aporta un método sencillo para identificar varios compuestos. La obtención de resultados óptimos depende del empleo metódico y sistemático del análisis, del uso de reacciones químicas conocidas y de la experiencia en la utilización del instrumento. Debe dedicarse especial atención a la anchura de la rendija, a la fuente de luz y a la concentración de la solución que se examina. Ya que, pigmentos anormales con la oxihemoglobina a menudo se presentan mezclados, sus bandas pueden ser enmascaradas por las de la oxihemoglobina; por ejemplo, las bandas de carboxihemoglobina y de la mioglobina son indistinguibles de las de la oxihemoglobina, a menos que se use una lámpara de mercurio. Otro factor limitante es la concentración del compuesto anormal y la intensidad de sus bandas de absorción, siendo de esta manera que varios investigadores han propuesto métodos para preparar fracciones conocidas de pigmentos hemoglobinicos y para determinaciones cuantitativas.¹⁸

| COMPUESTO | ALFA | BETA | GAMMA | DELTA |
|-----------------------------------|------|------|-------|-------|
| Oxihemoglobina(HbO ₂) | 578 | 540 | | |
| Hemoglobina reducida (Hb) | 556 | | | |
| Carboxihemoglobina(HbCO) | 572 | 535 | 540 | |
| Sulfohemoglobina | 618 | 578 | 540 | 500 |
| Metahemoglobina | 630 | 578 | | |
| Cianometahemoglobina | 540 | | | |
| Metahemalbúmina | 623 | 540 | 500 | |
| Hematina ácida | | | | |
| en éter | 638 | 582 | 540 | 505 |
| en N/10 HCl | 662 | | | |
| en ácido acético | 630 | | | |
| Hematina alcalina | 610 | | | |
| Protoporfirina | | | | |
| alcalina, N/10 NaOH | 645 | 591 | 540 | 504 |
| ácida, 25% HCl (p/v) | 602 | 557 | | |
| Uroporfirina | | | | |
| alcalina N/10 NaOH | 612 | 560 | 539 | 504 |
| ácida, 25% HCl (p/v) | 596 | 577 | 554 | |
| Coproporfirina | | | | |
| alcalina, N/10 NaOH | 612 | 568 | 538 | 504 |
| ácida, 25% HCl (p/v) | 594 | 574 | 551 | |

TABLA 6. Longitudes de onda de las bandas de máxima absorción de la hemoglobina y compuestos con ella relacionados.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

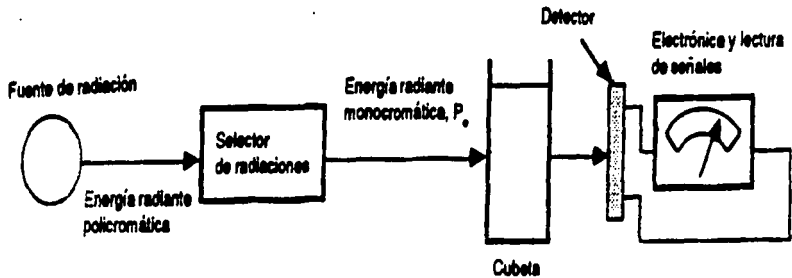


Figura 4. Esquema simplificado de la trayectoria óptica de un instrumento utilizado en espectrofotometría.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANEXO 4

14. CO-OXIMETRÍA Y GASOMETRÍA.

La oximetría es un término general que se relaciona con las diversas tecnologías capaces de medir la saturación de la oxihemoglobina (HbO_2). En la actualidad hay tres tecnologías que aportan datos oximétricos en la práctica clínica:

- 1) oximetría de pulso para medición no invasiva de la saturación de oxihemoglobina.
- 2) espectrofotometría para análisis in vitro de moléculas de hemoglobina y
- 3) oximetría con fibra óptica para la determinación in vivo de la saturación de la oxihemoglobina.

Toda la oximetría se basa en principios espectrofotométricos que miden porciones de luz transmitida o absorbida por la molécula de hemoglobina.¹⁹

14.1. Análisis espectral de la hemoglobina.

La molécula de hemoglobina existe en diversas formas, cada una de estas formas tiene su propio espectro de luz. Para minimizar el desplazamiento espectral durante el análisis, se pueden utilizar fuentes de luz que contengan emisiones fuertes de determinadas longitudes de onda para las diversas formas de hemoglobina. Estas se denominan fuentes de luz lineal espectral.

Medir la absorbancia en dos longitudes de onda diferentes es un método apropiado para determinar dos de las fracciones de la hemoglobina, tres mediciones de longitud de onda para tres fracciones y cuatro mediciones de longitud de onda para cuatro fracciones de la hemoglobina. Las longitudes de onda específicas en las que se toman las mediciones suelen ser elegidas de modo tal que la longitud de onda sea una diferencia máxima entre los coeficientes de extinción de las fracciones de interés y la otra sea el punto isobéptico (es decir, los coeficientes de extinción son iguales). Se supone que la absorbancia media es causada por las fracciones de hemoglobina de interés y por ninguna otra sustancia. Sin embargo, en la práctica esto no es siempre cierto y puede inducir a determinaciones erróneas.

Los glóbulos rojos incompletamente hemolizados pueden dispersar la luz y provocar mediciones erróneas. La presencia de lípidos en la muestra dispersa luz y distorsiona las absorbancias medias. Los colorantes intravenosos como azul de metileno y verde de indocianina, absorben con intensidad la luz cercana a la infrarroja, lo que determina un valor de oxihemoglobina más bajo que el real en esta región. La presencia de carboxihemoglobina ($HbCO$) no será detectada con un método de longitudes de onda para HbO_2 en la región infrarroja porque el coeficiente de extinción de la $HbCO$ es muy bajo en esta región. La presencia de $MetHb$ en una muestra limita la confiabilidad de las mediciones, incluso con un método de cuatro longitudes de onda destinado a esta fracción. Cuando la concentración de $MetHb$ es superior al 10% los valores son sospechosos. Todos los métodos se basan en los coeficientes de extinción adultos. La presencia de

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

hemoglobina fetal ejercerá diversos efectos sobre los métodos, por cuanto el espectro de hemoglobina fetal difiere del espectro adulto. El efecto sobre los resultados depende de la magnitud de la variación entre las extinciones fetal y adulta en las longitudes de onda usadas para las mediciones de absorbancia.¹⁹

14.2. CO-OXÍMETRO.

Los co-oxímetros modernos son espectrofotómetros que analizan de modo simultáneo cuatro fracciones de la hemoglobina: hemoglobina reducida (RHb), oxihemoglobina (HbO₂), carboxihemoglobina (HbCO), y metahemoglobina (MetHb). Los componentes básicos de un co-oxímetro son una fuente de luz, una serie de lentes fijos, filtros, espejos que enfocan el haz de luz, una cubeta o cámara de muestra, un elemento monocromático que aísla las longitudes de onda de interés usando filtros o parrillas, y detectores fotodiodos que emiten electrones en proporción con la cantidad de luz que incide en las superficies. Los electrones emitidos (corriente) alimentan un circuito cuya energía de salida (output) es proporcional a la absorbancia relativa de la muestra.

14.2.1. Principio de operación.

Según el fabricante, los co-oxímetros obtienen y almacenan lecturas de absorbancia en una solución control en cuatro o más longitudes de onda diferentes: &1, &2, &3 y &4 nm. Por lo general, las absorbancias control se actualizan cada 30 minutos de desuso o después de cada muestra.

Cuando se introduce una muestra diluida y hemolizada se obtiene una lectura de absorbancia en cada longitud de onda. Las correspondientes absorbancias control son restadas de estas mediciones y las cuatro absorbancias resultantes son multiplicadas por el coeficiente de extinción apropiado para obtener las concentraciones.

El co-oxímetro es el método existente más exacto para medir las cuatro fracciones de la hemoglobina clínicamente importantes y es considerado el estándar contra el que se deben comparar otros métodos. El co-oxímetro el esta reglamentado por la Enmendaduras de Mejora de Laboratorio Clínico (CLIA) de 1988 y su uso debe cumplir contra la los estándares enumerados en esta reglamentación.¹⁹

14.2.2 Limitaciones del co-oxímetro.

Como se mencionó antes, el colorante azul de metileno tiene una absorbancia pico en la región infrarroja cercana a la roja y afectará las mediciones de los métodos de oximetría que usan estas longitudes de onda en la región roja e infrarroja. Sin embargo, el error es bastante menor con los co-oxímetros que utilizan longitudes de onda en las regiones cercanas a la roja y en la visible porque la cercana a la roja es sólo una de las varias absorbancias usadas para cuantificar las fracciones de la hemoglobina.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cualquier sustancia de la muestra que disperse luz afectará las mediciones del co-oxímetro porque la cantidad de luz transmitida ya no es sólo una función de la luz absorbida por las fracciones de la hemoglobina. Los lípidos y los fragmentos celulares resultantes de la hemólisis incompleta son las causas más comunes de errores de este tipo.¹⁹

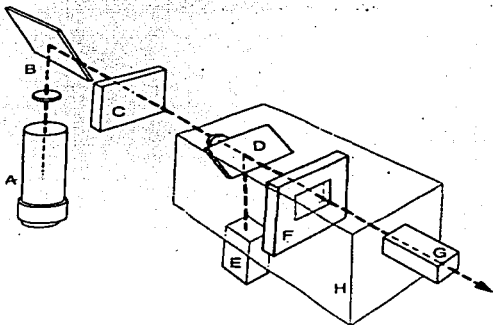


Figura 5. Componentes básicos de un co-oxímetro. A, fuente de luz; B, lente y espejo; C, elemento monocromático; D, divisor del haz; E, detector de referencia; F, cubeta; G, detector de muestra; H, bloque regulado por temperatura.

14.3. Análisis gasométrico.

Se utiliza como un medio de evaluación del equilibrio ácido-base de los pacientes y del funcionamiento de los alvéolos pulmonares en el intercambio de gases. Las medidas se realizan corrientemente con sangre arterial extraída anaeróticamente. La sangre capilar que ha sido "arterializada" por calentamiento intensivo del área de extracción durante 10 minutos antes de extraer la muestra, constituye un procedimiento alternativo bastante aceptable, se hacen las mediciones sobre sangre total heparinizada en un instrumento en el espacio de algunos minutos después de extraída en 20-30 minutos si la muestra se coloca en hielo para reducir la velocidad del metabolismo celular.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Se pueden realizar análisis químicos mediante la medida de la cantidad de gas liberado de una reacción; en teoría se puede utilizar cualquier reacción química que produzca una cantidad estequiométrica de gas. Han sido desarrollados algunos métodos empleando esta técnica, pero en los últimos años los métodos gasométricos han sido limitados principalmente a la determinación de los gases combinados con la sangre: oxígeno, dióxido de carbono y monóxido de carbono.²⁰

El gas liberado de la sangre por un reactivo adecuado se extrae por agitación con vacío parcial. La cantidad de gas expulsado se mide entonces por comparación del mismo a un volumen definido conocido, y midiendo la presión absoluta ejercida por el gas. De acuerdo con las leyes de los gases:

$$PV = nRT$$

donde P es la presión del gas, V es el volumen, n el número de mol de gas presente, R una constante que depende de las unidades de medida utilizadas y T la temperatura absoluta ($^{\circ}\text{C} + 273$).

La presión medida es debida no sólo al gas que se va a determinar, sino también a la presión de vapor de agua; dicha presión de vapor de agua puede variar no sólo con la temperatura del líquido, sino también con la cantidad de sales disueltas en la disolución acuosa. Aún cuando se realiza la determinación empleando la diferencia de presión antes y después que se haya medido la absorción del gas, la presión de vapor de agua puede variar ligeramente entre las dos medidas debido al reactivo añadido. Finalmente, los gases pueden no seguir exactamente las leyes de los gases perfectos y las correcciones para estas desviaciones se incluyen todas en los factores dados para los cálculos de la cantidad de gas a partir de la presión medida. Los factores también incluyen el volumen de muestra tomado y son aplicables sólo cuando se siguen exactamente las directrices del trabajo en cuanto a volúmenes de muestra y reactivos.²⁰

Las determinaciones de pH, $p\text{CO}_2$, y $p\text{O}_2$ se efectúan con los analizadores de gases sanguíneos, que en esencia están compuestos de electrodos de diseño especial contenidos en una cámara controlada termostáticamente. Tres décadas de desarrollo han producido instrumentos altamente automatizados, autodiagnósticos y de mínimo mantenimiento que no sólo calculan el bicarbonato, el exceso/déficit de base y las correcciones según la temperatura sino que también presentan interfase con sistemas de computación que permiten el almacenamiento de los datos, el análisis de tendencias, la interpretación de los gases sanguíneos y otros algoritmos.²¹

Aunque las características varían entre los mismos fabricantes, los principios de sus electrodos y procedimientos analíticos respectivos son sumamente similares.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

14.3.1 Electrodo de pH.

Cuando dos soluciones de diferente pH son separadas por una membrana de vidrio sensible al pH se crea una diferencia de potencial que puede ser determinada como un cambio de voltaje a través de la membrana. Se utilizan *medias células químicas* para determinar la diferencia de potencial. La *media célula de referencia* consiste en un electrodo que suministra un voltaje de referencia constante y suele estar formada por mercurio-cloro mercurioso (calomel), alojado en un compartimiento lleno de solución de cloruro de potasio (KCl). La *media célula medidora* es el electrodo de Sanz, compuesto por lo general por una sustancia de plata-cloruro de plata incluida dentro de una cámara buffer 6.84. Un puente de contacto consistente en solución de KCl, completa el circuito electrónico y un voltímetro detecta la diferencia de potencial generada a través de la membrana de vidrio.²¹

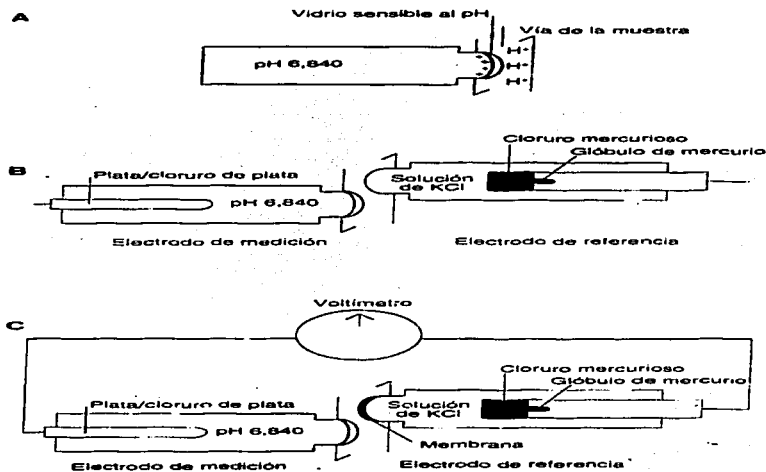


Figura 6. Principios básicos del electrodo de pH.

14.3.2 Electrodo de pCO₂.

El electrodo de pCO₂, que fue introducido por primera vez por Stowe y col. Y modificado por Severinghaus, determina las tensiones de dióxido de carbono permitiendo que el gas CO₂, sufra una reacción química que produce hidrogeniones. La producción de hidrogeniones genera una diferencia de potencial que es medida por células similares a las del electrodo de Sanz. Tanto las medias células de referencia como las de medición del electrodo de pCO₂ están compuestas por plata-cloruro de plata. La membrana de vidrio sensible al pH está separada de la muestra de sangre por una membrana elástica de siliconas y por un espaciador de nylon saturado con una solución de bicarbonato que llena constantemente la solución en el extremo del electrodo y el espaciador.

La ley de Henry afirma que el volumen de gas que difunde a través de una membrana permeable es directamente proporcional al gradiente de presión. Como muestra la figura 7, si existe un gradiente de presión parcial de dióxido de carbono a través de una membrana permeable con una solución acuosa de bicarbonato a cada lado, el dióxido de carbono que ingresa en la solución sufre una reacción química predecible:

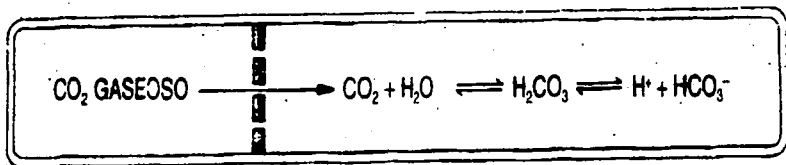
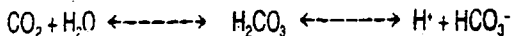


Figura 7. Principio básico del electrodo de pCO₂.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La concentración de hidrogeniones producidos es directamente proporcional a la PCO_2 en contacto con la membrana.²¹

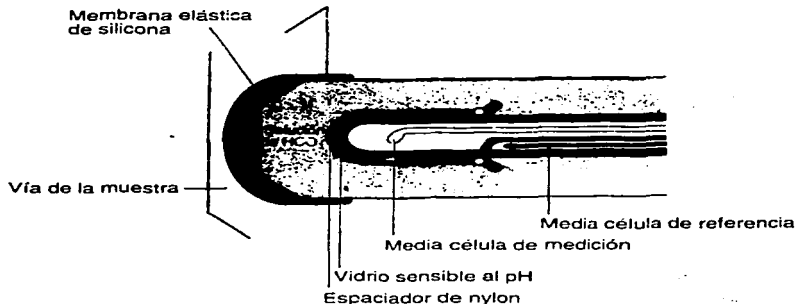


Figura 8. Ilustración esquemática del electrodo de pCO_2 .

14.3.3 Electrodo de pO_2 .

El electrodo de Clark es un dispositivo polarográfico que mide tensiones de oxígeno por reacciones de óxido/reducción, proceso químico que genera corrientes eléctricas medibles. El electrodo polarográfico consiste en un cátodo de platino y un ánodo de plata inmersos en una solución electrolítica. El electrodo de Clark está bañado por una solución electrolítica con una membrana de polipropileno permeable al oxígeno que cubre el extremo del cátodo. Se requiere un voltaje polarizante externo de alrededor de -0.6 V para minimizar la interferencia de otros gases, que también pueden ser reducidos y maximizar la reducción del oxígeno.

La pérdida de electrones en una reacción química se conoce como oxidación y tiene lugar en el ánodo. La ganancia de electrones en una reacción química se define como la reducción y tiene lugar en el cátodo. Un ánodo de plata inmerso en una solución electrolítica oxida la plata, lo que genera un flujo constante de electrones (corriente):



TESIS CON
FOLLA DE ORIGEN

Un cátodo de platino adyacente reaccionará químicamente con oxígeno para formar iones oxidrilo (O^-H), una reacción de reducción que usa electrones:



Por lo general, a medida que se consumen electrones en el cátodo se acelera la reacción del ánodo. El volumen de oxígeno reducido será directamente proporcional al número de electrones utilizados en la reacción del cátodo. Por consiguiente, midiendo el intercambio de corriente, es posible determinar la cantidad de oxígeno que difundió a través de la membrana hacia la solución electrolítica.²¹

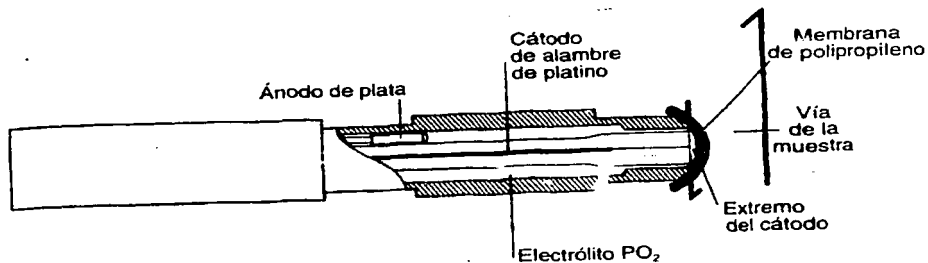


Figura 9 .Ilustración esquemática del electrodo de Clark.

14.4 Calibración.

La calibración establece una relación entre la respuesta (output) del electrodo (en milivoltios o en nanoamps) y las unidades en las que los parámetros medidos son expresados (unidades de pH y milímetros de mercurio para pCO_2 y pO_2). Además este es un proceso que asegura que las respuestas de los electrodos son funciones de la actividad analítica o concentración de pH, pCO_2 y pO_2 de las muestras analizadas. Se realiza introduciendo estándares de calibración de pH, pCO_2 y pO_2 conocidos en los respectivos electrodos y ajustando las lecturas del analizador a los valores conocidos. Los estándares de calibración de la mayor

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

parte de los analizadores son buffer para el electrodo de pH, y gases conocidos, corregidos según la presión barométrica, para los electrodos de PCO_2 y PO_2 .

La calibración de un punto es un ajuste de la respuesta electrónica a un solo estándar. Esto se debe efectuar antes de cada análisis de muestra o cada 30 minutos. Una calibración de dos puntos ajusta la respuesta electrónica a 2 estándares. Esto se debe realizar cada 2 a 8 horas y después del mantenimiento y medidas de reparación del electrodo. Estos procedimientos de calibración son funciones automáticas en la mayor parte de los analizadores modernos de gases sanguíneos. En los sistemas mínimamente automatizados el usuario debe practicar los procedimientos cumpliendo de modo estricto a las instrucciones del fabricante y los periodos recomendados.²¹

14.4.1 Calibración de pH.

Existen varias soluciones buffer para la calibración de pH. Las soluciones seleccionadas deben poder ser identificadas como soluciones o métodos de referencia del Instituto Nacional de Normas y Tecnología (NIST) o de la Federación Internacional de Química Clínica (IFCC). Siempre que sea posible se deben de usar las soluciones producidas por el fabricante, que suelen satisfacer este requerimiento porque son las que mejor estiman las variaciones sutiles en la composición del electrodo y cumplen las exigencias para rendimiento uniforme.

La calibración de un punto cumple el mismo proceso que la calibración de los dos puntos, excepto que solo se utiliza el buffer casi-normal. El proceso de calibración de dos puntos consiste en introducir dos buffer en secuencia, el primero tiene un valor casi normal y es el punto de equilibrio; el segundo tiene un valor aproximado de 6.84 y es la pendiente. El análisis de cada buffer es monitoreado por una computadora y, si se satisfacen las especificaciones programadas, los valores analizados son ajustados automáticamente a los previstos mediante componentes electrónicos.²¹

14.4.2 Calibración de pCO_2 .

El electrodo de pCO_2 puede ser calibrado introduciendo y analizando un gas conocido directamente o equilibrando primero en una solución acuosa, de suero o sangre, e introduciendo y analizando después el líquido. Uno u otro método dependen del conocimiento del contenido exacto del gas. Estos estándares gaseosos se preparan comercialmente mediante dispositivos de mezcla de grado analítico o por métodos gravimétricos.

Las concentraciones de gases utilizadas habitualmente para la calibración de dos puntos del electrodo de pCO_2 son 5% para el equilibrio y 10% para la pendiente. La concentración del 5% también se usa para la calibración de un punto. El análisis de la concentración de cada gas y el monitoreo y el ajuste ulteriores son los mismos que los descritos para el electrodo de pH.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

14.4.3 Calibración de pO_2 .

Dos factores complican la calibración del electrodo:

- 1) el factor del gas sanguíneo - un gas introducido directamente a la cámara del electrodo determina una lectura más alta que el mismo gas equilibrado con la sangre e introducido después en la cámara del electrodo- y
- 2) la medición de la pO_2 no es lineal en el espectro de 0 a 600 mm de Hg. El método que suele emplearse para la calibración de este electrodo es similar al utilizado para el electrodo de pCO_2 . Por lo general se utilizan concentraciones de oxígeno del 0% para la pendiente y del 12% o el 20% para el equilibrio. El proceso de calibración es el mismo que el descrito para el electrodo de pH.²¹

14.4.4 Precisión del electrodo.

Los analizadores de gases sanguíneos tienen especificaciones del fabricante que expresan la confiabilidad del electrodo, siempre que se cumplan las instrucciones del fabricante respecto a la calibración, el mantenimiento y la introducción de la muestra. En teoría, el mantenimiento y la calibración correctos asegurarían la confiabilidad; sin embargo, éste no es el caso en la práctica y es necesario adoptar medidas adicionales.

14.4.5 Errores de calibración.

El output (respuesta) del electrodo es predecible con cierto grado de variabilidad inherente al dispositivo. Los fabricantes determinan estas variabilidades y después programan desviaciones aceptables de la respuesta prevista en su microprocesador analizador. Así, el microprocesador monitorea las respuestas durante la calibración para:

- 1) respuesta lenta del electrodo,
- 2) respuesta estable del electrodo pero en un valor significativamente diferente al anticipado y
- 3) respuesta inestable. En presencia de cualquiera de estas condiciones aparecen mensajes de error apropiados y la calibración es rechazada.

El microprocesador es programado para monitorear los procedimientos de calibración dentro de los límites claramente definidos. Las desviaciones recurrentes que están dentro de las especificaciones determinarán calibraciones aceptadas que, con el tiempo, introducirán un error de sesgo en el análisis de muestras ulteriores. Este tipo de error de calibración, indetectable para una computadora, se pondrá de manifiesto por un sistema de control de calidad apropiado. En todos los casos de error de calibración, sean detectados por microprocesadores o por control de calidad, se requiere la intervención del operador para identificar el problema e iniciar las maniobras de corrección.²¹

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

14.4.6 Fuentes de error de la calibración.

Las fuentes de errores de calibración y las correspondientes maniobras correctivas son enumeradas en las guías del fabricante para reparación de problemas. Los errores más comunes son:

- 1) concentraciones inexactas de gases,
- 2) lecturas inexactas del barómetro,
- 3) velocidades de flujo de gas demasiado altas o demasiado bajas,
- 4) insuficiente limpieza (acumulación de proteínas),
- 5) factor de gas sanguíneos y
- 6) buffer contaminado.

14.5 Control de calidad.

El control de calidad es difícil de realizar de forma correcta. El instrumento más exacto queda desprovisto de todo valor si el espécimen ha sido obtenido o transportado de forma incorrecta, por lo que es indispensable que en todos los casos el laboratorio trabaje con un espécimen adecuado. Tanto el control de calidad como el mantenimiento preventivo deben de realizarse de acuerdo a un plan regular.

Un método de control de calidad para un laboratorio consiste en realizar determinaciones por duplicado de cada espécimen de sangre. Todos los resultados anormales se confirman en un instrumento diferente y se registran. Si dichos resultados concuerdan, se da el resultado del primer instrumento; sino concuerdan en el ámbito del 5% se analiza el espécimen en un tercer instrumento. A continuación se dan los resultados de los dos instrumentos que coinciden dentro del 5%. Acto seguido se procede a realizar las investigaciones necesarias para corregir el instrumento que da valores inaceptables.

Otros métodos de control de calidad incluyen la determinación del aire ambiental inyectado en la máquina, la determinación de agua equilibrada a 37°C con aire ambiental y la comprobación del canal del CO₂ por otro método.

Tres importantes métodos de control de calidad que deberían usarse utilizan ampollas comerciales que contienen soluciones tamponadas de bicarbonato, sangre equilibrada con tonómetro o soluciones de bicarbonato.²¹

14.6 Analizadores sanguíneos modernos.

Los analizadores de gases sanguíneos actuales han evolucionado hasta convertirse en aparatos muy sofisticados. Se han maximizado la estabilidad, la uniformidad y la velocidad mediante los diseños de electrodo y cámara y por el control del microprocesador de los procesos de análisis y calibración. Varios modelos han sido ampliados para incluir electrodos selectivos de iones para determinaciones de sodio (Na⁺), potasio (K⁺), cloruro (Cl⁻) y calcio (Ca⁺⁺) y mediciones de conductividad eléctrica de hematocrito en una sola muestra, cuyo volumen se mide en microlitros. Otros han combinado un analizador de gases sanguíneos y un co-oxímetro en una sola unidad. Otros han miniaturizado y reformado los electrodos tradicionales en sensores electroquímicos que forman

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

parte de una unidad de medición tipo jeringa o están impresos en una placa de computadora.

La vasta mayoría de los analizadores de gases sanguíneos existentes en el mercado actual están clasificados o han sido reclasificados en "moderadamente complejos" según la CLIA de 1988. Desafortunadamente, esto ha inducido a algunos usuarios al error de pensar que las determinaciones de gases sanguíneos se obtienen sólo introduciendo muestras y oprimiendo botones. En realidad, el control de calidad, la seguridad de la calidad y las medidas correctivas exactas forman parte integral de las mediciones de gases sanguíneos exactas y estos procedimientos dependen del operador.²¹

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANEXO 5

15. ELECTROFORESIS.

La electroforesis es el procedimiento de laboratorio que permite discriminar la composición química de un conjunto de elementos en sus fracciones. Se basa en el desplazamiento de las partículas coloides que a causa de sus diferentes velocidades de migración, se desplazan hacia el ánodo o el cátodo, por influencia del campo eléctrico.

Se han empleado muchos soportes materiales por ejemplo, papel cromatográfico, gel de almidón, gel de dextrano, acetato de celulosa, gel de poliacrilamida y gel de agarosa, si bien los materiales más utilizados son el acetato de celulosa y el gel de agarosa. El acetato de celulosa es el más común de los dos.

En electroforesis es generalmente muy importante el control del pH, por ello se utiliza una solución tampón de pH apropiado en lugar de agua sola. Las tiras o geles utilizados son embebidos en el tampón antes de su uso y se montan posteriormente en una cubeta. La solución tampón de los compartimientos, catódico y anódico, es la misma que el tanque central, pero dichos compartimientos están aislados eléctricamente del tanque central por barreras de plástico. Los electrodos están constituidos por hilos de platino.²²

15.1 ELECTROFORESIS EN GELES.

El primer medio estabilizante empleado en electroforesis fue el papel. El papel sufre un intenso efecto electrodosmótico y no es conveniente para lecturas densitométricas por su naturaleza opaca. El acetato de celulosa sufre menos este efecto y puede ser convertido en una película transparente después de su uso. Por estas propiedades, el acetato de celulosa se ha convertido en el medio estabilizante patrón de los laboratorios clínicos. Además es adecuado para la separación de proteínas séricas en cinco fracciones.

Recientemente se ha podido comprobar que cada una de las fracciones obtenidas en acetato de celulosa, es en realidad, una mezcla compleja de proteínas. Debido a la posterior necesidad de separar estas mezclas, los investigadores han encontrado otros medios estabilizantes. Los materiales que han demostrado ser más útiles son los geles de agarosa y los geles de poliacrilamida.

El gel de agarosa es un polímero lineal natural de los polisacáridos galactosa y 3-6 anhidrogalaactosa. Este material deriva del agar del alga *Gelidium amansii*. El gel se prepara disolviendo el polímero pulverizado en agua hirviendo. La solución resultante puede ser extendida sobre placas de plástico. La solución gelifica a 45 ° C y da lugar a una delgada película de gel transparente y ligeramente rígido. El gel presenta poros muy grandes y tiene una ligera tendencia a separar

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

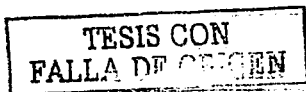
sustancias por procesos de filtración. El uso de electroforesis en gel de agarosa es un método de rutina en análisis clínicos.²²

Además de este gel, el de poliacrilamida es interesante como medio estabilizante de electroforesis. Se obtiene por medio de la polimerización de acrilamida y N, N-dimetilbisacrilamida (BIS). El segundo compuesto es un formador de cadenas cruzadas. A mayor cantidad de BIS, menor tamaño de poro en el gel obtenido. El gel resultante es bastante rígido y transparente, pero a diferencia del de agarosa el tamaño de un poro es lo suficientemente pequeño como para dar lugar a procesos de filtración en gel.

El empleo de estos geles requiere de muchas precauciones, ya que los monómeros son tóxicos y se absorben en la piel. La electroforesis en geles de poliacrilamida no se emplea profusamente en laboratorios clínicos porque los resultados son difíciles de interpretar. Sin embargo hay buenas perspectivas de mejorar el proceso con vistas a introducirlo en la rutina clínica.

15.2. APLICACIONES.

La electroforesis tiene numerosas aplicaciones en análisis clínicos. Considerando ahora cómo puede ser empleada para análisis cuantitativos y cualitativos de partículas cargadas. Con el avance de la electrónica, hoy en día se obtiene fraccionamiento electroforético en líquidos, proteínas, orina, líquido cefalorraquídeo (LCR), haptoglobina, fosfatasas ácida y alcalina, gama-giutamyl-transferasas, creatin kinasa, creatin kinasa-MB, isoenzimas de la lactato deshidrogenasa (LDH), etc. Cabe señalar que la electroforesis de la hemoglobina es de gran utilidad en las anemias falciformes, talasemias, hemolíticas, etc., donde es factible encontrar persistencia de hemoglobina fetal y en pacientes con anemia perniciosa, leucemia juvenil, mieloma múltiple, anemia aplásica adquirida, etc. Hay casos en que existe asociación de Hb S y fetal, como en la beta talasemia donde la fetal esta muy aumentada. La interpretación de la electroforesis de hemoglobina, requiere de una correlación clínica muy exhaustiva, por las sutilezas que presenta el sistema.²²



ANEXO 6

16. ENLACE QUÍMICO.

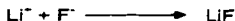
Una propiedad que poseen casi todos los átomos es su capacidad para combinarse con otros átomos para producir especies más complicadas. A las fuerzas de atracción que mantiene unidos a los átomos en sus formas combinadas, se le denomina enlaces químicos.

Cuando los átomos interactúan para formar un enlace, sólo se ponen en contacto partes exteriores; por consiguiente, generalmente sólo son importantes sus configuraciones electrónicas exteriores. Para identificar los electrones del nivel exterior (también llamado nivel de valencia), se emplea un tipo especial de notación, los símbolos de Lewis. Para formar este símbolo de un elemento, se escribe su símbolo atómico rodeado por cierto número de puntos, cada uno de los cuales representa un electrón en el nivel de valencia del átomo. Los símbolos de Lewis son muy útiles para explicar los enlaces entre los átomos.

Los enlaces químicos se pueden dividir en dos categorías generales: enlaces iónicos (o electrovalentes) y enlaces covalentes.²³

16.1. Enlace iónico.

Un enlace iónico se forma, cuando uno o más electrones se transfieren desde el nivel de valencia de un átomo al nivel de valencia de otro. El átomo que pierde electrones se convierte en ión positivo (catión), en tanto que el átomo que adquiere electrones queda cargado negativamente (anión). El enlace iónico resulta de la atracción entre los iones de carga contraria, por ejemplo el fluoruro de litio:



La fuerza motriz en la formación de un enlace iónico es una disminución de la energía de las partículas que se unen para formar el compuesto. En general, la disminución de la energía en el sistema se asocia con un aumento en su estabilidad. Las condiciones que favorecen a la formación de enlaces iónicos, son cuando dos elementos de baja energía de ionización se combinan con elementos de alta afinidad electrónica o cuando la energía reticular del compuesto resultante es muy grande, o bien, cuando concurren ambos factores, se forman compuestos más estables. Puesto que generalmente los metales tienen energías de ionización bajas y afinidades electrónicas también bajas, tienden a perder electrones para formar cationes; por otra parte, los no metales al tener energías de ionización altas y afinidades electrónicas altas, por lo general adquieren electrones formando aniones. Por esta razón, la mayoría de los compuestos formados entre metales y no metales son iónicos, en particular, las sustancias que se producen cuando un elemento del grupo IA ó IIA reacciona con un elemento que se encuentra en el vértice superior izquierdo de la tabla periódica.²⁴

TRABAJO CON
FALLA DE ORIGEN

16.2. Enlace covalente.

En muchos casos la formación de una sustancia iónica no es favorable energéticamente. Por ejemplo, la creación de un catión podría requerir un suministro demasiado grande de energía (energía de ionización) que no sería recuperada por la energía puesta en libertad cuando se forma el anión y se produce el sólido iónico (afinidad electrónica y energía reticular). En estas condiciones, se forma un enlace covalente.

Un enlace covalente resulta de compartir un par de electrones entre los átomos. La fuerza de enlace proviene de la atracción entre estos electrones compartidos y el núcleo positivo que entra en el enlace. En este sentido, el electrón actúa como una especie de adhesivo que pega o une los átomos. Como en el enlace iónico, la estabilidad del enlace covalente se debe a la disminución de la energía del par de átomos que están enlazados.

El análisis de los cambios de energía que ocurren en la formación de los enlaces covalentes es complejo. Cuando menos, en parte la energía que se desprende proviene de la unión o del acercamiento de los electrones de un átomo al núcleo de los otros a los que también son atraídos. Además de las fuerzas de atracción entre los electrones y entre ambos núcleos, existen fuerzas de repulsión entre los núcleos positivos. La distancia que separa a los átomos en el enlace, una vez formado, está controlada por el balance de estas fuerzas de atracción y repulsión.²⁴

El ejemplo más sencillo de un enlace covalente es el que existe entre los átomos de H en la molécula de H₂:



TESIS CON
FALLA DE CONTEN

ANEXO 7

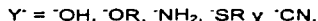
17. REACCIONES DE SUSTITUCION.

Por sustitución se entiende, en general, el intercambio recíproco de átomos o grupos de átomos de la misma valencia. Investigaciones cinéticas de este tipo de reacciones han conducido a un conocimiento más profundo de su mecanismo.



La rotura del enlace polar entre el carbono y el ligando X se produce de tal modo que X toma el par de electrones del enlace, con lo que resulta un ión carbeno. A este se le une el anión Y con su par de electrones libres. Se dice entonces que el sustituyente entrante es un nucleófilo (afinidad por los núcleos) y, por tanto, a estas reacciones se les denomina sustituciones nucleofílicas, que se simbolizan con la notación S_N.²⁵

Los sustituyentes nucleofílicos aniónicos más importantes son:



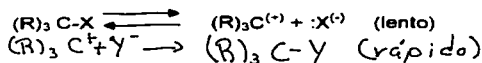
La separación de X⁻ y la unión de Y⁻ pueden suceder simultáneamente o una después de otra.

17.1. Reacción S_N2.

En este caso, ambos grupos participan en el primer paso de la reacción, el cual transcurre a través de un proceso bimolecular (símbolo S_N2). El intercambio de los sustituyentes se puede imaginar de manera que, conforme se va rompiendo el enlace C-X, se está formando el enlace C-Y, con lo que resulta un estado de transición, en el que los tres sustituyentes R₁, R₂ y R₃ y el átomo central de C se encuentran en un plano perpendicular al del papel. Los ligandos X y Y se mueven en una recta perpendicular a ese plano.²⁵

17.2. Reacción de sustitución S_N1.

La segunda posibilidad por la que puede transcurrir una reacción es la completa ruptura del enlace C-X, antes de que una el nuevo sustituyente Y. El primer paso de la reacción, que es el determinante de su velocidad, es monomolecular (símbolo S_N1). El proceso total se interpreta como un proceso de dos pasos:



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

17.3. Reacción de sustitución nucleofílica aromática.

Las reacciones de sustitución aromáticas por lo general ocurren por un mecanismo electrofílico. Sin embargo, los halogenuros de arilo que tienen sustituyentes que atraen electrones, pueden experimentar también sustitución nucleofílica aromática. ¿Cómo se efectúa esta reacción? Aunque en la superficie parece similar a las reacciones de sustitución nucleofílica S_N1 y S_N2 de los halogenuros de alquilo, debe ser debido a que los halogenuros de arilo son inertes en ambas condiciones de S_N1 y S_N2 . Los halogenuros de arilo no presentan reacciones S_N1 porque los cationes arilos son relativamente inestables. La disociación de un halogenuro es desfavorable en términos de energía y no se efectúa con facilidad.

Los halogenuros de arilo no presentan reacciones S_N2 porque el átomo de carbono que está unido al halógeno cuenta con protección estérica contra un ataque desde el lado posterior del anillo aromático. Para que un nucleófilo ataque a un halogenuro de arilo, se debería aproximar directamente a través del anillo aromático e invertir la estereoquímica del anillo aromático (imposible en términos geométricos).

Las sustituciones nucleofílicas en un anillo aromático se efectúan por un mecanismo de adición/eliminación. El nucleófilo atacante se suma primero al halogenuro de arilo deficiente de electrones y forma un intermediario con carga negativa estabilizado por resonancia, llamado complejo de Meisenheimer, el ion halogenuro se elimina en una segunda etapa.

La sustitución nucleofílica aromática sólo se presenta si el anillo aromático tiene un sustituyente que atraiga electrones en las posiciones orto o para respecto al halógeno o al grupo saliente. Mientras más sustituyentes hayan, la reacción es más rápida.²⁵

Por ejemplo, el 2,4,6-trinitroclorobenceno reacciona con NaOH acuoso a temperatura ambiente y da 2,4,6-trinitrofenol con 99% de rendimiento. El nucleófilo O^-H ha sustituido al Cl^- .

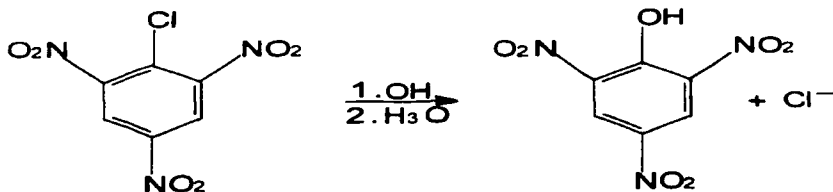
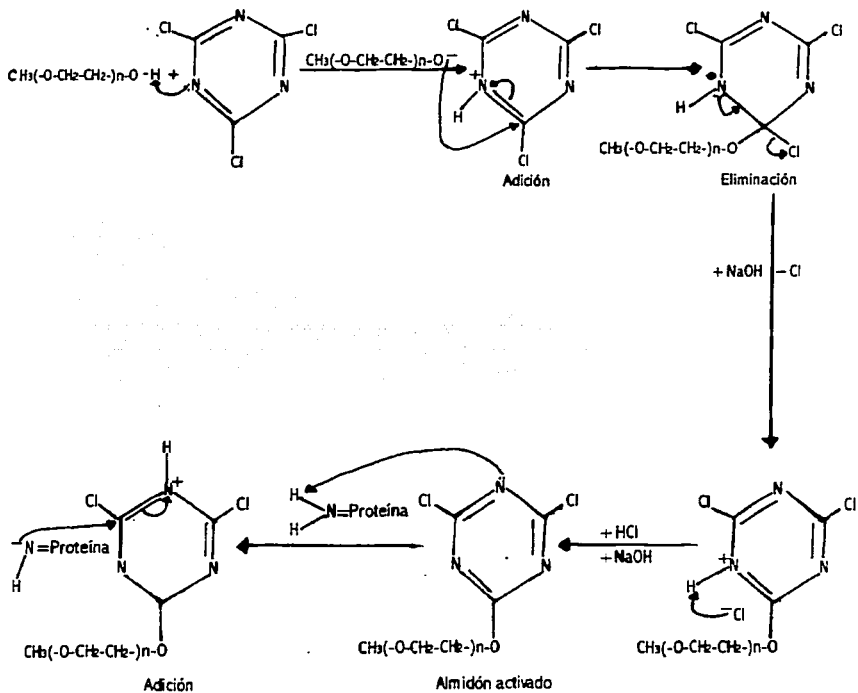


Figure 10. Ejemplo de reacción nucleofílica aromática.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Anexo 8

18. MECANISMO DE LA REACCIÓN.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

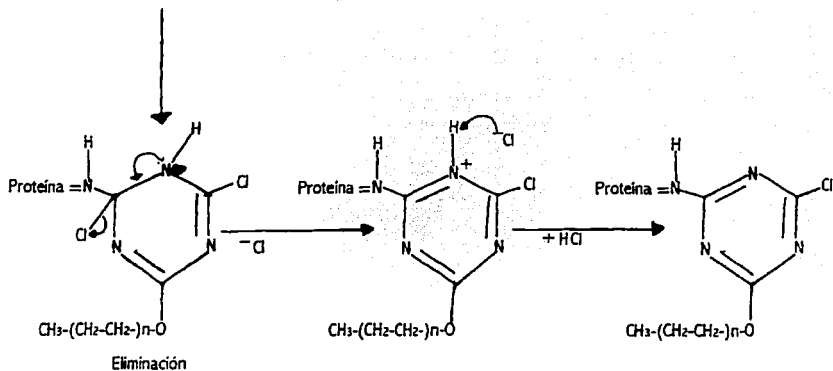


Figura 11. Mecanismo de la reacción para la formación del complejo Hb-almidón.

TESIS CON
 FOLLA DE ORIGEN