



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

“Desarrollo de un método espectrofotométrico para la determinación simultánea de glucosa, colesterol y triglicéridos en suero basado en regresión lineal múltiple.”

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

Jazmín García Bucio

DIRECTOR DE TESIS

QFB Víctor Hugo Becerra López

ASESORA DE TESIS

M en DIIE Isabel Garduño Pozadas

ENERO DE 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Tabla de contenido

Resumen	3
Introducción	4
Marco teórico	
A. Espectrofotometría	5
B. Teoría del Orbital Molecular	6
C. Ley de Lambert-Beer	7
D. Espectro de absorción	9
E. Superposición de ondas	10
F. Ley de Aditividad de las absorbancias	10
G. Efecto batocrómico	11
H. Espectrofotómetro	12
I. Modelo de Regresión Lineal	13
J. Propiedades moleculares y bioquímicas de los metabolitos en estudio	14
Planteamiento del problema	18
Objetivo general	18
Hipótesis	18
Diseño experimental	19
Resultados	22
Discusión	53
Conclusión	55
Lista de referencias consultadas	56

I. RESUMEN

El análisis de glucosa, colesterol y triglicéridos se realiza por espectrofotometría visible, para su determinación se requiere el uso de reactivos generadores de color, aparte el análisis se realiza de forma individual.

A esta situación, se propuso desarrollar un método de determinación simultánea de estos metabolitos basado en la regresión lineal múltiple. Para realizar este método los analitos deben cumplir con la ley de la aditividad de las absorbancias, se descubrió que estos metabolitos cumplían con esta ley en un rango de longitud de onda de 246-286 nm, este rango se encuentra en la región UV por lo cual no se necesitó el uso de reactivos formadores de color o el uso de kits. Este modelo tiene las ventajas de realizar una determinación simultánea, se reduce tanto el costo al no requerir reactivos generadores de color y como el tiempo de análisis, para procesar los datos solo se requiere el uso de una computadora que tenga instalado el paquete estadístico Statgraphics Plus 5.0[®] o algún otro paquete estadístico.

Para la realización de este trabajo, primero se establecieron los parámetros de trabajo: selección de longitud de onda, establecimiento del orden de los estándares, el pH de reacción, aislamiento de los metabolitos por métodos químicos. Cuando se obtuvieron los parámetros establecidos, se leyeron los estándares, la mezcla de estándares y los cinco sueros en las mismas condiciones. Aparte del modelo establecido, se propuso el método de adición de estándares para este sistema, en conjunto con el modelo de regresión lineal múltiple, con el fin de encontrar un blanco para este sistema.

Con los datos obtenidos, se aplicó el modelo de regresión lineal múltiple. Se observó que el modelo se podía aplicar dado las características espectrofotométricas de los metabolitos, sin embargo, no se tenía en cuenta el efecto matriz del suero, por lo que esto afectó los resultados. Se probó que el modelo tiene aplicación en modelos farmacéuticos, mientras que en modelos biológicos hay gran interferencia.

II. INTRODUCCIÓN

Los métodos actuales para la determinación de metabolitos en química clínica se realizan por colorimetría utilizando absorción espectrofotométrica en la región visible. Para ello, los laboratorios como Wiener Lab[®], Randox[®], entre otros, se han encargado de desarrollar kits comerciales por metabolito, cada uno incluye su propio estándar y el reactivo o los reactivos encargados de desarrollar color con la molécula estudiada. La casa comercial le asigna un precio a sus productos dependiendo el número de determinaciones estimadas por kit, estabilidad del reactivo o los reactivos, reproducibilidad, sensibilidad, etc.

Con el antecedente de los servicios sociales titulados: *Propuesta de un método para la determinación espectrofotométrica de multicomponentes por regresión lineal múltiple*²⁸ y *Evaluación de un modelo matemático por regresión lineal múltiple en la determinación simultánea de una mezcla de tres fármacos*²⁷, en el cual la particularidad de estos trabajos fue la determinación espectrofotométrica, en la región UV, de las concentraciones de un sistema de multicomponentes, los principios activos implicados tenían espectros de absorción cercanos entre sí, cobrando importancia la aplicación de la ley de aditividad de las absorbancias y el modelo matemático de regresión lineal múltiple. Para el proceso de los datos se empleo el paquete estadístico Statgraphics Plus 5.0[®], con el que se logro obtener las ecuaciones de las rectas.

Con base en lo anterior, se probó el método en medicamentos, dando resultados confiables y reproducibles, en consecuencia se dio apoyo a la docencia en el módulo de AFMP II, al tener nuevas opciones para determinaciones simultáneas.

En el presente proyecto se pretende realizar determinaciones para cuantificar glucosa, colesterol y triglicéridos en suero por espectrofotometría UV aplicando el modelo matemático de regresión lineal múltiple con la ayuda del paquete estadístico Statgraphics Plus 5.0[®]. Para la determinación de estos metabolitos, no se requiere el uso de los kits comerciales o de los reactivos necesarios para el desarrollo del color, por otro lado la determinación de los metabolitos se puede realizar simultáneamente, para lograr esto el equipo indispensable es un espectrofotómetro UV y una computadora con el programa estadístico, además del equipo necesario para la toma de muestra y su posterior obtención del suero.

Actualmente todas las determinaciones en el área de química clínica son realizadas en espectrofotometría visible, lo que aporta este proyecto es tener otra posibilidad de trabajo además de retomar los conocimientos adquiridos en el módulo de AFMP II, cabe resaltar que no se pretende cambiar el método de determinación por espectrofotometría visible si no dar al alumno nuevas herramientas de trabajo, y en un futuro próximo, si se presenta la oportunidad, poder emplearlas en el ámbito laboral y de investigación.

III. MARCO TEÓRICO

A. ESPECTROFOTOMETRÍA

La mayoría de los problemas analíticos reales comienzan con una compleja mezcla a partir de la cual es necesario aislar, identificar y cuantificar uno o más componentes de la misma.

La Espectrofotometría es una de los métodos experimentales más utilizadas para la detección específica de analitos. Se caracteriza por su precisión, sensibilidad y aplicabilidad a moléculas de distinta naturaleza (contaminantes, biomoléculas, etc.) y estado de agregación (sólido, líquido). La Mecánica Cuántica nos dice que la luz está compuesta de fotones cada uno de los cuáles tiene una energía:

$$E_{\text{fotón}} = h \times n = h \times c / \lambda$$

donde c es la velocidad de la luz, n es su frecuencia, λ su longitud de onda y $h = 6.6 \cdot 10^{-34}$ Jxs constante de Planck. Cuando decimos que una sustancia química absorbe luz de longitud de onda λ , esto significa que las moléculas de esa sustancia absorben fotones a esa longitud de onda¹.

Todas las sustancias pueden absorber energía radiante. La absorción de las radiaciones ultravioleta, visibles e infrarrojas depende de la estructura de las moléculas, y es característica para cada sustancia química.

La espectrofotometría ultravioleta visible se basa en la propiedad que tienen algunas sustancias en disolución (moléculas, átomos, entre otros) en absorber radiación electromagnética de la región ultravioleta (200-380 nm) o visible del espectro electromagnético². Las radiaciones que van desde el violeta al rojo se dice que forman el espectro visible, pues proceden de la descomposición de la luz blanca.

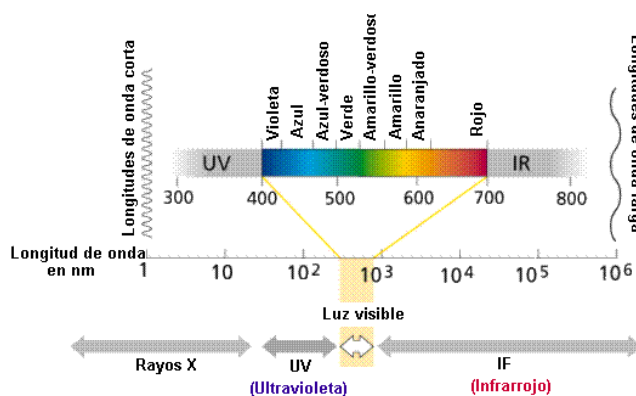


Figura 1 Espectro de absorción³

Las radiaciones de longitud de onda inferior al violeta se llaman radiaciones ultravioletas, rayos X y rayos gamma, por orden decreciente en la longitud de onda. Las radiaciones de longitud de onda superior al rojo son las denominadas infrarrojas, microondas y ondas de radio, por orden creciente en longitud de onda¹.

La absorción por las moléculas biológicas la radiación de las regiones ultravioleta y visible del espectro depende de la estructura electrónica de los átomos de carbono que las componen. Las regiones ultravioleta y visible del espectro electromagnético y sus técnicas asociadas son las más utilizadas en el trabajo analítico de rutina en los laboratorios de química clínica².

B. TEORIA DEL ORBITAL MOLECULAR

Cuando una molécula absorbe un fotón en un intervalo espectral, se excita pasando un electrón de un orbital del estado fundamental a un orbital excitado de energía superior. Cada molécula tiene una serie de estados excitados discretos (o bandas) que dependen de su estructura electrónica y que la distinguen del resto de las moléculas. Como consecuencia, el espectro de absorción, es decir, la luz absorbida en función de la longitud de onda, constituye una verdadera señal de identidad de cada sustancia o molécula, este se conoce como la Teoría de Orbitales Moleculares (T.O.M)².

La T.O.M. es la segunda aproximación al estudio del enlace covalente, y la más ampliamente empleada para explicar la estructura y la geometría de muchos sólidos inorgánicos. El punto de partida consiste en asumir que si los dos núcleos implicados en el enlace se ubican a la distancia de equilibrio, los electrones se alojarán no en orbitales atómicos de cada elemento, sino en orbitales moleculares, que son análogos a los atómicos, y que presentan características similares.

Cuando una molécula absorbe luz, pasa a un estado excitado de mayor energía. Por el contrario, cuando una molécula emite un fotón, su energía disminuye necesariamente una cantidad igual al fotón.

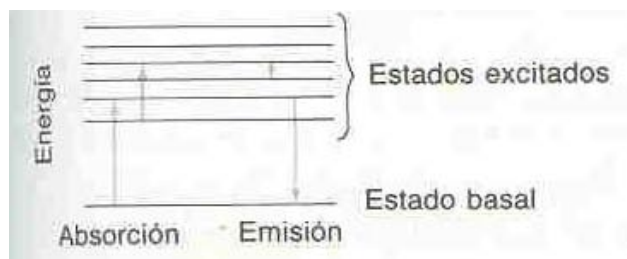


Figura 2 La absorción de la luz incrementa a energía de una molécula. La emisión de luz reduce su energía¹

La formación del enlace puede suponerse por superposición de orbitales atómicos de energía y orientación espacial adecuadas, pertenecientes a los dos átomos que se combinan, y dando lugar a un ORBITAL MOLECULAR que ya no pertenece a los átomos sino a la molécula en su conjunto; y en el cual, de acuerdo con el Principio de Exclusión, sólo podrán haber dos electrones.

En una transición electrónica, un electrón de un orbital molecular se mueve a otro orbital, con un consecuente aumento o disminución en la energía de la molécula. La transición electrónica de menor energía implica la promoción de un electrón no enlazante (n) al orbital pi de antienlace (π^*)^{1,2}. El estado en

el cual los espines son opuestos (+ 1/2, - 1/2) se llama estado singlete. Si los dos electrones tienen el mismo número cuántico (+ 1/2, + 1/2), el estado excitado se llama triplete.

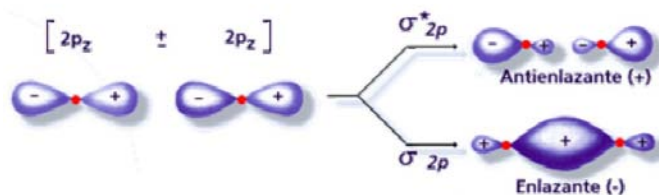


Figura 3 Diagrama de la formación de los orbitales moleculares en una molécula⁴

Los estados singlete y triplete de menor energía se llaman S1 y T1. En general T1 es de menor energía que S1, en general los estados excitados más altos de la molécula se designan S2, S3... y T2, T3.

C. LEY LAMBERT-BEER

Lambert y Beer, a través de sus observaciones establecieron relaciones de la variación de la intensidad de luz transmitida por una muestra con el espesor de ella o con la concentración de la sustancia, para materiales translúcidos. Estas relaciones se conocen como la ley de *Lambert-Beer* o ley general de la espectrofotometría que *permite hallar la concentración de una especie química a partir de la medida de la intensidad de luz absorbida por la muestra.*

Esta ley se puede expresar en términos de potencia de luz o de intensidad de luz, asumiendo luz monocromática, como:

$$\frac{I_t}{I_0} = 10^{-\epsilon bc}$$

Donde:

I_t , es la intensidad de la luz transmitida por la muestra.

I_0 , es la intensidad de la luz que incide sobre la muestra y que proviene de la fuente.

ϵ , es el coeficiente de absorptividad molar en unidades de $M^{-3} \cdot cm^{-1}$

b , es la longitud de la trayectoria del haz de luz a través de la muestra o el espesor de la celda en cm o lo que se conoce como paso óptico.

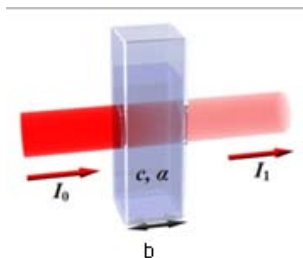


Figura 4 Esquematización de la ley de Lambert-Beer⁵

La relación I_t/I_0 se conoce como transmitancia, T , y es la medida primaria que se realiza en los instrumentos para medir la absorción de luz por parte de una muestra. Si la relación se expresa en forma porcentual, entonces se llama porcentaje de transmitancia:

$$\%T = 100 \left(\frac{I_t}{I_0} \right)$$

La luz absorbida sería $I_0 - I_t$, es decir, la diferencia entre la intensidad de la luz incidente y la intensidad transmitida después de pasar a través de la muestra. A veces se expresa en forma porcentual, en función de la transmitancia medida como:

Porcentaje de absorción = $(T_{\text{blanco}} - T_{\text{muestra}}) \times 100$ o absorbancia

Cuando se toma el logaritmo decimal negativo de la relación I_t/I_0 , entonces:

$$-\log \frac{I_t}{I_0} = -\log T \quad \text{ó} \quad \log \frac{I_0}{I_t} = \log I_0 - \log I_t$$

La relación que representa la cantidad de luz absorbida por la muestra es:

$$-\log \frac{I_t}{I_0} = -\log T$$

y recibe el nombre de *Absorbancia*, y se designa con la letra A .

La ley de Lambert-Beer se puede entonces escribir de las siguientes formas:

$$I_t/I_0 = 10^{-\epsilon bc}$$

$$-\log T = \epsilon \cdot b \cdot c$$

$$-\log T = A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

Donde:

c , es la concentración del soluto en moles / litro de solución.

ϵ , es una constante denominada *coeficiente de absortividad molar* cuyas unidades son: $\text{cm}^{-1} \text{ litro} / \text{mol}$.

b , es la longitud de la trayectoria en cm .

Se llega, entonces, a que *la absorbancia es adimensional*.

El coeficiente de absortividad molar " ϵ " es función de la longitud de onda, del índice de refracción de la solución y es característico de cada sistema soluto-solvente. Es una propiedad intensiva, que no depende de la concentración de la sustancia y representa la absorción de luz por parte de un mol de soluto para una longitud de onda dada.

Si no se conoce el peso molecular de la sustancia la ley de Beer se puede expresar como:

$$A = (a)(b)(c)$$

Donde "a" se denomina coeficiente de absorptividad y sus unidades dependen de las unidades de concentración utilizadas, que pueden estar en g/L o g/100mL⁶.

D. ESPECTRO DE ABSORCIÓN

El registro de la *variación del coeficiente de absorptividad*, o de la *absorbancia A*, o de la *transmitancia T*, en función de la *longitud de onda* da origen a lo que se denomina "*espectro*" o *curva espectral* de una sustancia química e indica las *características de absorción de dicha sustancia con relación a la longitud de onda*. En muchas ocasiones la curva espectral se presenta como absorbancia contra longitud de onda y el espectro se denomina *espectro de absorción*, o en función de la transmitancia, denominándose el espectro, *espectro de transmisión*. De igual forma cuando se registra la *emisión de radiación en función de la longitud de onda*, los *espectros se denominan como espectros de emisión*.

El espectro de absorción abarca un intervalo enorme de absorbancias en función de la longitud de onda de una especie absorbente se conoce como espectro de absorción², como se muestra en la figura siguiente⁷:

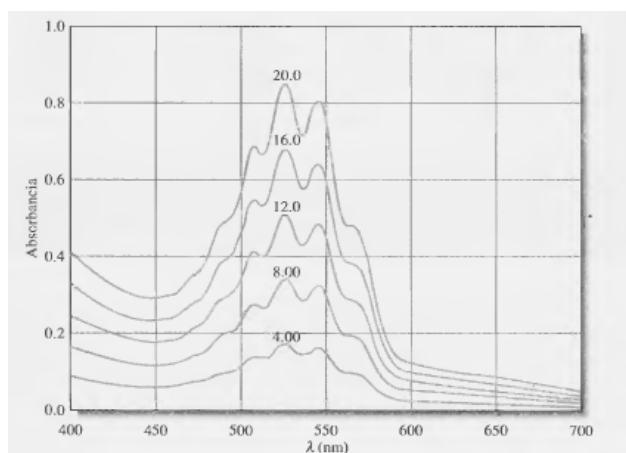


Figura 5 Espectro de absorción de una molécula en la región visible

Como cada nivel electrónico de una molécula están sobrepuestos estados vibracionales y rotacionales, una transición electrónica puede también involucrar un cambio vibracional así como un cambio rotacional, resultando con ello que los espectros de absorción sean continuos en vez de estar formados por líneas como es de esperarse².

La parte de la molécula a la que se debe la absorción se llama cromógeno, depende de los electrones n , π , σ , que contenga la molécula. Cualquier sustancia que absorba la luz visible será coloreada cuando refleje la luz blanca o cuando esta se transmita por ella misma^{1,8}.

Cuando se requiere saber el pico máximo de absorción de una sustancia, dependiendo si la lectura es en la región visible o en la región UV, se realiza un barrido o se corre un barrido, el cual consiste en elegir en un intervalo amplio de longitud de onda y leer la muestra en este intervalo, esta técnica es efectiva para poder elegir el rango de longitud de onda apropiado donde se observa su máximo de absorción de la molécula que se estudia.

E. SUPERPOSICION DE ONDAS

El principio de superposición establece que, cuando dos o más ondas atraviesan la misma región del espacio, se produce un desplazamiento igual a la suma de los desplazamientos causados por las ondas individuales. Este principio se aplica a ondas electromagnéticas en las que los desplazamientos son fruto de un campo eléctrico, así como a otros diversos tipos de ondas en las que se desplazan átomos o moléculas⁸.

¿Qué hacer cuando los espectros individuales se superponen?

Este caso se puede dar cuando se analiza una mezcla. La absorbancia de una solución a la longitud de onda dada es la suma de las absorbancias de cada una de las especies en la solución a esta longitud de onda¹:

$$A = \epsilon_X b[X] + \epsilon_Y b[Y] + \epsilon_Z b[Z] + \dots$$

donde ϵ es la absortividad molar de cada especie a la longitud de onda dada.

El análisis de una mezcla que contiene dos componentes cuyos espectros se superponen en gran parte, se puede presentar como se muestra en la figura:

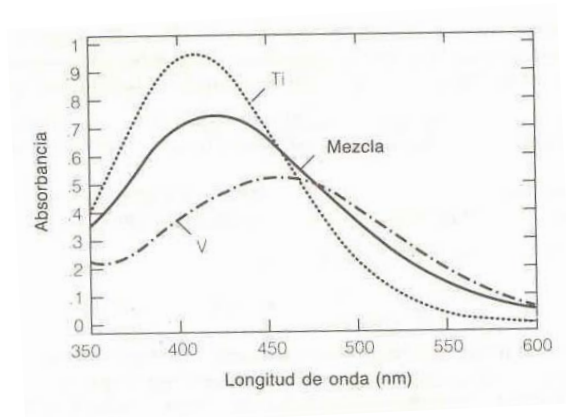


Figura 6 Espectro de absorción de una mezcla, se representa el fenómeno de superposición de ondas⁸

Este fenómeno se puede explicar por la **ley de la Aditividad de las absorbancias**.

F. LEY DE LA ADITIVIDAD DE LAS ABSORBANCIAS

Esta ley explica lo siguiente: si varias especies químicas absorben radiación a una misma longitud de onda y no hay interacción química entre dichas especies, la absorbancia total de la solución es debida a la suma de las absorbancias individuales, lo que se conoce como Aditividad de las absorbancias.

La Aditividad de las absorbancias es una propiedad útil, puesto que proporciona un medio para el estudio de mezclas de especies de absorbentes.

En un sistema binario de absorbente los espectros de absorción de dos componentes pueden superponerse en diferentes grados; como se muestra en la figura siguiente:

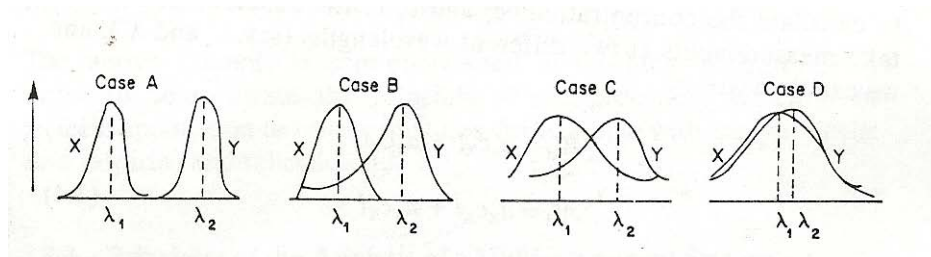


Figura 7 Análisis de un sistema binario de absorción⁹

Caso A esta situación donde las curvas no se superponen y los dos componentes (X y Y) se determinan directamente con la longitud de onda. Esta situación es común en la región infrarroja, pero es menos común en la región visible/UV, debido a las bandas de absorción que se producen son muy amplias.

Caso B situación de una parcial superposición en el espectro de absorción. Mientras que las mediciones en λ_2 dan Y directamente, cualquier intento de medir la absorbencia de X debe incluir alguna contribución debida a la cola de la absorción de Y.

Caso C Representación general del caso de superposición de las curvas de absorbancia, pero con el máximo de absorción suficiente para permitir el análisis exacto por el método descrito a continuación.

Caso D es para los materiales con curvas de absorción muy similares, y no es susceptible al análisis discutido a continuación⁹.

Para n componentes absorbentes en una solución, la absorbancia total de la mezcla, para una longitud de onda dada, según el principio de Aditividad de las absorbancias, será:

$$A = A_i = A_1 + A_2 + \dots + A_n = (\epsilon_1) \lambda b C_1 + (\epsilon_2) \lambda b C_2 + \dots + (\epsilon_n) \lambda b C_n$$

G. EFECTO BATOCRÓMICO

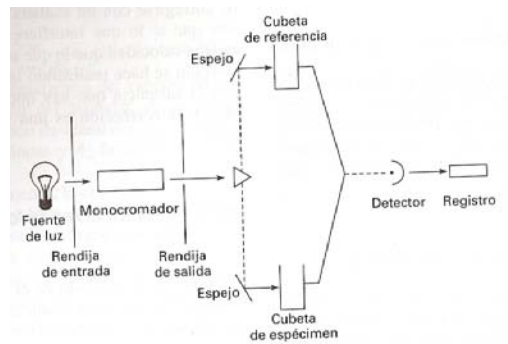
El efecto batocrómico o desplazamiento hacia el rojo, es el desplazamiento del máximo de absorción hacia longitudes de onda mayores. Los espectros de los iones y radicales libres suelen estar desplazados hacia longitudes de onda más largas (efecto batocrómico) con relación a los de sus correspondientes moléculas no disociadas o neutras. Por ello, es frecuente que iones o radicales, cuyas moléculas neutras (No disociadas) sean incoloras, presenten coloración¹⁰.

En el presente trabajo, el propósito es ir en contra del efecto batocrómico, el desplazamiento de la molécula sigue en la región UV, pero la selectividad del método se basa en el modelo de regresión lineal múltiple, además del contraste de la muestra con los estándares usados y la sobre posición de los picos de estos estándares, la ventaja de este método es el no necesitar los reactivos para la formación de complejos coloridos, pudiendo leer en la región UV.

H. ESPECTROFOTÓMETRO

El término espectrofotometría se refiere al uso de la luz para medir las concentraciones de sustancias químicas¹. Los espectros de absorción se miden mediante un instrumento denominado espectrofotómetro.

Figura 8 Esquema de un espectrofotómetro de doble haz¹.



El cual consta básicamente de los siguientes componentes^{1,2,6,7,8}:

- ✓ Fuente de luz: Lámpara que emite una mezcla de longitudes de onda.
- ✓ Colimador: Conjunto de lentes que enfocan la luz convirtiéndola en un haz de rayos paralelos.
- ✓ Monocromador: Dispositivo que selecciona luz de una única longitud de onda.
- ✓ Detector fotoeléctrico: Transductor de luz en electricidad. La luz provoca el desplazamiento de electrones en el metal del detector, produciendo una corriente eléctrica que es proporcional a la intensidad de la luz recibida.
- ✓ Registrador: Mide la señal del detector, la compara y genera una medida en una escala determinada.

I. MODELO DE REGRESION LINEAL MULTIPLE

Esta regresión se refiere a modelos lineales cuando se consideran dos o más variables independientes.

$$y = f(X_1, X_2, \dots, X_k)$$

Comparando la regresión simple contra la múltiple se tiene que:

1. Es más difícil la elección del mejor modelo, ya que casi siempre hay varias opciones razonables.
2. Se dificulta visualizar el modelo, por la dificultad de pintar más de tres dimensiones.
3. Requiere cálculos complejos, generalmente se realiza con recursos computacionales y software especializado.

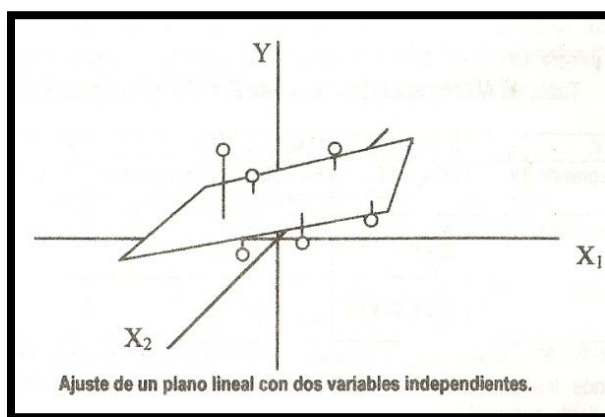


Figura 9 Representación tridimensional de un sistema de dos variables¹².

Muchas fórmulas matemáticas pueden servir para expresar relaciones entre más de dos variables, pero las que con mayor frecuencia se usan en la estadística son las ecuaciones lineales de la forma:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_kx_k$$

Aquí y es la variable que se debe pronosticar, x_1, x_2, \dots, x_k son las k variables conocidas sobre las cuales se deben basar los pronósticos y $b_0, b_1, b_2, \dots, b_k$ son constantes numéricas que se deben determinar a partir de los datos observados.

El problema de determinar una ecuación lineal con más de dos variables, consiste en encontrar valores numéricos para $b_0, b_1, b_2, \dots, b_k$. Esto se realiza generalmente por el método de los mínimos cuadrados.

Mínimos cuadrados. Al igual que en la regresión lineal simple, se puede trabajar el método de mínimos cuadrados. Para esto:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_k X_k + \varepsilon$$

Donde:

$$\varepsilon = Y_i - (\beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_k X_k)$$

En base a los datos

$$Y_i - \hat{Y}_i = Y_i - (\hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1 X_1 + \hat{\beta}_2 X_2 + \dots + \hat{\beta}_k X_k)$$

Al elemento de la derecha se le conoce como residual y refleja la desviación de los datos observados con respecto a la línea o plano ajustado.

Suma de cuadrados. Elevando al cuadrado y sumando los elementos de la ecuación anterior.

$$\sum_{i=1}^n (Y_i - \hat{Y}_i)^2 = \sum_{i=1}^n (Y_i - (\hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1 X_1 + \hat{\beta}_2 X_2 + \dots + \hat{\beta}_k X_k))^2$$

El método consiste en encontrar los valores $\hat{\beta}_0, \hat{\beta}_1, \hat{\beta}_2, \dots$ llamados estimadores de mínimos cuadrados, para los cuales la suma de cuadrados es mínima. De tal manera se puede construir la siguiente tabla de ANVA^{11, 12}.

J. PROPIEDADES MOLECULARES Y BIOQUÍMICAS DE LOS METABOLITOS EN ESTUDIO

❖ Glucosa

La glucosa se define como una hexosa o un hidrato de carbono de seis carbonos (D-glucosa, C₆H₁₂O₆), figura 10, que se encuentra presente en ciertos alimentos, especialmente frutas, y en la sangre normal. La glucosa representa la fuente principal de energía para los organismos vivos^{13, 14}.

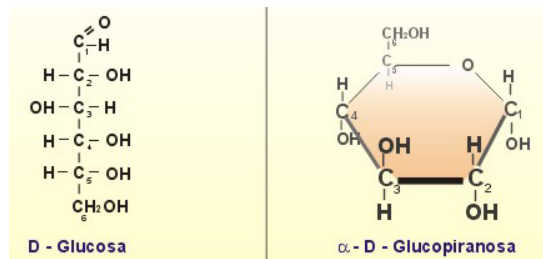


Figura 10 Molécula de glucosa¹⁵

Importancia clínica

Su medición es importante en el diagnóstico y manejo de la diabetes mellitus. La diabetes mellitus se define como enfermedad sistémica, crónico-degenerativa, de carácter heterogéneo, con grados variables de predisposición hereditaria y con participación de diversos factores ambientales, y que se caracteriza por hiperglucemia crónica debido a la deficiencia en la producción o acción de la insulina, lo que afecta al metabolismo intermedio de los hidratos de carbono, proteínas y grasas^{13, 16}. También es importante su medición en los casos de hipoglucemia y en estados pre-diabéticos¹⁷.

MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE LA GLUCOSA SANGUÍNEA

Existen varios métodos de análisis de la glucosa sanguínea, para fines de este trabajo solo se mencionara los métodos enzimáticos, son usados actualmente como métodos de rutina, los cuales son: el método de Hexoquinasa (HK) y el método de glucosa oxidasa (Trinder o GOD-PAP).

El método de Trinder o GOD-PAP se usara en este estudio para la comparación de resultados con el modelo de regresión lineal, por lo tanto la determinación por GOD-PAP consiste en reacciones acopladas que miden la oxidación de la fenilaminofenazona o 4-aminofenazona (PAP) en presencia de H₂O₂ (505 nm)¹⁸.

❖ Colesterol

Químicamente es un esteroide derivado del ciclopentanoperhidrofenantreno (figura 11), tiene propiedades parecidas a un lípido¹³. Se sintetiza principalmente en el hígado, es componente esencial de la membrana celular y es precursor de hormonas tiroideas y en biosíntesis de ácidos biliares. Una pequeña cantidad del colesterol corporal circula por la sangre formando parte de partículas complejas llamadas lipoproteínas. De estas lipoproteínas hay unas partículas que captan el exceso de colesterol para eliminarlo (Colesterol de HDL, “colesterol bueno”) y otras que depositan el colesterol en tejidos y órganos (Colesterol de LDL, “colesterol malo”). El análisis del colesterol mide la concentración en la sangre de todo el colesterol (tanto el “bueno” como el “malo”) transportado por las lipoproteínas^{13, 19, 20, 21}.

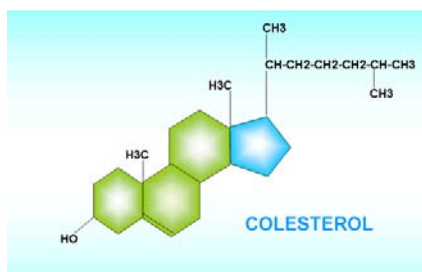


Figura 11 Estructura del colesterol

Importancia clínica

El análisis de colesterol, a diferencia de la mayor parte de los análisis de laboratorio, no se usa para diagnosticar o realizar el seguimiento de una enfermedad sino que se utiliza para estimar el riesgo de desarrollar una enfermedad, concretamente la enfermedad cardíaca. El análisis de colesterol se considera

un aspecto habitual de la medicina preventiva, ya que una concentración elevada de colesterol en la sangre se ha asociado con el endurecimiento de las arterias (aterosclerosis), la enfermedad cardíaca y un elevado riesgo de muerte por infarto de miocardio^{13, 14, 19,21}.

MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DEL COLESTEROL

La determinación actual del colesterol es por método enzimático, se utiliza la enzima Colesterol oxidasa (CHOD-PAP, Trinder), es una reacción en tres pasos: hidrólisis de esteres de colesterol con la colesteroesterasa, oxidación del colesterol con colestero oxidasa (CHOD) para formar H₂O₂, oxidación de 4-aminofenazona (PAP) con el H₂O₂²².

❖ Triglicéridos

Los triglicéridos son lípidos absorbidos en la dieta y también producidos en forma endógena a partir de los carbohidratos. Su estructura base es un glicerol esterificado con tres ácidos grasos²³, ver figura 12. Son fundamentales para el almacenamiento y transporte de energía dentro del organismo²⁴.

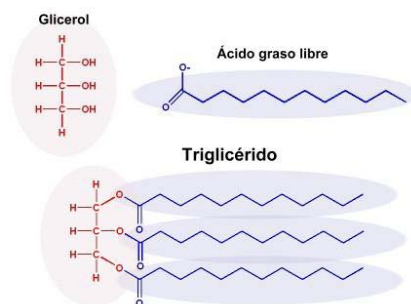


Figura 12 Estructura de Triglicéridos

Importancia clínica

Su medición es importante en el diagnóstico y manejo de las hiperlipidemias. También forma parte habitualmente del perfil lipídico utilizado para identificar el riesgo de desarrollar enfermedad cardíaca, se ha identificado el aumento de triglicéridos como un factor de riesgo en enfermedades ateroscleróticas.

En los individuos diabéticos es especialmente importante realizar la determinación de triglicéridos como parte de cualquier perfil lipídico, ya que la concentración de triglicéridos aumenta significativamente cuando el azúcar en sangre no está bien controlado. Estas enfermedades pueden tener origen genético o ser secundarias a otras tales como nefrosis, diabetes mellitus. El aumento de triglicéridos se ha identificado como un factor de riesgo en enfermedades ateroscleróticas^{13, 25, 26}.

METODOS DE DETERMINACIÓN DE TRIGLICÉRIDOS

Los triglicéridos actualmente se realiza su medición por el método de Glicerol oxidasa, como su nombre lo indica es un una reacción enzimática la cual consiste en una hidrolisis enzimática de glicerol con la lipasa para remover los ácidos grasos. El glicerol se cuantifica indirectamente con el consumo de NADH a NAD⁺, la reducción del tetrazolio y la oxidación del PAP con H₂O₂²⁵.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El módulo de AFMP II es una de las bases curriculares en la carrera Química Farmacéutico-Biológica, los conocimientos adquiridos relativos a los métodos instrumentales, sirven en módulos posteriores como Tecnología Farmacéutica I y II y si el alumno elige la orientación de Farmacia Industrial también le servirá en el módulo de Desarrollo Farmacéutico.

De igual forma, este módulo sustenta los conocimientos necesarios para la orientación de Bioquímica Clínica, concretamente en Química clínica, ya que en esta área se determinan metabolitos por espectrofotometría visible, al generar el efecto batocrómico.

En la actualidad la determinación de glucosa (GLU), colesterol (COL) y triglicéridos (TG) es frecuente en los laboratorios del sector público y privado, dado el aumento de enfermedades cardiovasculares y diabetes mellitus (DM) en la población mexicana. Los metabolitos poseen propiedades espectroscópicas que se pueden aprovechar, dando un efecto batocrómico. Este método espectrofotométrico tiene la ventaja de ser exacto y específico sin embargo la determinación es indirecta, requieren el uso de reactivos que solo el proveedor aporta y su determinación es por separado.

En la espectrofotometría UV, debido a sus características permite tener mejores aplicaciones, mas exactas y sensibles empleando diversos métodos, uno de ellos es la determinación simultánea de multicomponentes por diferentes técnicas, además que en la espectrofotometría UV no se requiere el uso de reactivos que generen color.

En la presente tesis, se pretende aplicar la técnica de determinación de multicomponentes por el método de regresión lineal múltiple, el cual ha sido probado con éxito en aplicaciones farmacéuticas, sin embargo en aplicaciones clínicas no se ha probado, razón por la cual se propone como método de determinación de GLU, COL y TG en suero.

V. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un método espectrofotométrico de determinaciones simultáneas de glucosa, colesterol y triglicéridos en suero basado en regresión lineal múltiple.

VI. HIPOTESIS

Las características espectroscópicas de GLU, COL y TG en la región UV, les permiten ser cuantificadas de forma simultánea y es válido al compararlo con controles interno y externo.

VII. DISEÑO EXPERIMENTAL

a. Tipo de estudio

Para establecer las relaciones de causalidad de un fenómeno, es necesario hacer un estudio científico apoyado en varios contextos. De acuerdo a esto, el trabajo a realizar es prospectivo, descriptivo al estudiar solo una población, por la evolución del fenómeno o número de veces que se mide la variable de respuesta en la unidad experimental, es transversal, con base en el control que se tiene sobre la variable de respuesta es experimental.

b. Población de estudio

Suero humano que contenga colesterol, triglicéridos y glucosa.

c. Criterios de inclusión y exclusión

- inclusión: se aceptan los sueros que previamente se haya determinado COL, TG Y GLU en un sistema automatizado.
- exclusión: se rechazan los sueros que no contengan las determinaciones de COL, TG Y GLU
- eliminación: se eliminan el suero con hemolisis, hiperlipidemia.

d. Variables

- Cantidad utilizada del patrón
- Señal de absorción
- Condiciones de lectura en UV

e. Metodología

Materiales y reactivos

- Std GLU Método GOD-PAP Randox®
- Std COL Método CHOD-POD Wiener Lab®
- Std TG Método GOD-PAP Wiener Lab®
- Control interno. Suero control elaborado para la ambc ® en el programa de evaluación externa de Calidad, la determinación se llevara a cabo en conjunto con los sueros problema.
- Control externo. Suero humano (Proporcionado por la Clínica FES Zaragoza y analizado en la Clínica de Edo. México). La determinación ya se hizo y no se desarrollara en conjunto con los sueros problema.
- Pipeta serológica de 0.1mL
- Pipeta volumétrica de 5mL
- Tubos de ensaye 13x100mm
- Celdas de cuarzo

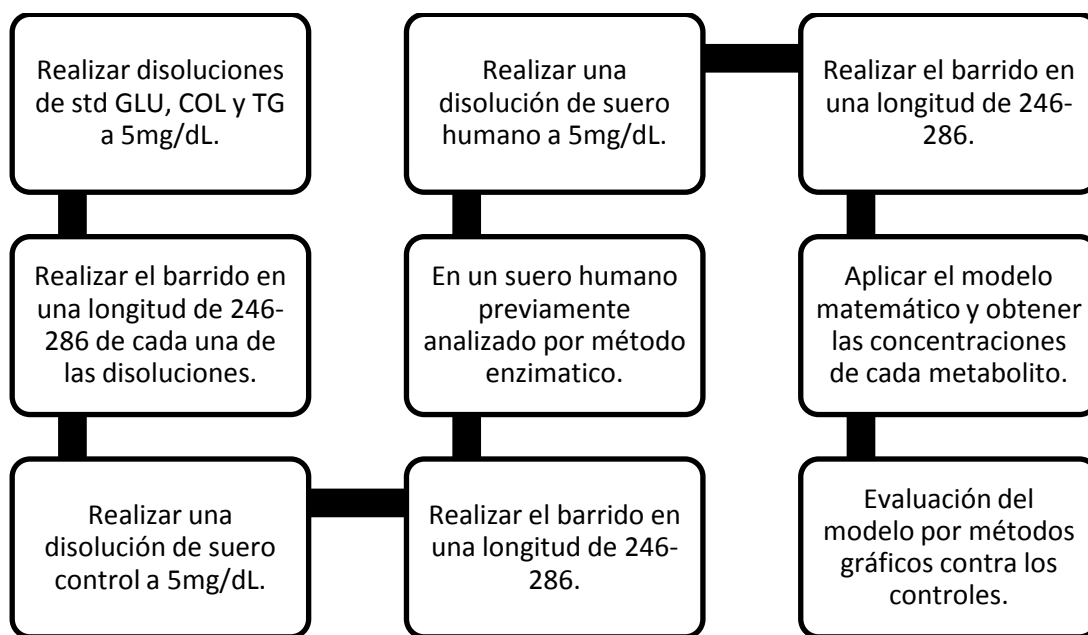
Equipo

- Espectrofotómetro doble haz Perkin Elmer® UV/VIS Modelo Lambda 2 con celdas de cuarzo

Método

Realizar las disoluciones de cada estándar (GLU, COL y TG) a una concentración de 5mg/L respectivamente, la longitud de onda indicada para este proyecto se eligió a base de ensayos en las mismas condiciones antes mencionadas, dando como resultado que en este rango se obtienen los resultados óptimos esperados, se realizara el barrido en una longitud de onda de 246-286nm, de cada disolución. Realizar otra disolución de suero control a una concentración de 5mg/L y realizar el barrido en el intervalo de 246-286nm. Previamente se obtiene un suero (suero problema) y se determinaran los metabolitos de GLU, COL y TG por métodos enzimáticos, después se hará una disolución de este suero a una concentración de 5mg/L y se procederá a realizar el barrido en una longitud de onda de 246-286 nm. Cuando se obtengan las absorbancias de cada estándar y el suero problema se procederá a sustituir los valores en cada fórmula propuesta para el modelo matemático. Con los datos procesados y con ayuda del paquete estadístico Statgraphics Plus 5.0[®], se obtendrá la ecuación de la recta para la muestra, posteriormente se obtendrá la concentración respectiva de cada metabolito. Evaluación del modelo por métodos gráficos contra los controles.

f. Diagrama de flujo



g. Diseño estadístico

La regresión lineal múltiple se utilizará en este proyecto^{11, 12}, con los datos que se obtengan se procederá a aplicar las siguientes fórmulas^{27, 28, 29}:

Primero se sustituirá los valores de las muestras:

A_m = absorbancia de la muestra

A_{s1} = absorbancia del estándar 1 (Triglicéridos)

A_{s2} = absorbancia del estándar 2 (Colesterol)

A_{s3} = absorbancia del estándar 3 (Glucosa)

Siguiendo la ecuación siguiente:

$$A_m = \epsilon_1 b C_1 + \epsilon_2 b C_2 + \epsilon_3 b C_3$$

Siendo b constante $b=1$

$$A_m = \epsilon_1 C_1 + \epsilon_2 C_2 + \epsilon_3 C_3$$

Considerando a los 3 estándares:

$$A_{s1} = \epsilon_1 C_{s1} \quad A_{s2} = \epsilon_2 C_{s2} \quad A_{s3} = \epsilon_3 C_{s3}$$

Y dividiendo entre A_{s1} para reducir términos:

$$\frac{A_m}{A_{s1}} = \frac{C_1}{C_{s1}} + \frac{C_{s1} A_{s2} C_2}{A_{s1} C_{s2} C_{s1}} + \frac{C_{s1} A_{s3} C_3}{C_{s3} A_{s1} C_{s1}}$$

Cancelando términos iguales

$$\frac{A_m}{A_{s1}} = \frac{C_1}{C_{s1}} + \frac{A_{s2} C_2}{A_{s1} C_{s2}} + \frac{A_{s3} C_3}{C_{s3} A_{s1}}$$

Se obtiene la ecuación de la recta del suero

$$y = \beta_0 + \beta_1 C_2 + \beta_2 C_3$$

Donde:

$$\beta_0 = \frac{C_1}{C_{s1}}, \quad \beta_1 = \frac{A_{s2}}{A_{s1} C_{s2}}, \quad \beta_2 = \frac{A_{s3}}{A_{s1} C_{s3}}$$

MANEJO DE LOS DATOS OBTENIDOS

De los datos obtenidos se realizarán las gráficas correspondientes de concentración de los metabolitos de las muestras y se evaluará el comportamiento de las gráficas comparando estos valores contra los datos arrojados por los controles.

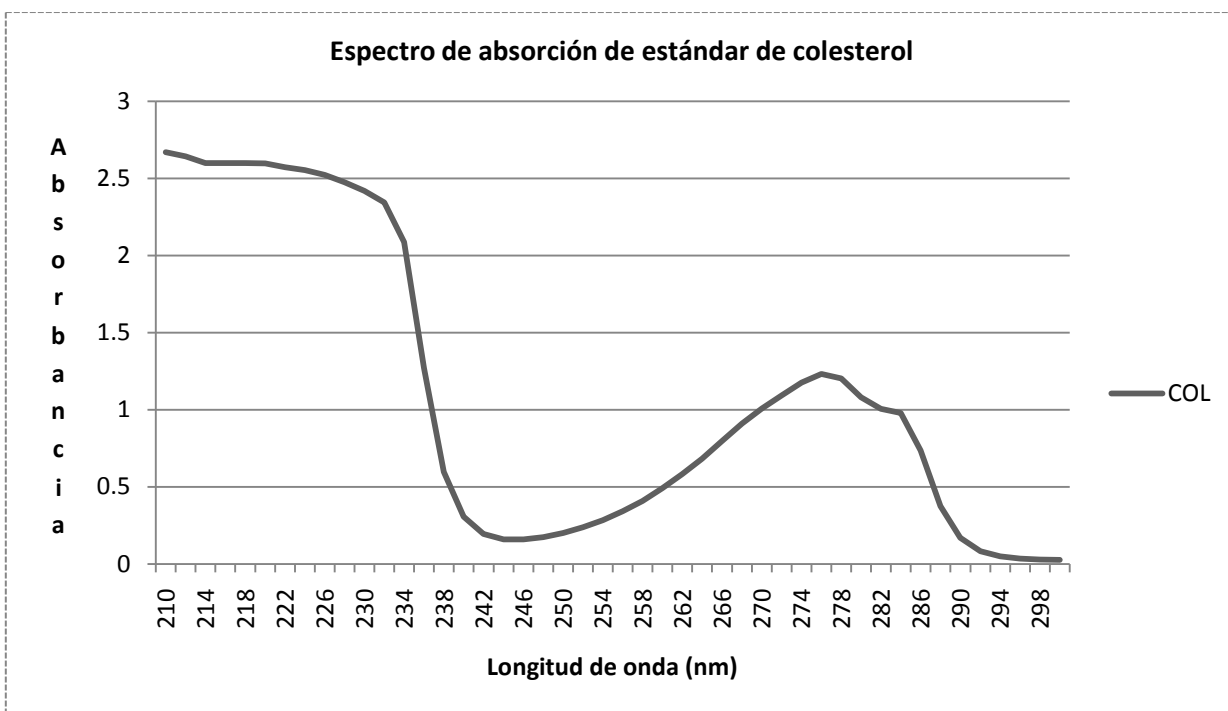
VIII. RESULTADOS

Establecimiento de parámetros

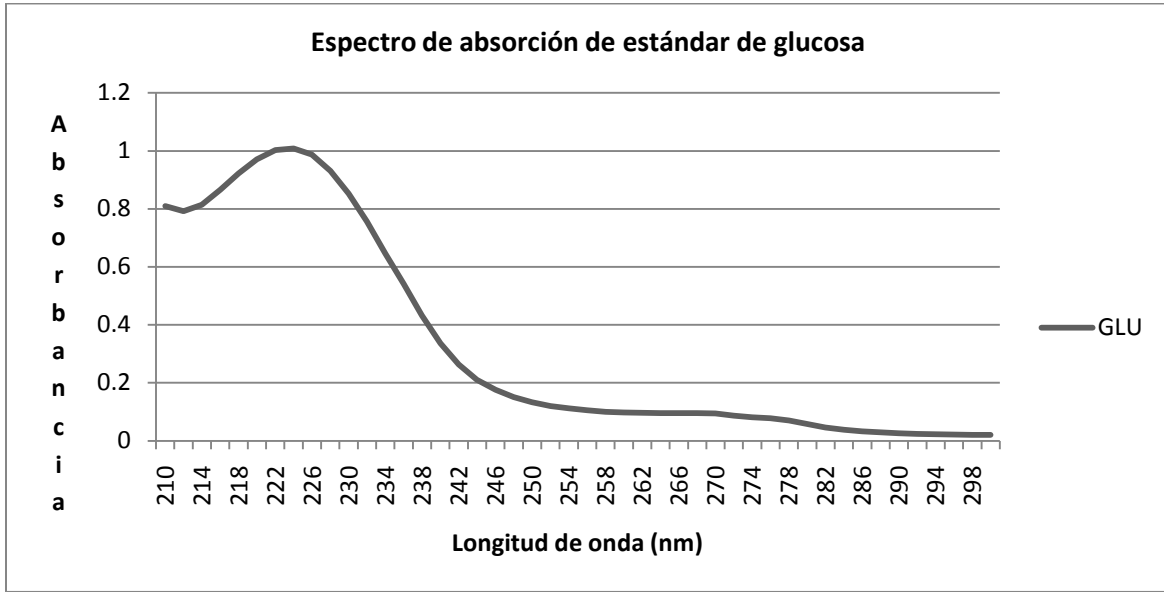
Selección de la longitud de onda

Para establecer los parámetros que se utilizaron en este trabajo, primero se dispuso de un suero control ambc® y se corrió en un rango de longitud de onda de 210-320nm, obteniendo su espectro de absorción.

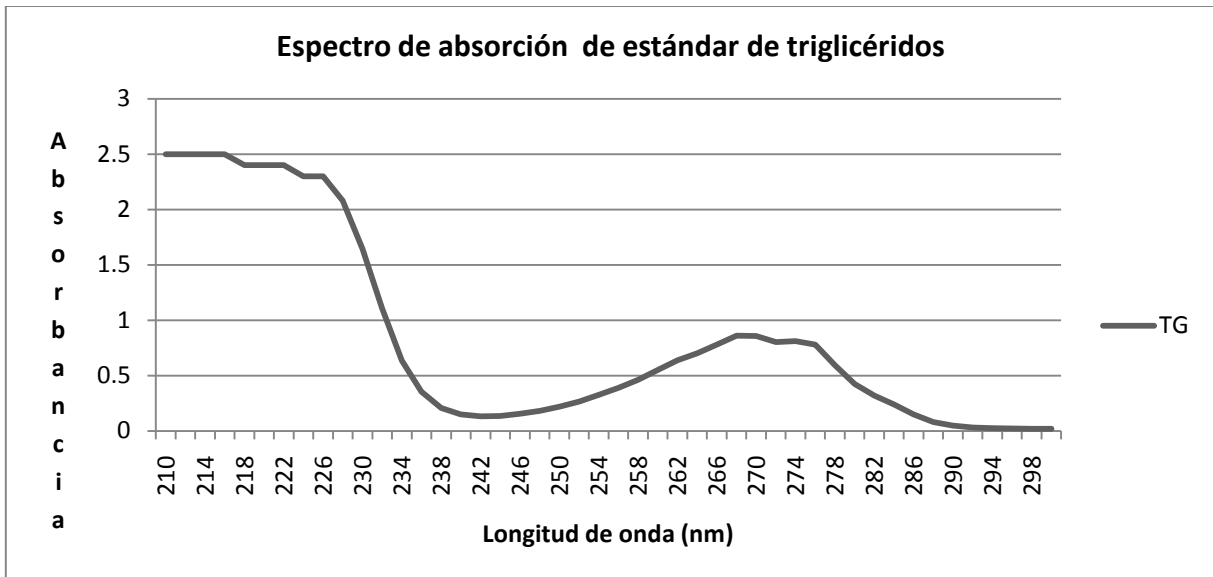
Después se procedió a realizar lo mismo con los estándares de triglicéridos (TG), colesterol (COL) y glucosa (GLU), en el rango de longitud de onda de 200-300 nm, obteniéndose los espectros de absorción siguientes:



Gráfica 1 Espectro de absorción de Colesterol. Fuente: elaboración propia.

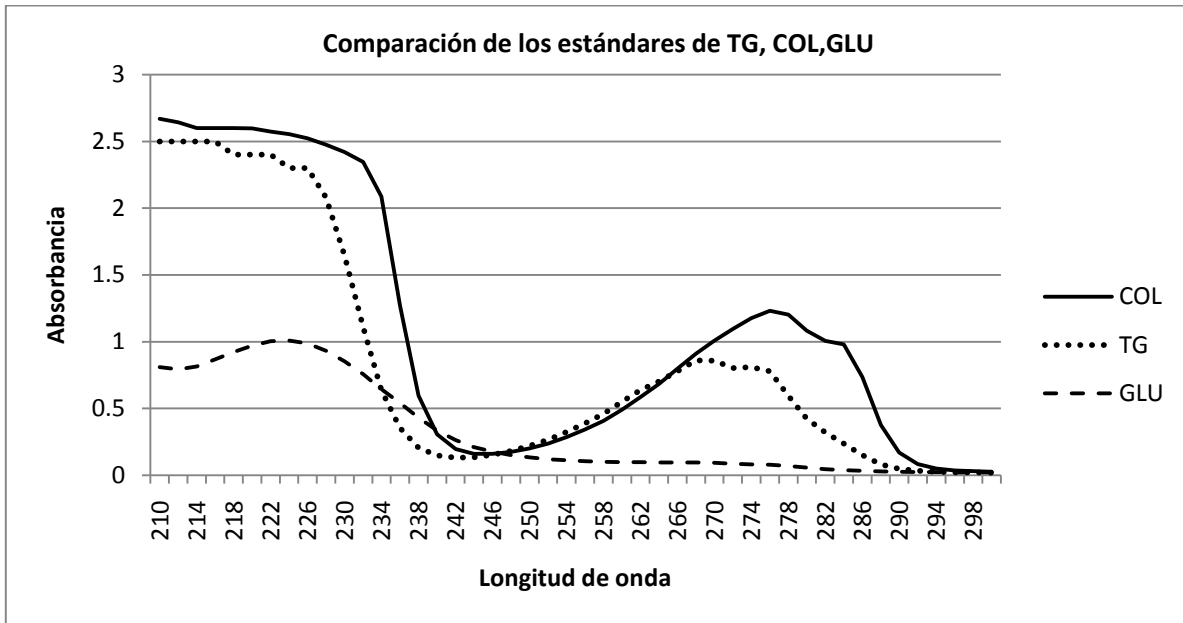


Gráfica 2 Espectro de absorción de Glucosa. Fuente: elaboración propia.



Gráfica 3 Espectro de absorción de Triglicéridos. Fuente: elaboración propia.

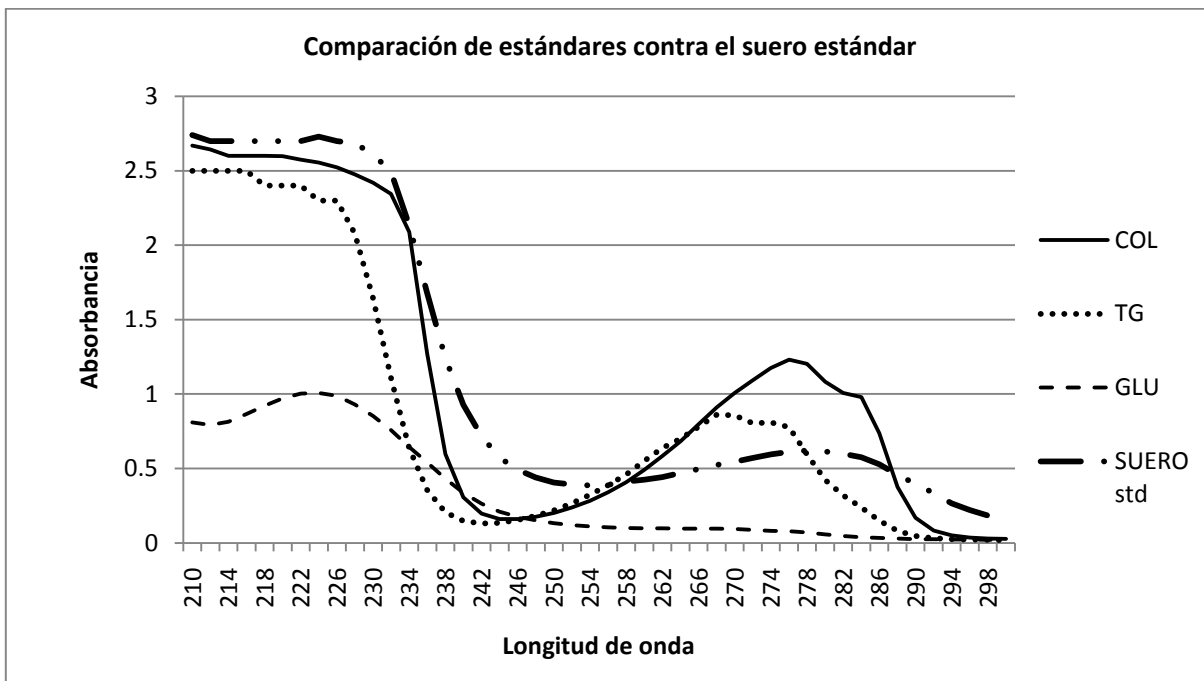
Una vez teniendo estos espectros de absorción por separado, se sobrepusieron en una sola gráfica para observar su comportamiento y definir el rango de trabajo.



Gráfica 4 Espectros de absorción de GLU (rosa), COL (azul) y TG (rojo). Fuente: elaboración propia.

Basándose en la gráfica 4, el rango de longitud de onda para este proyecto, se fija entre 246-286nm.

También se leyó la muestra de suero control en el mismo rango de longitud de onda, observándose su absorción y semejante comportamiento que los estándares antes mencionados.



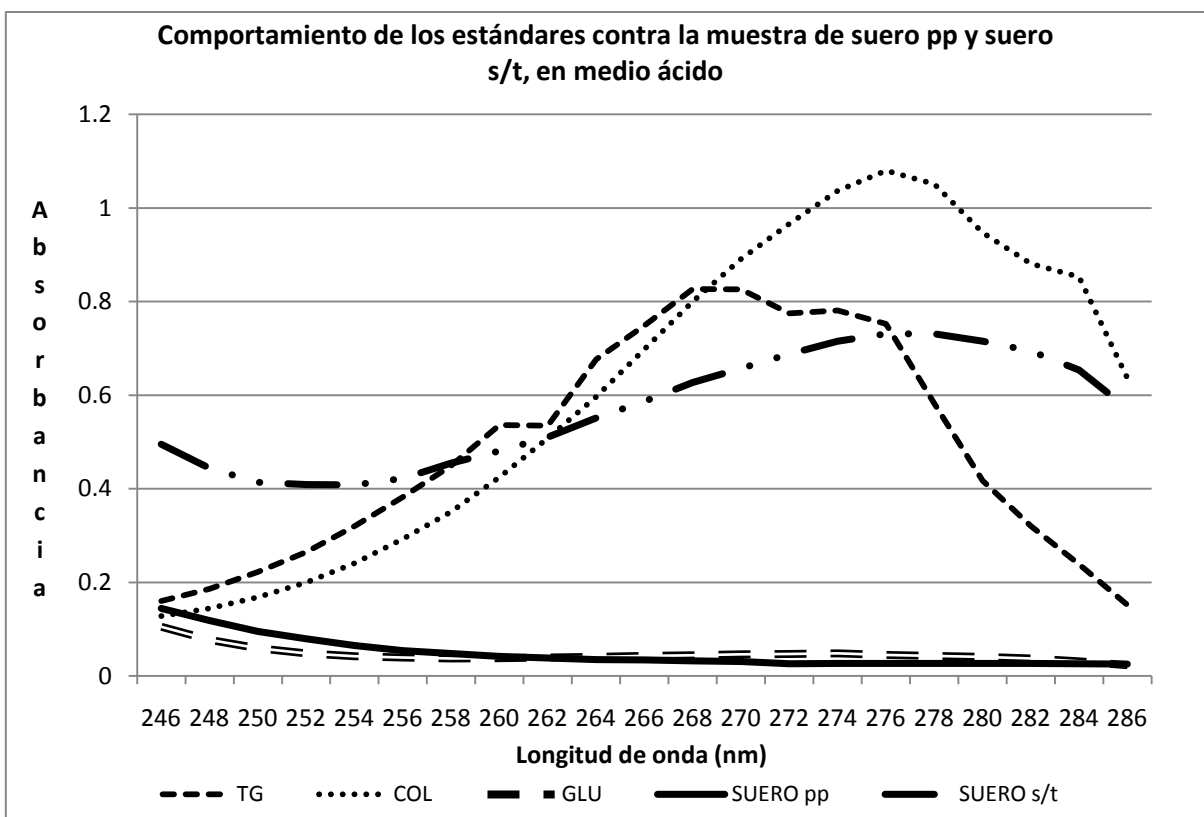
Gráfica 5 Espectros de absorción de los estándares comparándolos contra el suero estándar. Fuente: elaboración propia.

Establecimiento del orden los estándares

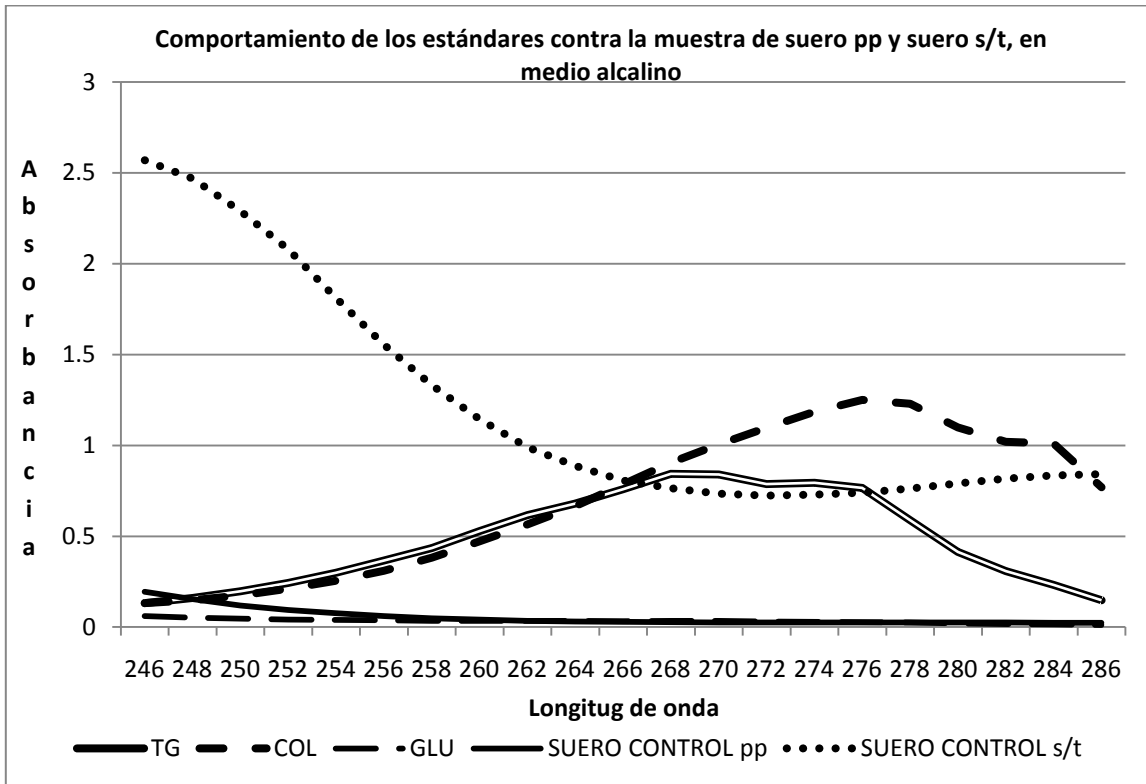
En esta prueba, se midió la absorción de los tres estándares en el rango de 246-286nm. Posteriormente con ayuda del programa estadístico Statgraphics Plus 5.0[®], se calcularon los residuales de la ecuación así como su respectiva gráfica. Esto se realizó cambiando de posición los estándares en el modelo matemático, se observó que el orden de TG, COL y GLU tenía un comportamiento adecuado a los fines y propósitos de este proyecto.

Modificación del pH medio

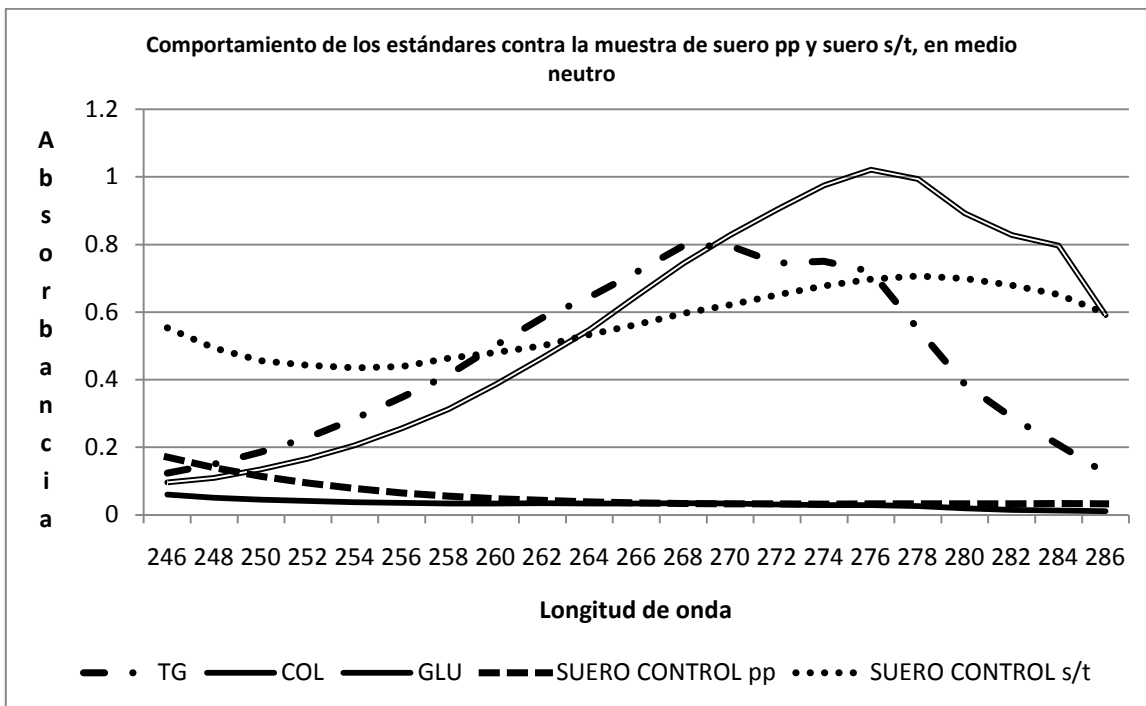
Teniendo como bibliografía los insertos de cada metabolito, se decidió modificar el pH del medio. Se uso un medio ácido, alcalino y neutro. También se propuso en un medio neutro la precipitación de proteínas (pp) y todas estas modificaciones se compararon con un suero control sin tratamiento (s/t); todo esto se realizó en muestras de suero control o suero estándar. Se obtuvieron las siguientes graficas:



Gráfica 6 Comportamiento de los estándares contra la muestra de suero pp (suero precipitado) y suero s/t (suero sin tratamiento), en medio ácido. Fuente. elaboración propia.



Gráfica 7 Comportamiento de los estándares contra la muestra de suero pp (suero precipitado) y suero s/t (suero sin tratamiento), en medio alcalino. Fuente: elaboración propia.



Gráfica 8 Comportamiento de los estándares contra la muestra de suero pp (suero precipitado) y suero s/t (suero sin tratamiento), en medio neutro. Fuente: elaboración propia.

Tabla 1 Resultados "Prueba de modificación del pH del medio y precipitación de proteínas" en suero control. Fuente: elaboración propia.

	Metabolitos	Suero con precipitación de proteínas (mg/dL)	Suero sin tratamiento (mg/dL)
HCl	TG	1.558	2.5767
	COL	4.4746	129.1
	GLU	150.051	435.61
NaOH	TG	1.40452	264.146
	COL	2.14914	96.329
	GLU	336.4334	4819.36
Neutro	TG	255.942	86.6992
	COL	4.6102	168.4466
	GLU	303.615	912.279

Observando las gráficas 6, 7 y 8, se terminó de realizar las pruebas para el establecimiento de parámetros que se utilizaron en esta prueba. Con base en lo anterior y en la tabla 1 se determinaron las condiciones con las que realizó el trabajo:

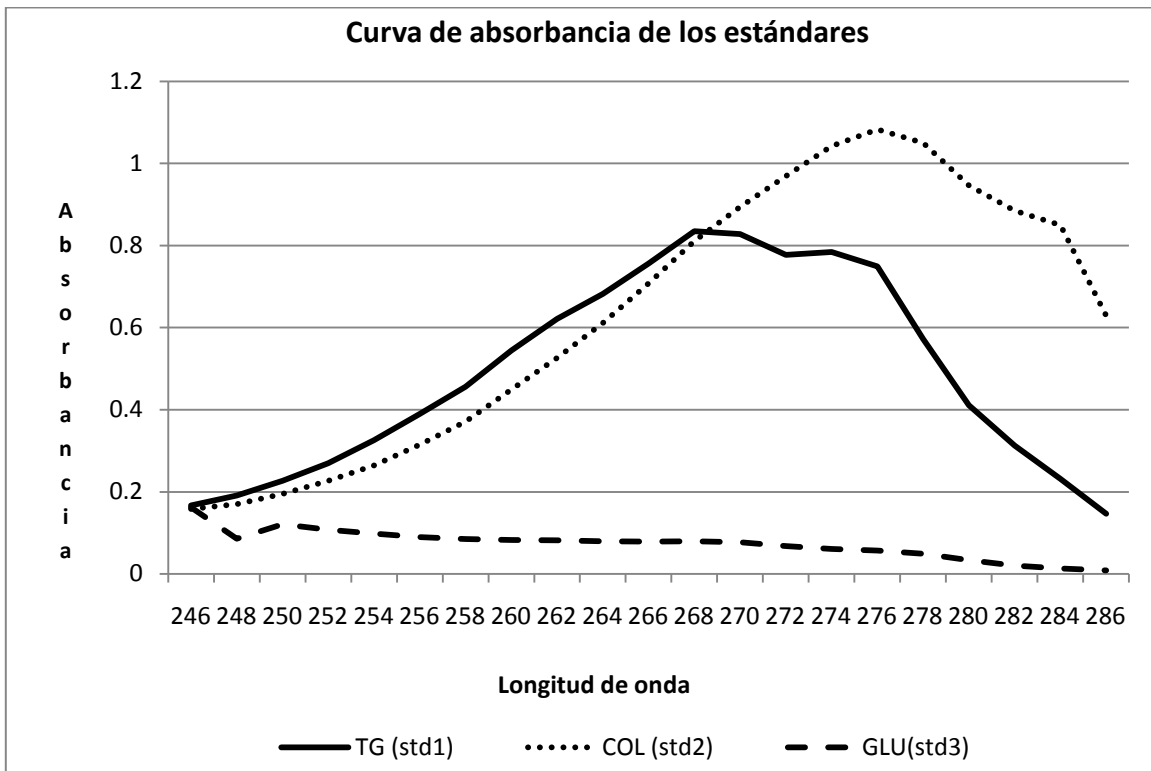
- El rango de longitud de onda establecido fue de 246-286nm.
- El orden de los estándares en el modelo de regresión múltiple fue: Triglicéridos, Colesterol y Glucosa.
- El medio de reacción fue neutro.
- No se utilizó la precipitación de proteínas.

Los datos que se utilizaron en la prueba final, son procedentes de 5 sueros humanos, los cuales se les determinó los metabolitos en el laboratorio L-402 en el Campus 2 FES Zaragoza, por el método visible. Los resultados del método de regresión lineal múltiple fueron comparados con los valores del método visible. También se realizó una mezcla de estándares, la cual se adicionó a cada una de las muestras de suero humano, aplicando el método de adición de estándar, con la finalidad de encontrar un blanco para la prueba.

Primero se realizó la lectura de las absorbancias de los estándares, TG, COL, GLU, los cuales fueron las variables del modelo de regresión lineal múltiple.

Tabla 2 Absorbancias de los estándares triglicéridos (TG), colesterol (COL) y glucosa (GLU). Fuente: elaboración propia.

Longitud de onda (nm)	TG (std1)	COL (std2)	GLU(std3)
246	0.167	0.158	0.162
248	0.191	0.17	0.086
250	0.227	0.195	0.121
252	0.27	0.227	0.108
254	0.326	0.264	0.098
256	0.39	0.315	0.09
258	0.456	0.371	0.085
260	0.544	0.449	0.083
262	0.621	0.526	0.082
264	0.682	0.611	0.08
266	0.756	0.708	0.079
268	0.835	0.811	0.08
270	0.828	0.894	0.077
272	0.777	0.969	0.068
274	0.784	1.042	0.061
276	0.749	1.083	0.057
278	0.572	1.05	0.049
280	0.411	0.946	0.034
282	0.313	0.885	0.02
284	0.232	0.85	0.013
286	0.147	0.629	0.009



Gráfica 9 Curva de absorbancia de estándares. Fuente: elaboración propia.

Se hizo una mezcla de estándares, a la cual se midió su absorbancia en el rango de longitud de onda antes establecida. Se procedió a calcular su concentración por el método de regresión lineal múltiple. Esta mezcla se adicionó a cada una de las cinco muestras y se leyó su absorbancia, por lo que la concentración de los estándares dentro de la mezcla solo se calculó una vez y estos resultados de concentraciones se restaron a la muestra de suero humano mas mezcla de estándar de cada una de las cinco muestras.

Tabla 3 Absorbancia de la mezcla de estándares, y la razón de la división de la mezcla de estándares, estándar 2 y estándar 3 entre estándar 1. Fuente: elaboración propia.

MEZCLA ESTANDARES				
Absorbancia				
Longitud de onda (nm)	MEZCLA STD	MSTD/STD1	STD2/STD1	STD3/STD1
246	0.182	1.08982036	0.94610778	0.97005988
248	0.182	0.95287958	0.89005236	0.45026178
250	0.194	0.85462555	0.85903084	0.53303965
252	0.204	0.75555556	0.84074074	0.4
254	0.231	0.70858896	0.80981595	0.3006135
256	0.266	0.68205128	0.80769231	0.23076923
258	0.298	0.65350877	0.81359649	0.18640351
260	0.343	0.63051471	0.82536765	0.15257353
262	0.39	0.62801932	0.84702093	0.13204509
264	0.431	0.63196481	0.89589443	0.11730205
266	0.482	0.63756614	0.93650794	0.10449735
268	0.533	0.63832335	0.97125749	0.09580838
270	0.556	0.67149758	1.07971014	0.09299517
272	0.563	0.72458172	1.24710425	0.08751609
274	0.581	0.74107143	1.32908163	0.07780612
276	0.564	0.75300401	1.4459279	0.07610147
278	0.489	0.8548951	1.83566434	0.08566434
280	0.42	1.02189781	2.30170316	0.08272506
282	0.372	1.1884984	2.82747604	0.06389776
284	0.302	1.30172414	3.6637931	0.05603448
286	0.2	1.36054422	4.27891156	0.06122449

ECUACIÓN

$$\text{Mezcla de estándares/STD1} = 0.368349 + 0.24368 \cdot \text{STD2/STD1} + 0.533617 \cdot \text{STD3/STD1}$$

CÁLCULOS

$$C_1 = \text{TG} = 0.368349(20\text{mg/L}) = 7.36698\text{mg/L}$$

Multiplicando por el factor de dilución

$$7.36698\text{mg/L}(0.005\text{L}) = 0.0368349\text{mg}$$

$$\frac{0.05mL}{0.3mL} = \frac{0.0368349mg}{x}$$

$$x = 0.221mg/0.3mL$$

$$C_2 = COL = 0.24368(20mg/L) = 4.8736mg/L$$

Multiplicando por el factor de dilución

$$4.8736mg/L(0.005L) = 0.024368mg$$

$$\frac{0.05mL}{0.3mL} = \frac{0.024368mg}{x}$$

$$x = 0.160mg/0.3mL$$

$$C_3 = GLU = 0.533617(10mg/L) = 5.33617 mg/L$$

Multiplicando por el factor de dilución

$$5.33617mg/L(0.005L) = 0.02668085 mg$$

$$\frac{0.05mL}{0.3mL} = \frac{0.02668085 mg}{x}$$

$$x = 0.160 mg/0.3mL$$

Tabla 4 Concentración de TG, COL y GLU en la mezcla de estándares obtenida por el modelo de regresión lineal múltiple. Fuente: elaboración propia.

Metabolito	Concentración (mg/0.3mL)
TG	0.221
COL	0.1462
GLU	0.160

Tabla 5 Absorbancia de la muestra 1, y la razón de la división de la muestra 1, estándar 2 y estándar 3 entre estándar 1. Fuente: elaboración propia.

MUESTRA 1				
	Absorbancia		Muestra 1	Muestra 2
Longitud de onda (nm)	SUERO HUMANO (SH)	SUERO +MEZCLA STD (S+MSTD)	SH/STD1	S+MSTD/STD1
246	0.433	0.561	2.59281437	3.35928144
248	0.386	0.523	2.02094241	2.7382199
250	0.359	0.512	1.5814978	2.25550661
252	0.355	0.524	1.31481481	1.94074074
254	0.355	0.548	1.08895706	1.6809816
256	0.365	0.59	0.93589744	1.51282051
258	0.393	0.646	0.86184211	1.41666667
260	0.413	0.717	0.75919118	1.31801471
262	0.435	0.779	0.70048309	1.25442834
264	0.471	0.851	0.69061584	1.24780059
266	0.503	0.93	0.66534392	1.23015873
268	0.538	1.007	0.64431138	1.20598802
270	0.565	1.054	0.68236715	1.27294686
272	0.595	1.086	0.76576577	1.3976834
274	0.624	1.133	0.79591837	1.44515306
276	0.647	1.145	0.86381842	1.52870494
278	0.659	1.09	1.1520979	1.90559441
280	0.653	1.01	1.58880779	2.45742092
282	0.64	0.944	2.04472843	3.01597444
284	0.618	0.875	2.6637931	3.77155172
286	0.561	0.73	3.81632653	4.96598639

*Para fines prácticos la muestra de suero humano se nombró muestra 1 y la muestra de suero humano + mezcla de estándares se nombró muestra 2

Para la muestra 1

ECUACIÓN

$$\text{MUESTRA1/STD1} = -0.418951 + 0.855562 \cdot \text{STD2/STD1} + 2.51859 \cdot \text{STD3/STD1}$$

CÁLCULOS

$$C_1 = \text{TG} = 0.418951 (20\text{mg/L}) = 8.37902\text{mg/L}$$

Multiplicando por el factor de dilución

$$8.3790\text{mg/L}(0.005\text{L}) = 0.0418951\text{mg}$$

$$\frac{0.05\text{mL}}{100\text{mL}} = \frac{0.0418951\text{mg}}{x}$$

$$x = 83.7902\text{mg/dL}$$

$$C_2 = \text{COL} = 0.855562 (20\text{mg/L}) = 17.11124 \text{ mg/L}$$

Multiplicando por el factor de dilución

$$17.11124 \text{ mg/L} (0.005\text{L}) = 0.0855562 \text{ mg}$$

$$\frac{0.05\text{mL}}{100\text{mL}} = \frac{0.0855562\text{mg}}{x}$$

$$x = 171.1124 \text{ mg/dL}$$

$$C_3 = \text{GLU} = 2.51859(10\text{mg/L}) = 25.1859\text{mg/L}$$

Multiplicando por el factor de dilución

$$25.1859\text{mg/L}(0.005\text{L}) = 0.1259\text{mg}$$

$$\frac{0.05\text{mL}}{100\text{mL}} = \frac{0.1259\text{mg}}{x}$$

$$x = 251.859\text{mg/dL}$$

Para la muestra 2

ECUACIÓN

$$\text{MUESTRA 2/STD1} = -0.0489032 + 1.04776 \cdot \text{STD2/STD1} + 2.76358 \cdot \text{STD3/STD1}$$

CALCULOS

$$C_1 = \text{TG} = 0.0489032(20\text{mg/L}) = 0.978064 \text{ mg/L}$$

Multiplicando por el factor de dilución

$$0.978064\text{mg/L}(0.005\text{L}) = 0.00489032\text{mg}$$

$$\frac{0.05\text{mL}}{100 \text{ mL}} = \frac{0.00489032 \text{ mg}}{x}$$

$$x = 9.78064\text{mg/dL}$$

$$C_2 = \text{COL} = 1.04776 (20\text{mg/L}) = 20.9552 \text{ mg/L}$$

Multiplicando por el factor de dilución

$$20.9552 \text{ mg/L}(0.005\text{L}) = 0.104776\text{mg}$$

$$\frac{0.05\text{mL}}{100 \text{ mL}} = \frac{0.104776 \text{ mg}}{x}$$

$$x = 209.552 \text{ mg/dL}$$

$$C_3 = \text{GLU} = 2.76358(10\text{mg/L}) = 27.6358 \text{ mg/L}$$

Multiplicando por el factor de dilución

$$27.6358\text{mg/L}(0.005\text{L}) = 0.138179\text{mg}$$

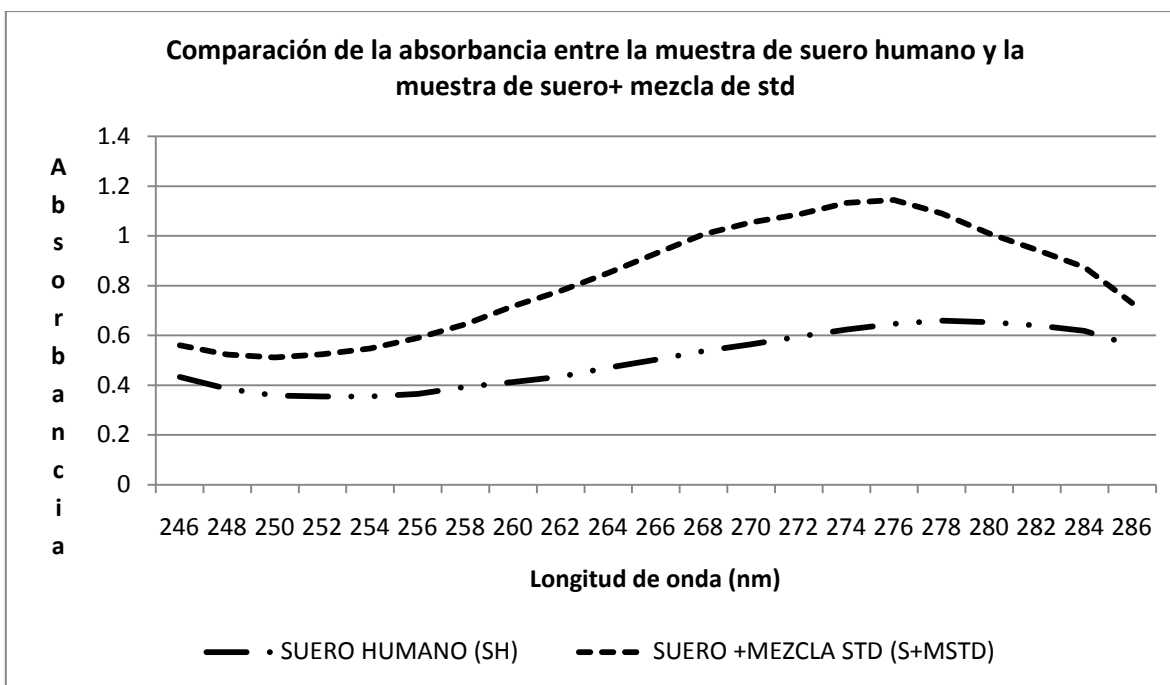
$$\frac{0.05\text{mL}}{100 \text{ mL}} = \frac{0.138179 \text{ mg}}{x}$$

$$x = 276.358 \text{ mg/dL}$$

A estos tres resultados se les resta la concentración de la mezcla de estándares, para obtener un nuevo valor y compararlo con el valor de método por espectrofotometría visible.

Tabla 6 Comparación de los tres métodos usados en la muestra 1. Fuente: elaboración propia.

MUESTRA 1			
METABOLITOS	VISIBLE (mg/dL)	SUERO HUMANO + MEZCLA STD (mg/dL)	SUERO HUMANO (mg/dL)
TG	205.7	9.55964	83.7902
COL	153	209.4058	171.1124
GLU	84.2	276.2118	251.859



Gráfica 10 Comparación de la absorbancia entre la muestra de suero humano y la muestra de suero+ mezcla de estándar. Fuente: elaboración propia.

Tabla 7 Absorbancia de la muestra 2, y la razón de la división de la muestra 1, estándar 2 y estándar 3 entre estándar 1. Fuente: elaboración propia.

MUESTRA 2				
Longitud de onda (nm)	Absorbancia		Muestra 1	Muestra 2
	SUERO HUMANO (SH)	SUERO +MEZCLA STD (S+MSTD)	SH/STD1	S+MSTD/STD1
246	0.401	0.595	2.4011976	3.56287425
248	0.356	0.549	1.86387435	2.87434555
250	0.331	0.532	1.45814978	2.34361233
252	0.33	0.547	1.22222222	2.02592593
254	0.331	0.574	1.01533742	1.7607362
256	0.343	0.62	0.87948718	1.58974359
258	0.374	0.689	0.82017544	1.51096491
260	0.395	0.762	0.72610294	1.40073529
262	0.417	0.837	0.67149758	1.34782609
264	0.456	0.922	0.6686217	1.35190616
266	0.489	1.01	0.6468254	1.33597884
268	0.524	1.103	0.62754491	1.32095808
270	0.556	1.161	0.67149758	1.40217391
272	0.594	1.205	0.76447876	1.55083655
274	0.625	1.26	0.79719388	1.60714286
276	0.65	1.286	0.86782377	1.71695594
278	0.669	1.241	1.16958042	2.16958042
280	0.672	1.163	1.6350365	2.8296837
282	0.661	1.1	2.11182109	3.514377
284	0.642	1.032	2.76724138	4.44827586
286	0.579	0.87	3.93877551	5.91836735

*Para fines prácticos la muestra de suero humano se nombró muestra 1 y la muestra de suero humano + mezcla de estándares se nombró muestra 2

Para la muestra 1

ECUACIÓN

$$\text{MUESTRA 1/std1} = -0.457942 + 0.897613 \cdot \text{std2/std1} + 2.29653 \cdot \text{std3/std1}$$

CÁLCULOS

$$C_1 = \text{TG} = 0.457942 (20\text{mg/L}) = 9.15884 \text{ mg/L}$$

Multiplicando por el factor de dilución

$$9.15884\text{mg/L}(0.005\text{L}) = 0.0457942 \text{ mg}$$

$$\frac{0.05\text{mL}}{100 \text{ mL}} = \frac{0.0457942 \text{ mg}}{x}$$

$$x = 91.5884 \text{ mg/dL}$$

$$C_2 = \text{COL} = 0.897613 (20\text{mg/L}) = 17.95226 \text{ mg/L}$$

Multiplicando por el factor de dilución

$$17.95226 \text{ mg/L} (0.005\text{L}) = 0.0897613 \text{ mg}$$

$$\frac{0.05\text{mL}}{100 \text{ mL}} = \frac{0.0897613 \text{ mg}}{x}$$

$$x = 179.5226 \text{ mg/dL}$$

$$C_3 = \text{GLU} = 2.29653 (10\text{mg/L}) = 22.9653 \text{ mg/L}$$

Multiplicando por el factor de dilución

$$22.9653 \text{ mg/L} (0.005\text{L}) = 0.1148265 \text{ mg}$$

$$\frac{0.05\text{mL}}{100 \text{ mL}} = \frac{0.1148265 \text{ mg}}{x}$$

$$x = 229.653 \text{ mg/dL}$$

Para la muestra 2

ECUACIÓN

$$\text{Muestra 2/std1} = -0.191753 + 1.28238 \cdot \text{std2/std1} + 2.88207 \cdot \text{std3/std1}$$

CÁLCULOS

$$C_1 = \text{TG} = 0.191753 (20\text{mg/L}) = 3.83506 \text{ mg/L}$$

Multiplicando por el factor de dilución

$$3.83506 \text{ mg/L} (0.005\text{L}) = 0.0191753 \text{ mg}$$

$$\frac{0.05\text{mL}}{100 \text{ mL}} = \frac{0.0191753 \text{ mg}}{x}$$

$$x = 38.3506 \text{ mg/dL}$$

$$C_2 = \text{COL} = 1.28238 (20\text{mg/L}) = 25.6476 \text{ mg/L}$$

Multiplicando por el factor de dilución

$$25.6476 \text{ mg/L} (0.005\text{L}) = 0.128238 \text{ mg}$$

$$\frac{0.05\text{mL}}{100 \text{ mL}} = \frac{0.128238 \text{ mg}}{x}$$

$$x = 256.476 \text{ mg/dL}$$

$$C_3 = \text{GLU} = 2.88207 (10\text{mg/L}) = 28.8207 \text{ mg/L}$$

Multiplicando por el factor de dilución

$$28.8207 \text{ mg/L} (0.005\text{L}) = 0.1441035 \text{ mg}$$

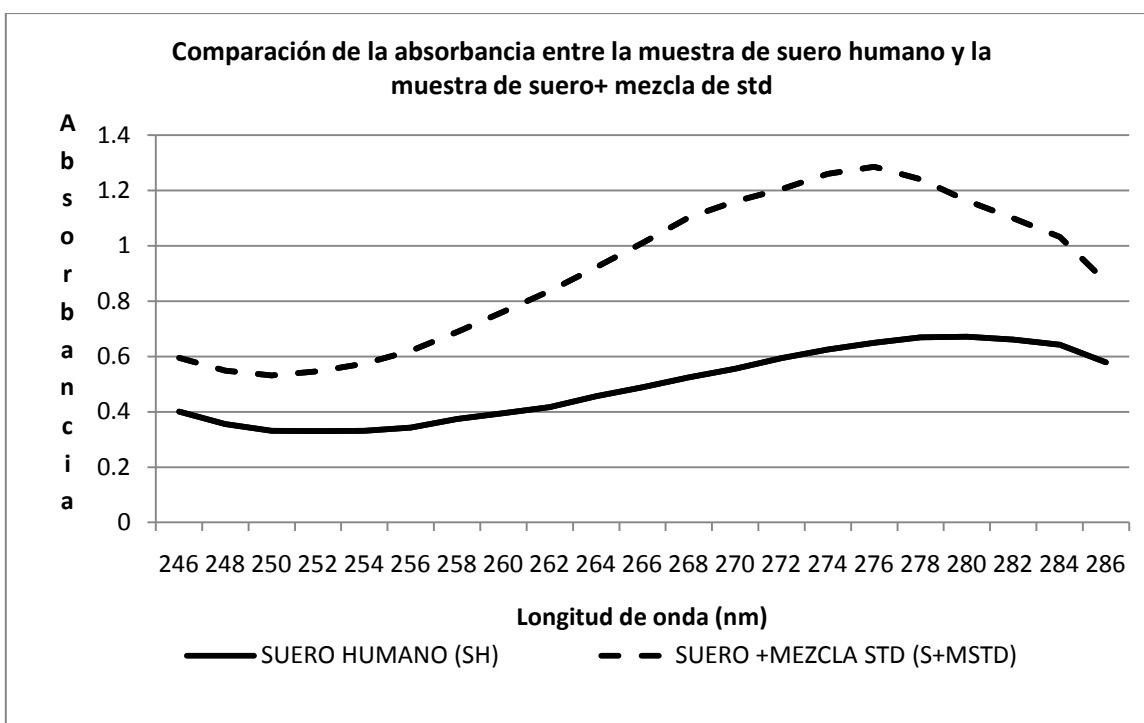
$$\frac{0.05\text{mL}}{100 \text{ mL}} = \frac{0.1441035 \text{ mg}}{x}$$

$$x = 288.207 \text{ mg/dL}$$

A estos tres resultados se les resta la concentración de cada estándar de la mezcla de estándares, para obtener un nuevo valor y compararlo con el valor de método por espectrofotometría visible.

Tabla 8 Comparación de los tres métodos usados en la muestra 2. Fuente: elaboración propia.

MUESTRA 2			
METABOLITOS	VISIBLE (mg/dL)	MUESTRA + MEZCLA STD (mg/dL)	MUESTRA (mg/dL)
TG	108	38.1296	91.5884
COL	172	256.3298	179.5226
GLU	76	288.047	229.653



Gráfica 11 Comparación de la absorbancia entre la muestra de suero humano y la muestra de suero+ mezcla de estándar. Fuente: elaboración propia.

Tabla 9 Absorbancia de la muestra 3, y la razón de la división de la muestra 1, estándar 2 y estándar 3 entre estándar 1. Fuente: elaboración propia.

MUESTRA 3				
Longitud de onda (nm)	Absorbancia		Muestra 1	Muestra 2
	SUERO HUMANO (SH)	SUERO +MEZCLA STD (S+MSTD)	SH/STD1	S+MSTD/STD1
246	0.457	0.576	2.73652695	3.4491018
248	0.418	0.547	2.18848168	2.86387435
250	0.392	0.542	1.72687225	2.3876652
252	0.39	0.563	1.44444444	2.08518519
254	0.389	0.593	1.19325153	1.8190184
256	0.398	0.638	1.02051282	1.63589744
258	0.44	0.7	0.96491228	1.53508772
260	0.441	0.767	0.81066176	1.40992647
262	0.459	0.836	0.73913043	1.34621578
264	0.493	0.914	0.7228739	1.34017595
266	0.522	0.999	0.69047619	1.32142857
268	0.552	1.082	0.66107784	1.29580838
270	0.579	1.133	0.69927536	1.36835749
272	0.611	1.172	0.78635779	1.50836551
274	0.637	1.219	0.8125	1.55484694
276	0.657	1.236	0.87716956	1.65020027
278	0.672	1.183	1.17482517	2.06818182
280	0.672	1.105	1.6350365	2.68856448
282	0.66	1.042	2.1086262	3.32907348
284	0.642	0.972	2.76724138	4.18965517
286	0.586	0.818	3.98639456	5.56462585

*Para fines prácticos la muestra de suero humano se nombró muestra 1 y la muestra de suero humano + mezcla de estándares se nombró muestra 2

Para la muestra 1

ECUACIÓN

$$\text{MUESTRA 1/std1} = -0.429064 + 0.883544 \cdot \text{std2/std1} + 2.71976 \cdot \text{std3/std1}$$

CÁLCULOS

$$C_1 = \text{TG} = 0.429064 (20\text{mg/L}) = 8.58128 \text{ mg/L}$$

Multiplicando por el factor de dilución

$$8.58128 \text{ mg/L} (0.005\text{L}) = 0.0429064 \text{ mg}$$

$$\frac{0.05\text{mL}}{100 \text{ mL}} = \frac{0.0429064 \text{ mg}}{x}$$

$$x = 85.8128 \text{ mg/dL}$$

$$C_2 = \text{COL} = 0.883544 (20\text{mg/L}) = 17.67088\text{mg/L}$$

Multiplicando por el factor de dilución

$$17.67088 \text{ mg/L} (0.005\text{L}) = 0.0883544\text{mg}$$

$$\frac{0.05\text{mL}}{100 \text{ mL}} = \frac{0.0883544 \text{ mg}}{x}$$

$$x = 176.7088 \text{ mg/dL}$$

$$C_3 = \text{GLU} = 2.71976 (10\text{mg/L}) = 27.976 \text{ mg/L}$$

Multiplicando por el factor de dilución

$$27.976 \text{ mg/L} (0.005\text{L}) = 0.13988 \text{ mg}$$

$$\frac{0.05\text{mL}}{100 \text{ mL}} = \frac{0.13988 \text{ mg}}{x}$$

$$x = 271.97 \text{ mg/dL}$$

Para la muestra 2

ECUACIÓN

$$\text{MUESTRA 2/std1} = -0.0812746 + 1.17613 \cdot \text{std2/std1} + 2.82326 \cdot \text{std3/std1}$$

CÁLCULOS

$$C_1 = \text{TG} = 0.0812746 (20\text{mg/L}) = 1.625492 \text{ mg/L}$$

Multiplicando por el factor de dilución

$$1.625492 \text{ mg/L} (0.005\text{L}) = 0.00812746 \text{ mg}$$

$$\frac{0.05\text{mL}}{100 \text{ mL}} = \frac{0.00812746 \text{ mg}}{x}$$

$$x = 16.25492 \text{ mg/dL}$$

$$C_2 = \text{COL} = 1.17613 (20\text{mg/L}) = 23.522 \text{ mg/L}$$

Multiplicando por el factor de dilución

$$23.522 \text{ mg/L} (0.005\text{L}) = 0.11761 \text{ mg}$$

$$\frac{0.05\text{mL}}{100 \text{ mL}} = \frac{0.11761 \text{ mg}}{x}$$

$$x = 235.226 \text{ mg/dL}$$

$$C_3 = \text{GLU} = 2.82326 (10\text{mg/L}) = 28.2326 \text{ mg/L}$$

Multiplicando por el factor de dilución

$$28.2326 \text{ mg/L} (0.005\text{L}) = 0.141163\text{mg}$$

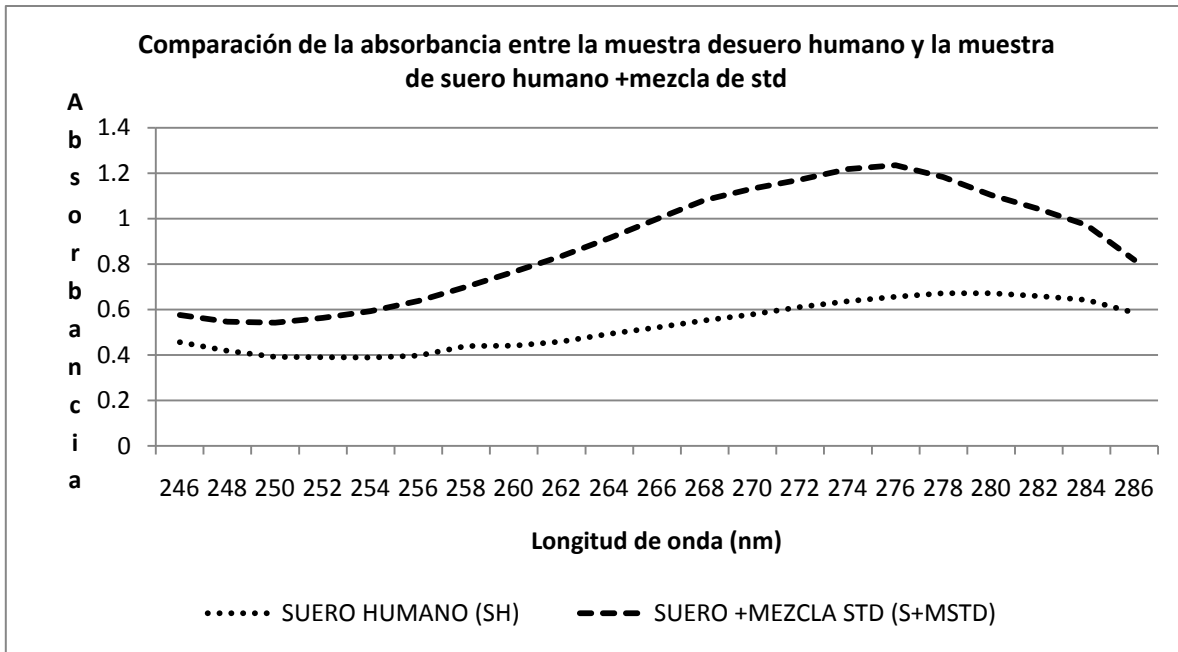
$$\frac{0.05\text{mL}}{100 \text{ mL}} = \frac{0.141163 \text{ mg}}{x}$$

$$x = 282.326 \text{ mg/dL}$$

A estos tres resultados se les resta la concentración de cada estándar de la mezcla de estándares, para obtener un nuevo valor y compararlo con el valor de método por espectrofotometría visible.

Tabla 10 Comparación de los tres métodos usados en la muestra 3. Fuente: elaboración propia.

MUESTRA 3			
METABOLITOS	VISIBLE (mg/dL)	MUESTRA + MEZCLA STD (mg/dL)	MUESTRA (mg/dL)
TG	99	16.03	85.8128
COL	170	235.0798	176.7088
GLU	244	282.166	271.97



Gráfica 12 Comparación de la absorbancia entre la muestra de suero humano y la muestra de suero humano + mezcla de estándar. Fuente: elaboración propia.

Tabla 11 Absorbancia de la muestra 4, y la razón de la división de la muestra 1, estándar 2 y estándar 3 entre estándar 1. Fuente: elaboración propia.

MUESTRA 4				
Longitud de onda (nm)	Absorbancia		Muestra 1	Muestra 2
	SUERO HUMANO (SH)	SUERO +MEZCLA STD (S+MSTD)	SH/STD1	S+MSTD/STD1
246	0.413	0.589	2.47305389	3.52694611
248	0.373	0.551	1.95287958	2.88481675
250	0.349	0.537	1.53744493	2.36563877
252	0.346	0.548	1.28148148	2.02962963
254	0.346	0.572	1.06134969	1.75460123
256	0.353	0.61	0.90512821	1.56410256
258	0.38	0.673	0.83333333	1.47587719
260	0.395	0.737	0.72610294	1.35477941
262	0.413	0.802	0.66505636	1.29146538
264	0.446	0.878	0.65395894	1.28739003
266	0.472	0.96	0.62433862	1.26984127
268	0.502	1.04	0.6011976	1.24550898
270	0.528	1.089	0.63768116	1.31521739
272	0.558	1.126	0.71814672	1.44916345
274	0.585	1.174	0.74617347	1.49744898
276	0.606	0.194	0.80907877	0.25901202
278	0.621	0.145	1.08566434	0.2534965
280	0.62	1.07	1.50851582	2.60340633
282	0.608	1.011	1.94249201	3.23003195
284	0.59	0.94	2.54310345	4.05172414
286	0.536	0.792	3.6462585	5.3877551

*Para fines prácticos la muestra de suero humano se nombró muestra 1 y la muestra de suero humano + mezcla de estándares se nombró muestra 2.

Para la muestra 1

ECUACIÓN

$$\text{MUESTRA 1/std1} = -0.406386 + 0.816421 \cdot \text{std2/std1} + 2.4383 \cdot \text{std3/std1}$$

CÁLCULOS

$$C_1 = \text{TG} = 0.406386 (20\text{mg/L}) = 8.12772 \text{ mg/L}$$

Multiplicando por el factor de dilución

$$8.12772 \text{ mg/L} (0.005\text{L}) = 0.0406386 \text{ mg}$$

$$\frac{0.05\text{mL}}{100 \text{ mL}} = \frac{0.0406386 \text{ mg}}{x}$$

$$x = 81.2772 \text{ mg/dL}$$

$$C_2 = \text{COL} = 0.816421 (20\text{mg/L}) = 16.32842 \text{ mg/L}$$

Multiplicando por el factor de dilución

$$16.32842 \text{ mg/L} (0.005\text{L}) = 0.0816421 \text{ mg}$$

$$\frac{0.05\text{mL}}{100 \text{ mL}} = \frac{0.0816421 \text{ mg}}{x}$$

$$x = 163.2842 \text{ mg/dL}$$

$$C_3 = \text{GLU} = 2.4383 (10\text{mg/L}) = 24.383 \text{ mg/L}$$

Multiplicando por el factor de dilución

$$24.383 \text{ mg/L} (0.005\text{L}) = 0.121915 \text{ mg}$$

$$\frac{0.05\text{mL}}{100 \text{ mL}} = \frac{0.121915 \text{ mg}}{x}$$

$$x = 243.83 \text{ mg/dL}$$

Para la muestra 2

ECUACIÓN

$$\text{MUESTRA 2}/\text{std1} = -0.128833 + 1.15014*\text{std2std1} + 2.9518*\text{std3std1}$$

CÁLCULOS

$$C_1 = \text{TG} = 0.128833 (20\text{mg/L}) = 2.57666 \text{ mg/L}$$

Multiplicando por el factor de dilución

$$2.57666 \text{ mg/L} (0.005\text{L}) = 0.0128833 \text{ mg}$$

$$\frac{0.05\text{mL}}{100 \text{ mL}} = \frac{0.0128833 \text{ mg}}{x}$$

$$x = 25.7666 \text{ mg/dL}$$

$$C_2 = \text{COL} = 1.15014 (20\text{mg/L}) = 23.0028 \text{ mg/L}$$

Multiplicando por el factor de dilución

$$23.0028 \text{ mg/L} (0.005\text{L}) = 0.115014 \text{ mg}$$

$$\frac{0.05\text{mL}}{100 \text{ mL}} = \frac{0.115014 \text{ mg}}{x}$$

$$x = 230.028 \text{ mg/dL}$$

$$C_3 = \text{GLU} = 2.9518 (10\text{mg/L}) = 29.518 \text{ mg/L}$$

Multiplicando por el factor de dilución

$$29.518 \text{ mg/L} (0.005\text{L}) = 0.14759 \text{ mg}$$

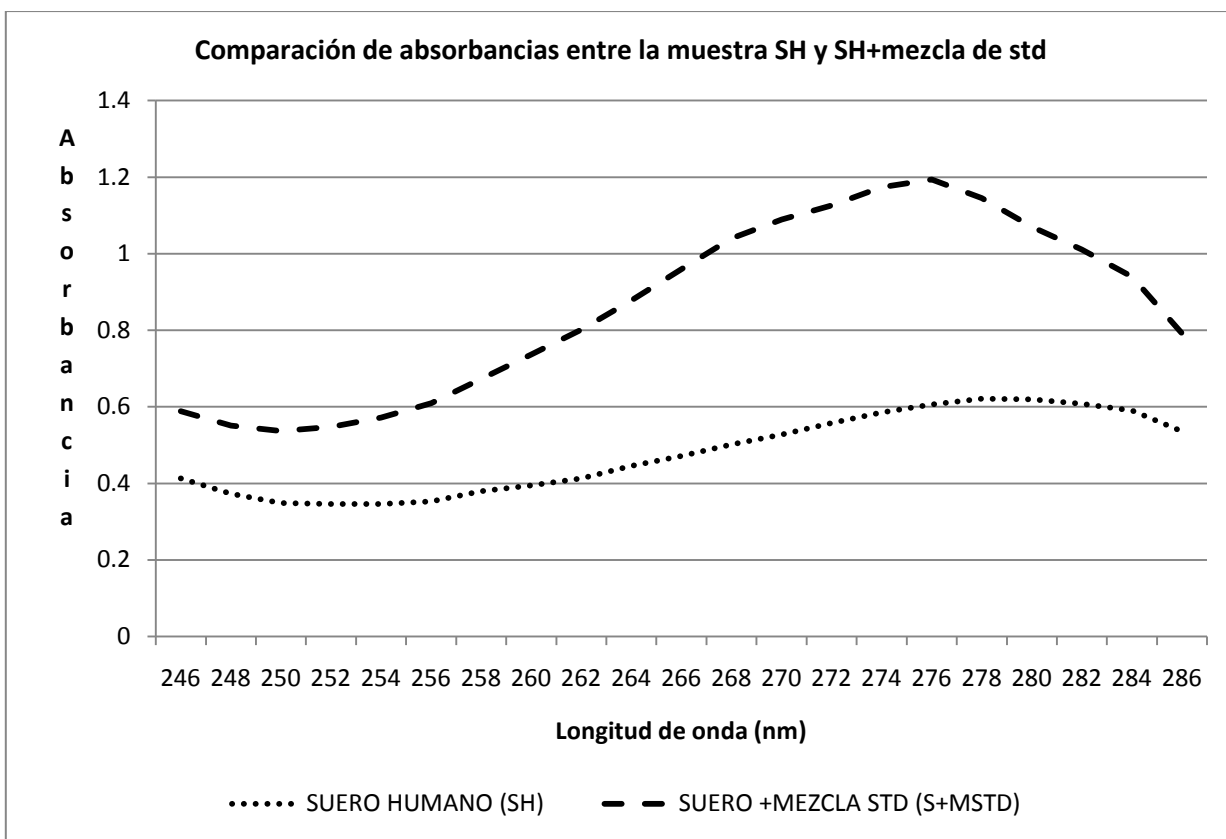
$$\frac{0.05\text{mL}}{100 \text{ mL}} = \frac{0.14759 \text{ mg}}{x}$$

$$x = 295.18 \text{ mg/dL}$$

A estos tres resultados se les resta la concentración de cada estándar de la mezcla de estándares, para obtener un nuevo valor y compararlo con el valor de método por espectrofotometría visible.

Tabla 12 Comparación de los tres métodos usados en la muestra 4. Fuente: elaboración propia.

MUESTRA 4			
METABOLITOS	VISIBLE (mg/dL)	MUESTRA + MEZCLA STD (mg/dL)	MUESTRA (mg/dL)
TG	99	25.75364	81.2772
COL	136	229.6248	163.2842
GLU	87	294.572422	243.83



Gráfica 13 Comparación de la absorbancia entre la muestra de suero humano y la muestra de suero+ mezcla de estándar. Fuente: elaboración propia.

Tabla 13 Absorbancia de la muestra 5, y la razón de la división de la muestra 1, estándar 2 y estándar 3 entre estándar 1. Fuente: elaboración propia.

MUESTRA 5				
Longitud de onda(nm)	Absorbancia		Muestra 1	Muestra 2
	SUERO HUMANO (SH)	SUERO +MEZCLA STD (S+MSTD)	SH/STD1	S+MSTD/STD1
246	0.46	0.57	2.75449102	3.41317365
248	0.411	0.525	2.15183246	2.7486911
250	0.38	0.508	1.67400881	2.23788546
252	0.376	0.524	1.39259259	1.94074074
254	0.379	0.552	1.16257669	1.69325153
256	0.391	0.598	1.0025641	1.53333333
258	0.423	0.669	0.92763158	1.46710526
260	0.448	0.744	0.82352941	1.36764706
262	0.472	0.82	0.76006441	1.32045089
264	0.514	0.907	0.75366569	1.32991202
266	0.55	1	0.72751323	1.32275132
268	0.591	1.095	0.70778443	1.31137725
270	0.625	1.152	0.75483092	1.39130435
272	0.663	1.194	0.85328185	1.53667954
274	0.697	1.248	0.88903061	1.59183673
276	0.724	1.271	0.96662216	1.69692924
278	0.742	1.218	1.2972028	2.12937063
280	0.739	1.133	1.79805353	2.756691
282	0.724	1.065	2.31309904	3.40255591
284	0.699	0.991	3.01293103	4.27155172
286	0.635	0.826	4.31972789	5.61904762

*Para fines prácticos la muestra de suero humano se nombró muestra 1 y la muestra de suero humano + mezcla de estándares se nombró muestra 2.

Para la muestra 1

ECUACIÓN

$$\text{MUESTRA 1/std1} = -0.486252 + 0.975853 \cdot \text{std2/std1} + 2.64777 \cdot \text{std3/std1}$$

CÁLCULOS

$$C_1 = \text{TG} = 0.486252 (20\text{mg/L}) = 9.72504 \text{ mg/L}$$

Multiplicando por el factor de dilución

$$9.72504 \text{ mg/L} (0.005\text{L}) = 0.0486252 \text{ mg}$$

$$\frac{0.05\text{mL}}{100 \text{ mL}} = \frac{0.0486252 \text{ mg}}{x}$$

$$x = 97.2504 \text{ mg/dL}$$

$$C_2 = \text{COL} = 0.975853 (20\text{mg/L}) = 19.51706 \text{ mg/L}$$

Multiplicando por el factor de dilución

$$19.51706 \text{ mg/L} (0.005\text{L}) = 0.0975853 \text{ mg}$$

$$\frac{0.05\text{mL}}{100 \text{ mL}} = \frac{0.0975853 \text{ mg}}{x}$$

$$x = 195.1706 \text{ mg/dL}$$

$$C_3 = \text{GLU} = 2.64777 (10\text{mg/L}) = 26.4777 \text{ mg/L}$$

Multiplicando por el factor de dilución

$$26.4777 \text{ mg/L} (0.005\text{L}) = 0.1323885 \text{ mg}$$

$$\frac{0.05\text{mL}}{100 \text{ mL}} = \frac{0.1323885 \text{ mg}}{x}$$

$$x = 264.777 \text{ mg/dL}$$

Para la muestra 2

ECUACIÓN

$$\text{MUESTRA 2/std1} = -0.121405 + 1.2136 \cdot \text{std2/std1} + 2.67935 \cdot \text{std3/std1}$$

CÁLCULOS

$$C_1 = \text{TG} = 0.121405 (20\text{mg/L}) = 2.4281 \text{ mg/L}$$

Multiplicando por el factor de dilución

$$2.4281 \text{ mg/L} (0.005\text{L}) = 0.0121405 \text{ mg}$$

$$\frac{0.05\text{mL}}{100 \text{ mL}} = \frac{0.0121405 \text{ mg}}{x}$$

$$x = 24.281 \text{ mg/dL}$$

$$C_2 = \text{COL} = 1.2163 (20\text{mg/L}) = 24.326 \text{ mg/L}$$

Multiplicando por el factor de dilución

$$24.326 \text{ mg/L} (0.005\text{L}) = 0.12163 \text{ mg}$$

$$\frac{0.05\text{mL}}{100 \text{ mL}} = \frac{0.12163 \text{ mg}}{x}$$

$$x = 243.26 \text{ mg/dL}$$

$$C_3 = \text{GLU} = 2.67935 (10\text{mg/L}) = 26.7935 \text{ mg/L}$$

Multiplicando por el factor de dilución

$$26.7935 \text{ mg/L} (0.005\text{L}) = 0.1339675 \text{ mg}$$

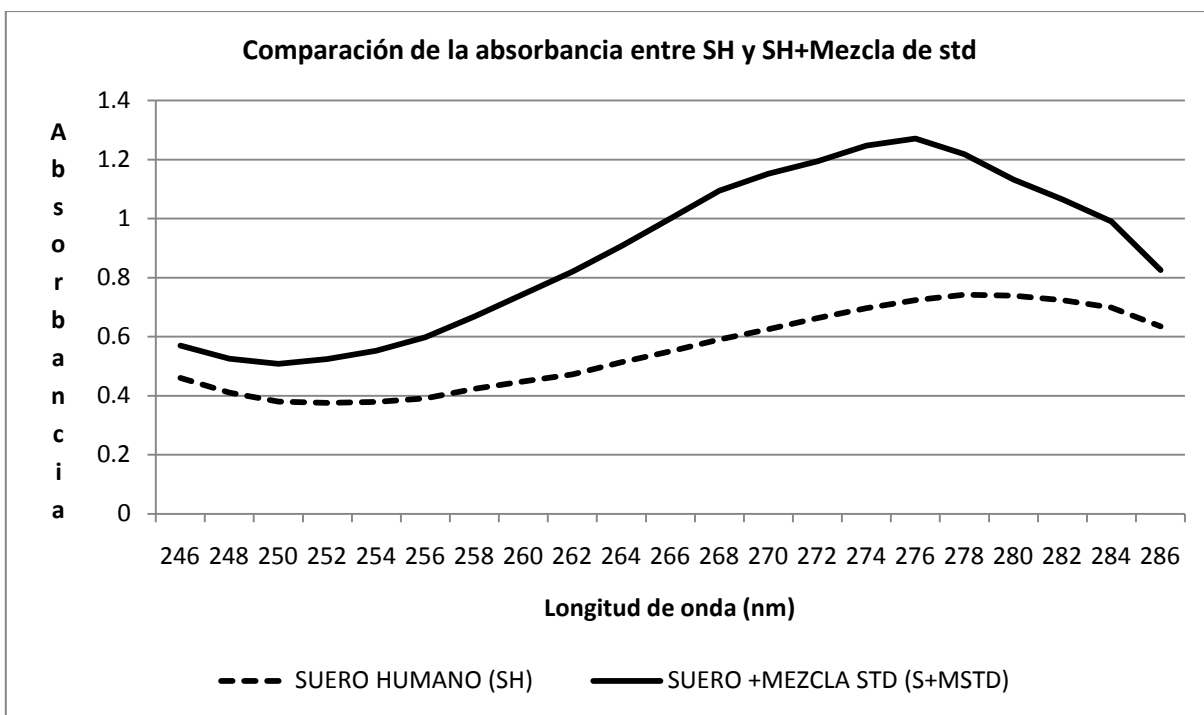
$$\frac{0.05\text{mL}}{100 \text{ mL}} = \frac{0.1339675 \text{ mg}}{x}$$

$$x = 267.935 \text{ mg/dL}$$

A estos tres resultados se les resta la concentración de cada estándar de la mezcla de estándares, para obtener un nuevo valor y compararlo con el valor de método por espectrofotometría visible.

Tabla 14 Comparación de los tres métodos usados en la muestra 5. Fuente: elaboración propia.

MUESTRA 5		
VISIBLE (mg/dL)	MUESTRA + MEZCLA STD (mg/dL)	MUESTRA (mg/dL)
107.12	24.281	97.2504
121.348	243.26	195.1706
72.274	267.935	264.777



Gráfica 14 Comparación de la absorbancia entre la muestra de suero humano y la muestra de suero+ mezcla de estándar. Fuente: elaboración propia.

Tabla 15 Resumen concentraciones de TG, COL y GLU por muestra. Fuente: elaboración propia.

METABOLITOS	MEZCLA STD	MUESTRA 1			MUESTRA 2			MUESTRA 3		
		VISIBLE (mg/dL)	SUERO HUMANO + MEZCLA STD (mg/dL)	SUERO HUMANO (mg/dL)	VISIBLE (mg/dL)	SUERO HUMANO + MEZCLA STD (mg/dL)	SUERO HUMANO (mg/dL)	VISIBLE (mg/dL)	SUERO HUMANO + MEZCLA STD (mg/dL)	SUERO HUMANO (mg/dL)
TG	0.01296	205.7	9.55964	83.7902	108	38.1296	91.5884	99	16.03	85.8128
COL	0.4032	153	209.4058	171.1124	172	256.3298	179.5226	170	235.0798	176.7088
GLU	0.607578	84.2	276.2118	251.859	76	288.047	229.653	244	282.166	271.97

Tabla 16 Continuación tabla 15. Fuente: elaboración propia.

MUESTRA 4			MUESTRA 5		
VISIBLE (mg/dL)	SUERO HUMANO + MEZCLA STD (mg/dL)	SUERO HUMANO (mg/dL)	VISIBLE (mg/dL)	SUERO HUMANO + MEZCLA STD (mg/dL)	SUERO HUMANO (mg/dL)
99	25.75364	81.2772	107.12	24.281	97.2504
136	229.6248	163.2842	121.348	243.26	195.1706
87	294.572422	243.83	72.274	267.935	264.777

IX. DISCUSIÓN

Para elegir las variables de trabajo se decidió hacer un barrido a los estándares GLU, COL y TG en un rango de longitud de onda de 200-300 nm. Como se observa en la gráfica 1, para colesterol se muestra el espectro de absorción, donde se resalta su pico máximo de absorción a 276 nm. Para glucosa, gráfica 2, su pico máximo de absorción fue de 222 nm y en la gráfica 3, para triglicéridos, fue de 268 nm. Para fines de este trabajo, se requería que las tres variables, en este caso los estándares, tuvieran su pico máximo de absorción cercano y por consiguiente que absorbieran en un rango de longitud cercano, en la gráfica 4 se representa este acoplamiento, donde se observa que en el rango de longitud de onda de 246-286 nm, las tres curvas absorben y dos de ellas tienen sus picos de absorción cercanos, se seleccionó este rango aunque la curva de glucosa presentara su pico máximo de absorción a 222 nm.

Posteriormente se leyó un suero humano estándar de 200 a 300 nm y se comparó con las curvas de los tres estándares, en la gráfica 5 se puede ver el comportamiento de la curva del suero humano estándar contra los estándares, este gráfico confirmó la presencia de los metabolitos por la aparición de los máximos de absorción.

Para establecer el orden de los estándares, se alternaron los mismos en diferente orden en el modelo matemático, se obtuvieron sus respectivas ecuaciones y también se obtuvieron las rectas de los residuales, para escoger el orden se basó en la linealidad de la curva.

Dado que en los insertos de cada metabolito se maneja un pH distinto mediante un buffer, se decidió modificar el pH del medio de reacción, se observó que el colesterol trabaja a pH 6.8, los triglicéridos a pH 7.5 y la glucosa a pH 7.0. Se probó con suero humano, primero en un medio ácido, se utilizó como disolvente HCl 0.1N; al obtener la ecuación de la recta y calcular los valores de los metabolitos se observó que estos resultados tenían una gran discrepancia con los valores reales. También se optó por probar la precipitación de proteínas, al observar la discrepancia de los valores se pensaba que las proteínas interferían en las lecturas de absorbancia y una solución fue precipitar estas moléculas y quitarle componentes al suero para facilitar la lectura de los metabolitos, sin embargo, una vez analizados los resultados se vio que estos metabolitos se fueron en el precipitado por lo que se cuantificó poca cantidad de éstos, esto se puede observar en la gráfica 6.

Posteriormente se probó el medio alcalino, utilizando NaOH 0.1N como disolvente, al igual que en pH ácido los resultados estuvieron alejados del valor real, y la cuantificación de los metabolitos precipitando proteínas fue mínima, la única diferencia fue en el suero control sin tratamiento donde se cree que el medio de reacción tuvo interferencia al no observar un pico máximo de reacción significativo, esto se puede observar en la

gráfica 7. Para finalizar, la última reacción se realizó en medio neutro, se observó una linealidad en sus resultados y al igual que en las anteriores dos pruebas en la precipitación de proteínas se cuantificó lo mínimo de los metabolitos. Con estos resultados se decidió usar el medio de reacción neutro y se desechó la prueba de precipitación de proteínas ya que los metabolitos se unen a proteínas y su cuantificación se reduce.

Cuando se tuvieron las variables ya establecidas, se procedió a llevar a cabo el trabajo. Se decidió usar dos métodos, el primero sería por el método establecido anteriormente, y el segundo sería el método de adición de un estándar, éste método permite hacer determinaciones en presencia de interferencias y se buscaba encontrar un blanco adecuado para el trabajo. Para el segundo método se realizó una mezcla de estándares a la cual se le leyó espectrofotométricamente en un rango de longitud de onda de 246-286 nm, tabla 3, posteriormente se adicionó 0.05mL a cada tubo de muestra.

Igualmente se decidió analizar los metabolitos en el laboratorio L-402 en el Campus 2 FES Zaragoza, con kits o método visible, con el fin de contar con un método de referencia. Cada muestra analizada por el método de regresión lineal múltiple y por el método de adición de estándar se comparó con los resultados obtenidos por el método convencional.

Como se puede observar en las gráficas 10, 11, 12, 13 y 14, las dos curvas de cada gráfica tienen un comportamiento similar, y el espacio resultante entre las curvas de las muestras de suero humano y suero humano más mezcla de estándar es significativa, visualmente estos gráficos sugerían que la resta de estas dos curvas nos podían dar un valor aceptable de los metabolitos y aparte de haber resuelto el problema del blanco, lamentablemente cuando se realizaron los cálculos esta suposición era errónea, los resultados no fueron los esperados y se observó que esta modalidad del trabajo la cuantificación de triglicéridos disminuyó comparándola con los otros dos métodos, como se muestra en la tabla 15.

Por el método propuesto inicialmente, regresión lineal múltiple, observando los resultados en la tabla 15 se aprecia que los valores resultantes se alejan del valor obtenido mediante el método visible. En todas las muestras el valor de glucosa fue elevada, esto se puede atribuir a que el rango de longitud de onda seleccionado para este metabolito no tiene un pico máximo de absorción y su absorbancia es mínima, al igual que en el método de adición de estándar, en el caso de los triglicéridos su valor obtenido fue menor comparándolo con el método visible y para el colesterol aunque no resultaron valores óptimos, siguió la proporción en relación a los valores con el método visible.

Al analizar estos resultados se puede decir que no se pudo encontrar el blanco adecuado para este procedimiento, el suero es una mezcla analíticamente compleja dada su cantidad de componentes razón por la cual no se pudo aislar los tres metabolitos estudiados y en todas las pruebas realizadas siempre hubo interferencia con la matriz.

X. CONCLUSION

El método para la determinación simultánea de colesterol, triglicéridos y glucosa fue desarrollado, con base en las propiedades espectrofotométricas de estos metabolitos en la región UV. No fue posible obtener resultados confiables cuando fue comparado con los controles. Hubo efecto de matriz, el cual no se pudo eliminar y los valores obtenidos no son certeros. Se eligieron estos metabolitos porque a nivel clínico su análisis es muy frecuente y con este trabajo se pretendía agilizar y economizar su determinación, pero se observó que este modelo no es efectivo para glucosa ni triglicéridos.

Se recomienda el uso de un blanco de albumina en la determinación de estos tres metabolitos.

XI. LISTA DE REFERENCIAS CONSULTADAS

- ¹ Harris D. Análisis químico cuantitativo. México: Grupo editorial Iberoamérica; 1992.
- ² Velásquez G, Pérez F. Fundamentos del Análisis Farmacéutico, Métodos Ópticos. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. México, 2003.
- ³ Espectro de absorción (Sitio de Internet). Disponible en <http://www.efn.uncor.edu/dep/biologia/intrbiol/espectro.gif>. Acceso el 23 de Agosto 2010.
- ⁴ Formación de los orbitales moleculares (Sitio de Internet). Disponible en: <http://qorganica.perruchos.com/sites/default/files/images/torb03.jpg>. Acceso el 23 de Agosto de 2010.
- ⁵ Esquematación de la ley de Lambert-Beer. (Sitio de Internet). Disponible en: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/0/04/Beer_lambert.png/300px-Beer_lambert.png. Acceso el 23 de Agosto 2010.
- ⁶ González de Buitrago J.M. Arilla E. Rodríguez -Segade S. Bioquímica clínica. España: Mc Graw-Hill/Interamericana de España; 1998.
- ⁷ Skoog D, West D, Holler J. Fundamentos de Química Analítica. 4ªed. España: Ed. Reverté; 1997.
- ⁸ Skoog D. Principios de análisis instrumental. 5 ed. México: Mc Graw Hill; 2001
- ⁹ Thomas M. Ultraviolet and visible spectroscopy. England: John Wiley & sons; 1997.
- ¹⁰ Olsen E. Métodos ópticos de análisis. España: Reverté; 1990.
- ¹¹ Jay L. Probabilidad y estadística para ingeniería y ciencias. 5ª ed. Thomson Learning. 2001.
- ¹² Cervantes Sandoval A, Rivera García P, Paz López JM. Estadística practica para el análisis de datos. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, 2004.
- ¹³ Farías G. Química clínica. 10ª edición. México: Manuel moderno; 1993.
- ¹⁴ Ángel G. Ángel M. Interpretación clínica del laboratorio. 7ª edición. Bogotá: Editorial médica internacional; 2006.
- ¹⁵ Estructura Glucosa. (Sitio en Internet). Disponible en: <http://recursos.cnice.mec.es/biosfera/alumno/2bachillerato/biomol/imagenes/glucido/aglucosas.jpg>. Acceso el 23 de Agostos de 2010.
- ¹⁶ MODIFICACION a la Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-1994, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus en la atención primaria para quedar como Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-1994, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes.
- ¹⁷ Glucosa. Lab test online ^{ES}® (Sitio en Internet). Disponible en: <http://www.labtestsonline.es/tests/Glucose.html?lnk=2>. Acceso el 16 de agosto 2010.
- ¹⁸ Randox Laboratories LTD. Glucosa método GPO/PAP. Reino unido.
- ¹⁹ NORMA Oficial Mexicana NOM-037-SSA2-2002, para la prevención, tratamiento y control de las dislipidemias.
- ²⁰ Colesterol. Lab test online ^{ES}® (Sitio en Internet). Disponible en: <http://www.labtestsonline.es/Cholesterol.html>. Acceso el 16 de agosto 2010.
- ²¹ Estructura colesterol (Sitio en Internet). Disponible en: <http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/ciencias/2000024/images/biomoleculas/colesterol.gif>. Acceso el 23 de agosto de 2010.
- ²² Wiener Lab. Colestat enzimático AA. Argentina: 2000.

- ²³ Estructura triglicéridos (Sitio en Internet). Disponible en :
<http://www.medicinapreventiva.com.ve/laboratorio/imagenes/triglyc.jpg>. Acceso el 16 de Agosto de 2010.
- ²⁴ Trigliceridos. Lab test online ^{ES®} (Sitio en Internet). Disponible en:
<http://www.labtestsonline.es/Triglycerides.html>. Acceso el 16 de agosto 2010.
- ²⁵ Wiener Lab. TG color GPO/PAP AA. Argentina: 2000.
- ²⁶ Trigliceridos. Lab test online ^{ES®} (Sitio en Internet). Disponible en:
<http://www.labtestsonline.es/Triglycerides.html>. Acceso el 16 de agosto 2010.
- ²⁷ García J. Propuesta de un método para la determinación espectrofotométrica de multicomponentes por regresión lineal múltiple dentro del proyecto preparación de estándares de trabajo para uso docente en los módulos de AFMP I y II. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. 9 de agosto 2010.
- ²⁸ Ruano E. Vázquez J E. Informe final de servicio social evaluación de un modelo matemático por regresión lineal múltiple en la determinación simultanea de una mezcla de tres fármacos dentro del proyecto preparación de estándares de trabajo para uso docente en los módulos de AFMP I y II. FES Zaragoza. UNAM.
- ²⁹ Blanco M. Iturriaga H. Maspoch S. Tarín P. A simple method for spectrophotometric determination of two-components with overlapped spectra. Journal of chemical education. 1989; 66 (2): 178-180.
- ³⁰ Clark B, Frost T, Russell A. UV Spectroscopy Techniques Instrumentation, data handling. London: Champman & Hall; 1993.
- ³¹ Fisher R, Peters D. Compendio de Análisis Químico Cuantitativo. México: Nueva editorial Interamericana; 1971.
- ³² Plan de estudios de la carrera Química Farmacéutico Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. CD multimedia.
- ³³ Kaplan L. Pesce A. Química clínica. Buenos aires: Editorial médica Panamericana; 1986.
- ³⁴ Bio-Rad Laboratories. Assayed chemistry control. United States.