UNIVERSIDAD FEMENINA DE MÉXICO
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DETERMINACION DE UREA EN ORINA

POR EL METODO DE FEARON MODIFICADO POR KAWERAE

TESIS

QUE PRESENTA

MATILDE LÓPEZ RIVERO

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

MÉXICO, D. F.
1 9 5 7

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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 PADRES
CON RESPETO Y GRATITUD

PARA MI ESPOSO
CON TODO CARIÑO

PARA LA SRA. Q. F. B.

MARÍA DEL PILAR RIUS DE BELAUSTEGUIGOITA,
CON CARIÑO Y AGRADECIMIENTO POR LA
DIRECCIÓN DE ESTA TESIS

PARA LA SRA.

ADELA FORMOSO DE OBREGÓN SANTACILIA,
DIRECTORA DE ESTA UNIVERSIDAD

A MIS MAESTROS

AGRADECIENDO SUS ENSEÑANZAS

CON TODO CARIÑO A MIS
COMPAÑERAS Y AMIGAS

S U M A R I O

I. INTRODUCCIÓN.

II. FUNDAMENTOS DE LOS PRINCIPALES MÉTODOS PARA DOSIFICACIÓN DE UREA.

III. MATERIAL Y MÉTODOS.

IV. RESULTADOS.

V. RESUMEN Y CONCLUSIONES.

VI. BIBLIOGRAFÍA.

Capítulo I

El presente estudio está basado en los trabajos de Fearon y colaboradores, teniendo como objeto encontrar un método para la dosificación de urea que sea rápido, exacto y de fácil ejecución.

Poco precisos son en efecto los procedimientos indirectos con que cuenta la clínica para la dosificación de urea, ya que todos ellos tienen el defecto de llevar a cabo una serie de manipulaciones debido a las cuales la exactitud del método es discutible.

La necesidad de un método directo y simple para la determinación de urea en orina ha tenido como resultado el desarrollo de varios procedimientos directos e indirectos siguiendo todos ellos un plan de trabajo más o menos semejante, en el cual el fin principal es la rapidez y exactitud del método.

Los trabajos llevados a cabo por Fearon y modificados posteriormente por investigadores como Lipson, Kawerae y algunos otros, están basados principalmente en reacciones de condensación de la urea, es decir, que descartan aquellos métodos en los cuales es necesario descomponer la urea, para después dosificar los productos de descomposición; sin embargo, en estas reacciones de condensación en muchos casos no es posible llegar a conocer su estructura química debido a la formación de productos complejos coloridos cuya intensidad de color es proporcional a la cantidad de urea.

Este trabajo, tiene por objeto demostrar la exactitud y rapidez de la modificación de Kawerae, al método original de Fearon para dosificación de urea con diacetil monoxima y haciendo una comparación de resultados con los obtenidos por el método de Karr en la actualidad el más usado.

La reacción que se efectúa entre la urea y la diacetil monoxima no se conoce con exactitud ya que el producto que se forma es un complejo del cual solo se conoce su color, que se emplea para la interpretación de los resultados.

Capítulo II

La urea puede dosificarse directamente por condensación de ésta con sustancias como α isonitroisopropiofenona o derivados diacetilados, que dan productos cuya intensidad de color es proporcional a la cantidad de urea; o bien indirectamente es decir trasformando la urea en un producto de descomposición que posteriormente se dosifica. Los métodos directos en la actualidad son poco usados, debido principalmente a las dificultades que presentan los procedimientos como en el caso de la α isonitroisopropiofenona en la determinación de urea, que trae consigo una serie de inconvenientes que decaen todos ellos en la obtención de resultados erróneos ya que entre sus manipulaciones lleva un calentamiento muy prolongado para la formación de color, que debe hacerse con las máximas precauciones debido a que la urea expuesta a un calentamiento excesivo se descompone.

Los métodos en que se emplean derivados diacetilados presentan más ventajas que el anterior, aunque no son del todo perfectos, pues en la actualidad siguen haciéndosele modificaciones a los métodos originales con el fin de obtener uno que a la vez de exacto sea sencillo.

Los métodos indirectos están basados en dos propiedades distintas, una es aquella en que la urea por la acción de una enzima, la ureasa, se trasforma en presencia de aire en carbonato de amonio, el cual puede dosificarse posteriormente bien por medio de un reactivo que ponga en evidencia el ión amonio, en este caso reactivo de Nessler, o bien trasformando la sal en amoníaco por la acción de un alcalí y titulando después el amoníaco liberado.

La reacción que se efectúa es la siguiente:

Cualquiera de los dos métodos que se empleen para conocer la cantidad de carbonato de amonio que se produjo es igualmente exacto.

La otra propiedad es aquella en que por descomposición total de la urea con hipobromito de sodio en un ureómetro se libera nitrógeno gaseoso el cual es medido después en la graduación del aparato.

La reacción que se efectúa entre la urea y el hipobromito de sodio es la siguiente:

$$C{=}O \begin{matrix} NH_2 \\ NH_2 \end{matrix} + 3N_aB_rO \longrightarrow 3N_aB_r + CO_2 + 2H_2O + N_2$$

Este método es quizá uno de los más empleados, debido a su rapidez ya que no a su exactitud, por que como todos los métodos de cuanteo de sustancias, basados en la lectura del volumen de un gas desprendido dentro de un líquido, es bastante inexacto.

Los métodos de la ureasa son probablemente los más satisfactorios de cuantos se han propuesto para la determinación de urea, debido a que la enzima no actúa sobre otras sustancias nitrogenadas, como por ejemplo, la alantoina y además no es preciso seguir ningún calentamiento minuciosamente regulado. Sin embargo, este método, tiene el inconveniente de no ser exacto cuando se usa, para la determinación de urea en pacientes urémicos, que por lo general están bajo la acción de una droga y ésta inhibe la acción cuantitativa de la ureasa dando resultados erróneos.

Capítulo III

El método seguido en este trabajo es el de Fearon, modificado por Kawerac, el cual está basado en la condensación de la urea con la diacetil monoxima en presencia de ácido arsénico con formación de una coloración amarilla, que varía proporcionalmente a la cantidad de urea y que puede leerse en un colorímetro o de preferencia en un fotocolorimetro. El metodo original hacia uso del ácido clorhídrico, pero tenia el inconveniente de que la producción del color amarillo no era proporcional a la urea si se variaba la cantidad de ácido adicionado, y además al efectuarse la reacción se producía un olor sumamente desagradable. Estudios posteriores llevados a cabo por investigadores como Lipson y Kawerac dieron por resultado la modificación usada en este trabajo.

Para la exactitud del método debe llevarse a cabo la reacción con una solución de título no mayor de 1N de ácido arsénico, ya que un aumento en la concentración de esta solución puede variar considerablemente los resultados obtenidos.

En los estudios seguidos por los investigadores ya mencionados, se vio que el aumento o disminución considerable de los iones ácidos o arsénico pentavalentes, podian causar un error en la lectura del resultado; sin embargo, las variaciones en la concentración de la solución de diacetil monoxima, siempre y cuando, estas variaciones no sean muy notables no afectan a la formación de color, por lo cual esta solución no es necesario que sea valorada y su conservación es mayor que la del ácido arsénico, ya que no tiene mucha importancia que parte de la sustancia se inactive.

REACTIVOS

Solución patrón de urea.—Contiene 1 mg. de urea por c.c. Se prepara disolviendo 100 mg. de urea pura en 100 c.c. de agua destilada. Para la preservación de la solución debe añadírsele unas gotas de cloroformo permaneciendo estable a una temperatura menor a 15° durante cuatro meses.

Solución de diacetil monoxima.—Contiene 2.5 % de diacetil moción anterior en 100 c.c. de agua destilada y añadiendo unas gotas de cloroformo como preservativo.

Solución del diacetil monoxima.—Contiene 2.5 % de diacetil monoxima en ácido acético al 5 %. Se prepara disolviendo 2.5 g. del reactivo en 100 c.c. de ácido acético al 5 %. Es una solución sumamente estable aun a temperatura ordinaria en algunas ocasiones aparece un ligero color amarillento pero que no interfiere para nada la interpretación de los resultados.

Solución patrón de ácido arsénico.—Se prepara suspendiendo 50 g. de pentóxido de arsénico en 1000 c.c. de ácido clorhídrico concentrado, se deja reposar la suspensión por uno o dos días Al cabo de este tiempo se filtra la suspensión por un filtro de lana de vidrio.

Solución tipo de ácido arsénico.—Se prepara diluyendo un volumen determinado de solución patrón de ácido arsénico con ácido clorhídrico concentrado hasta obtener una solución cuyo título sea aproximadamente de 0.25N con respecto al ión arsénico pentavalente.

Para la titulación de la solución se le añaden 50 c.c. de ácido clorhídrico 4N,2g. de yodato de potasio libre de yoduro y 15 c.c. de tetracloruro de carbono. Agitar vigorosamente y dejar repo-

sar durante unos minutos titulando después el yodo liberado con una solución de tiosulfato de sodio 0.1N usando almidón como indicador.

PROCEDIMIENTO

El procedimiento que se sigue se lleva a cabo junto con una prueba en blanco, la cual servirá posteriormente para el ajuste del aparato en el momento de la prueba. Esta prueba en blanco, debe hacerse para conveniencia del operador por que ahorra la preparación diaria de la solución de diacetil monoxima, ya que con el tiempo ésta adquiere una ligera coloración amarilla.

Se procede de la siguiente manera:

Problema	*Prueba en blanco*
1 c.c. de orina	
4 c.c. de agua destilada	5 c.c. de agua destilada
3 c.c. de solución tipo de ácido arsénico una decima y media de ácido clorhídrico concentrado.	3 c.c. de solución tipo de ácido arsénico una décima y media de ácido clorhídrico concentrado.
1 c.c. de solución de diacetil monoxima.	1 c.c. de solución de diacetil monoxima.

El volumen de ambos tubos se ajusta a 10 c.c. y la solución se mezcla agitando suavemente. Se ponen a baño maría durante 30 minutos, teniendo cuidado de tapar los tubos con algodón y procurando que la ebullición del agua del baño no sea muy fuerte. Al cabo de este tiempo los tubos se pasan a un recipiente que contenga agua fría y se conservan en ésta durante tres minutos, al cabo de los cuales se procede a la lectura en el fotocolorimetro usando la prueba en blanco como testigo.

Para la comprobación de la exactitud del método, puede trabajarse con un tercer tubo que contenga un volumen determinado de solución en tipo de urea.

El método usado en esté trabajo para llevar a cabo la prueba de comparación de exactitud y rapidez del método de Fearon, es el de nesslerización o método de Karr, el cual está basado en la acción hidrolítica de la ureasa sobre la urea con formación de carbonato de amonio, el cual se descompone por la acción de un alcalí dejando en libertad amoníaco que se cuantea con reactivo de Nessler. Este método es en la actualidad uno de los más empleados por ser el más exacto, aunque tiene el inconveniente de llevar muchas manipulaciones y preparaciones preliminares de la muestra.

REACTIVOS

Solución de ureasa.—Colocar en un matraz: 37.5 g. de polvo de permutita, 500 c.c. de ácido acético al 2 %. Agitar. Verter el líquido sobrenadante y lavar con agua destilada. Añadir a la permutita húmeda 75 g. de jack-bean-meal y 125 c.c. de ácido sulfúrico 0.001N agitando después suavemente durante una hora. Añadir 375 g. de glicerina. Filtrar a través de un papel filtro.

Solución patrón de urea.—Contiene 1.5 mg. de nitrógeno ureico por 5 c.c. de solución. Se prepara disolviendo 0.644 g. de urea pura en 100 c.c. de agua destilada.

Solución tipo de urea.—Contiene 0.075 g. de nitrógeno ureico por 5 c.c. de solución. Se prepara diluyendo 5 c.c. de la solución anterior a 100 c.c. con agua destilada.

Reactivo de Nessler.—Disolver 15 g. de yoduro de potasio y mercurio en 100 c.c. de agua destilada y añadirle 70 g. de sosa. Filtrese y guárdese en frasco oscuro.

Solución de goma Gatti.—Se prepara disolviendo 20 g. de goma Gatti en 100 c.c. de agua destilada. Dejar reposar toda la noche y al día siguiente filtrar y añadirle a la solución 1 g. de ácido benzoico disuelto en 10 c.c. de alcohol.

En este método la orina usada necesita estar exenta de amoníaco para lo cual se procede como sigue:

En un matraz o un vaso se colocan de 15 a 20 c.c. de orina, se adicionan 5 g. de permutita. Agitar. Dejar reposar 10 minutos. Filtrar. Del filtrado tomar 1 c.c. aforar a 250 c.c. con agua destilada. Se trabaja tomando 5 c.c. de esta dilución.

En dos tubos especiales para dosificación de urea marcados con las letras *P* para problema y *T* para testigo respectivamente colocar:

Problema	*Testigo*
5 c.c. de orina exenta de amoníaco	5 c.c. de solución tipo de nitrógeno ureico
3 gotas de ureasa	3 gotas de ureasa
4 gotas de solución amortiguador	4 gotas de solución amortiguador

Poner en baño maría durante 15 minutos procurando que el agua del baño no suba de 50°, al cabo de éste tiempo se les añade a ambos tubos unos 5 ó 6 c.c. de agua destilada:

5 gotas de goma Gatti aforar a 22.5	5 gotas de goma Gatti aforar a 22.5
2.5 c.c. de reactivo de Nessler	2.5 c.c. de reactivo de Nessler

Se lee en el fotocolorímetro en la escala correspondiente a sangre, pero como la sangre está diluida tomando 1 c.c. y aña-

diéndole 10 c.c. de agua destilada y la orina está diluida tomando 1 c.c. y aforando a 250 c.c., el resultado obtenido de la lectura debe multiplicarse por 25.

Capítulo IV

RESULTADOS

Método de Nessler urea g%	*Método de Jearon urea g%*	*Diferencia %*
13.8	14.5	— 4.8
20.5	20.0	+ 2.8
36.5	33.5	+ 8.2
14.4	15.1	— 4.6
29.5	29.0	+ 1.6
26.5	28.5	— 7.0
17.8	18.6	— 4.3
28.5	26.0	+ 8.7
8.2	7.8	+ 4.8
21.3	22.5	— 5.3
16.4	17.0	— 3.5
23.5	24.9	— 5.6
20.0	21.5	— 6.9
30.6	32.3	— 5.2
34.3	32.5	+ 5.2
26.0	24.8	+ 4.6
16.4	17.3	— 5.2
2.9	1.5	+ 4.8
14.0	15.0	— 6.6
26.2	25.1	+ 4.2
30.5	31.2	— 2.2
14.5	15.7	— 7.6
12.9	13.5	— 4.4
28.4	29.0	— 2.0

Método de Nessler urea g%	*Método de Fearon* urea g%	*Diferencia %*
15.6	15.0	+ 3.8
19.0	17.9	+ 5.7
30.6	30.1	+ 1.6
18.5	20.0	— 7.5
15.5	13.5	+ 4.5
18.0	17.3	+ 3.8

Capítulo V

Se ha comprobado que el método seguido en este trabajo es tan exacto como el indirecto en las orinas normales, con la ventaja de tener mayor exactitud en los casos en los que una elevación anormal de la urea requiere el empleo de medicamentos, que al ser eliminados por la orina interfieren la acción encimática de la ureasa, pero no la de la diacetil monoxima en la reacción de condensación.

Por el contrario presenta la desventaja de resultar poco exacto en las orinas con cantidades de urea anormalmente bajas.

El metodo propuesto tiene la ventaja de ser más rápido que los métodos indirectos empleados en la dosificación de urea, debido por una parte a la mayor rapidez de la reacción en si y por otra a la ausencia de manipulaciones preliminares, como por ejemplo, la eliminación de amoniaco que son necesarias en los métodos encimáticos.

El metodo resulta además de técnica más sencilla, por que suprime los reactivos y manipulaciones preparatorios necesitando un menor número de ellos para llevar a cabo el procedimiento en sí.

Bibliografía

1 HAROLD L. ROSENTHAL.—*Analitical Chemistry.* 1980.—82.
1955

2 HAWK OSER SUMMERSON. *Química Fisiológica Práctica.*—773.—78.—Editorial
1949 Interamericana.

3 ARCHIBALD *Journal Biological Chemistry.* 157.—507.—(Citado por Hawk Oser
1945 Summerson 2.)

4 E. W. WERTHEIM. *Organic Chemistry.*—142. Editorial The Blakiston Co.,
1947 Philadelphia Toronto.

5 V. DEULOFEU y A. D. MARESCA. *Curso de Química Biológica.*—53.—Edito-
1953 rial el Ateneo Buenos Aires.

6 E. F. CROS. AND F. W. MARTIN.—*Farmacia Práctica de Remington.*—1281.—
1950 Editorial U.T.E.H.A. México.

7 DR. MARIO SOTO. *Farmacología Aplicada a la Terapéutica.*—551.—553.—Edi-
1952 torial el Ateneo.—Buenos Aires.

8 G. A. HILL AND LOUISE KELLEY. *Organic Chemistry.*—232.—Editorial The
1948 Maple Press Co., York Pa.