



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE PUEBLA**



Facultad de Ciencias Químicas

LICENCIATURA FARMACIA

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
FARMACÉUTICO

TÍTULO

**“DETERMINACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE EDTA AL 14% SOBRE
CONCENTRACIONES DE HIERRO SÉRICO Y HEMOGLOBINA POR
ESPECTROFOTOMETRÍA UV - VIS”**

PRESENTA:

p.FAR. NANCY GONZÁLEZ CÁRCAMO

DIRECTOR:

MC. RAFAEL MUÑOZ BEDOLLA

ASESORES:

MC. JUAN MÁRQUEZ HERNÁNDEZ

MC. JOSE GENARO CARMONA GUTÉRREZ

2018

ÍNDICE

1. ANTECEDENTES	3
1.1 EDTA.....	4
1.1.1. PROPIEDADES QUÍMICAS Y FÍSICAS	5
1.1.2. USOS DEL EDTA.....	5
1.1.3. QUELACIÓN	5
1.2. SANGRE.....	6
1.2.1. GLÓBULOS ROJOS	7
1.2.1.1. HEMOGLOBINA (Hb)	8
1.2.1.2. METABOLISMO DEL HIERRO.....	9
1.2.2. GLÓBULOS BLANCOS.....	10
1.2.3. PLASMA	11
1.3. ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA – VISIBLE.....	12
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
3. JUSTIFICACIÓN	15
4. HIPÓTESIS.....	16
5. OBJETIVOS	16
5.1. GENERAL.....	16
5.2. ESPECÍFICOS.....	16
6. UNIVERSO DE TRABAJO.....	17
7. METODOLOGÍA.....	18
7.1. MATERIAL Y MÉTODOS	18
7.2. MATERIAL BIOLÓGICO	18
7.3. REACTIVOS.....	18
7.4. EQUIPO	18
7.5. PROCEDIMIENTO	19
9. RESULTADOS.....	24
10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	29
11. CONCLUSIÓN	30
12. ABREVIATURAS.....	31
13. ANEXOS.....	32
14. BIBLIOGRAFÍA	35

Resumen

El EDTA tiene aplicaciones en muchos productos de uso cotidiano, se determinó la concentración de EDTA al 14% en muestras sanguíneas tomadas a 4 alumnos de sexo masculino, sanos, de la Facultad de Ciencias Químicas BUAP. Se realizaron diluciones con EDTA a Sangre total y suero en 1:1 hasta 1:3, se comparó las concentraciones antes y después en Hierro Sérico y Hemoglobina, observándose una marcada disminución de la concentración en Hierro Sérico y Hemoglobina en base a las diluciones establecidas con esto corresponde a trabajos realizados con anterioridad de Karina, Viridiana, Gerardo y col, dándonos además una respuesta más clara usando el método de espectrofotometría UV-VIS mostrando una variabilidad en el comportamiento de los iones de Fe^{2+} y la hemoglobina.

1. ANTECEDENTES

La utilización de EDTA en el organismo humano como agente quelante fue utilizado desde la época de la segunda guerra mundial para la extracción de metales pesados como: Mercurio, Plomo, Cadmio, Vanadio, Zinc, Hierro, Calcio, entre otros. Notando que no solo se liberaban de los metales, descubriendo también la mejoría de otros problemas que sufrían como la insuficiencia vascular y la artritis. ^[1]

En investigaciones anteriores se demuestra como al incrementar la concentración de EDTA al 14% en niveles de hemoglobina y células sanguíneas, presentan como consecuencia una disminución de Hb con respecto al tiempo, así como una modificación estructural de las células. ^[2,3]

También es el caso de la descalsificación ósea en ratas wistar, tras la administración de EDTA, habiendo una alteración en la actividad de la fosfatasa Alcalina Ósea y Calcio sérico, lo cuál provoca que haya una disminución en la producción de calcio impidiendo así la formación del hueso y su **remodelación cosntantes**. ^[4,5]

1.1 EDTA

El EDTA es un ácido orgánico tetracarboxílico derivado del etano por animación de sus dos grupos metilo y posterior diacetilación de cada uno de los grupos amino (Figura 1).

Por la flexibilidad de su molécula y la especial disposición espacial de sus átomos y grupos químicos, actúa como agente quelante llegando a coordinarse octaédricamente con iones metálicos mediante el establecimiento de seis grupos coordinados, por lo que se dice que es un agente quelante hexadentado.

Gracias a su propiedad de quelar iones metálicos, el EDTA en disolución o sus sales ionizadas, es muy eficaz para eliminar Ca, Mg, Mo, Fe, Cu y Zn, iones que puede sustraer de los compuestos químicos de los que formen parte. ^[6]

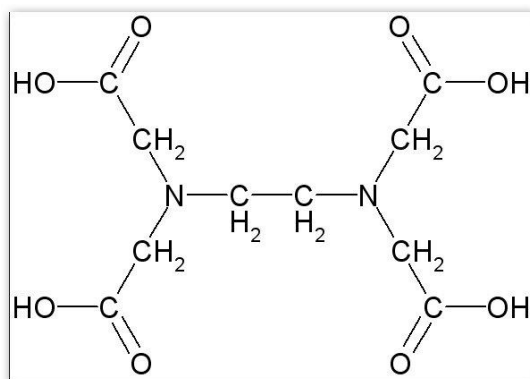


Figura 1. Estructura de EDTA. ^[7]

El EDTA fue patentado en Alemania en 1935 por F. Munz. La molécula es una diamina sustituida generalmente comercializada como sus sales de sodio. Es un poderoso agente complejante de metales y una molécula altamente estable, que ofrece una versatilidad considerable en usos industriales y domésticos. ^[8]

1.1.1. PROPIEDADES QUÍMICAS Y FÍSICAS

EDTA $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8H_2O_2$ es un polvo cristalino blanco, inodoro, no higroscópico (60-00-4). Se descompone en un rango de fusión de 234 - 250 °C. El peso molecular de este compuesto es 292,24 Da. El EDTA es ligeramente soluble en agua, soluble en soluciones ácidas, alcalinas y es insoluble en disolventes orgánicos comunes. ^[9,10]

1.1.2. USOS DEL EDTA

El EDTA y sus sales se utilizan principalmente como agentes quelantes de iones divalentes o trivalentes en la industria alimentaria. Se absorbe muy poco a nivel gastrointestinal. Forma un complejo estable y soluble con el calcio, fácilmente excretado por el riñón. ^[10 - 12]

La exposición de las personas al ácido Etilendiamino tetra acético o EDTA, se produce directamente como consecuencia de su uso en aditivos alimentarios y medicamentos; en alimentos y bebidas como conservante, y estabilizante y para varios usos médicos. ^[13]

La sal disódica se utiliza por vía intravenosa en el tratamiento de emergencia de la hipercalcemia y en el control de arritmias cardíacas inducidas por digitálicos. También se ha usado en la terapia de opacidades calcificadas de la córnea y de quemaduras por cal del ojo, bien tópicamente después de eliminar el área epitelial por iontoforesis. Así mismo se emplea en preparados para la limpieza de lentes de contacto. ^[9 - 12]

1.1.3. QUELACIÓN

La historia de la Quelación la podemos iniciar en 1893, con los trabajos del investigador suizo y premio Nobel Alfred Werner, quien explicó como los metales al unirse a moléculas orgánicas, podían cambiar las propiedades de éstas, abriendo así un nuevo campo de investigación en la química orgánica. ^[13]

El nombre Quelato (en inglés "Chelate") se deriva de la palabra griega "Chela", que significa Pinza, porque el anillo que se forma entre el quelante y el metal es similar en apariencia a los brazos de un cangrejo con el metal en sus pinzas. ^[14]

La quelación es la habilidad de un compuesto químico para formar una estructura en anillo con un ion metálico resultando en un compuesto con propiedades químicas diferentes a las del metal original. El quelante impide que el metal siga sus reacciones químicas normales. ^[14]

Cuando un ion metálico se combina con un donador de electrones, se dice que la sustancia que se forma es un compuesto complejo o de coordinación. Al reemplazo de estas moléculas de agua por una molécula de un agente quelante formando una estructura compleja en anillo se le llama quelación. A la molécula que reemplaza el agua se la llama "Ligando". ^[13]

1.2. SANGRE

La sangre es un líquido complejo que se transporta a través de los vasos donde recibe el oxígeno procedente de los pulmones y recoge los productos metabólicos procedentes de los tejidos. ^[15]

El volumen sanguíneo total de un hombre de 70 kg corresponde al 7% de su peso corporal total.^[16] La sangre está compuesta de una porción celular, llamada elementos formes y otra porción llamada plasma. Los elementos formes (eritrocitos, leucocitos, plaquetas)^[15] constituyen alrededor del 45% de volumen sanguíneo total y el plasma explica el 55% restante. ^[17]

En la sangre centrifugada los depósitos están formados por glóbulos rojos; por encima se encuentra una delgada capa de glóbulos blancos y plaquetas (la capa leucocitaria) y por encima de esta se encuentra el plasma de color amarillento (Figura 2) Los elementos formes funcionan, respectivamente, en el transporte de oxígeno, la defensa inmunitaria y la coagulación de la sangre.^[17]

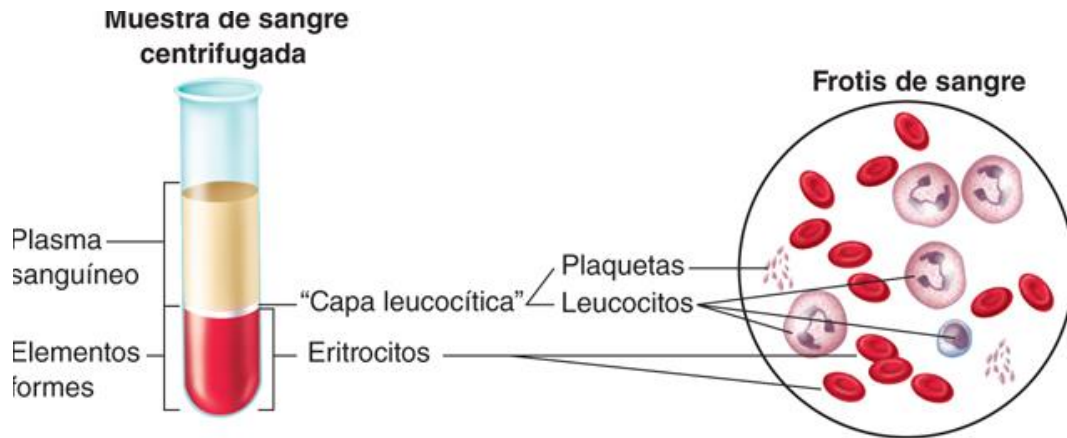


Figura 2. Elementos formes que componen la sangre.^[17]

1.2.1. GLÓBULOS ROJOS

Los glóbulos rojos son los más numerosos, aproximadamente 5 millones y medio por milímetro cúbico. Son células que han perdido su núcleo, discos bicóncavos, que contienen hemoglobina, la cuál transporta oxígeno a los tejidos. Son sensibles a cambios de la presión osmótica del plasma. Un cambio en la presión osmótica los encoge por falta de agua, mientras que se hinchan y estallan en una solución más débil, pues sus pigmentos se liberan y la sangre es homolizada.

Antes del nacimiento, los glóbulos rojos se forman en la médula ósea, el hígado el bazo y ganglios linfáticos. Después del nacimiento, la médula es la única fuente. El tiempo de vida de los eritrocitos es de aproximadamente 120 días en una persona sana, tras los cuáles se fragmentan y son absorbidos. ^[18]

1.2.1.1. HEMOGLOBINA (Hb)

La hemoglobina (Figura 3) es un tetrámero compuesto por cuatro cadenas de proteínas globulares (globinas), cada una formada por un centro hemo con hierro, la síntesis de hemoglobina requiere el aporte adecuado de hierro en la dieta, de fuentes como carne roja, alubias, espinaca y pan fortificado con hierro. El hierro se absorbe en el intestino delgado por transporte activo y circula por la sangre unido a una proteína llamada **transferrina**.

Los glóbulos rojos en desarrollo en la medula ósea utilizan el hierro para sintetizar el grupo hemo de la hemoglobina. El exceso de hierro se almacena en el organismo, sobre todo en el hígado, acumulado en la proteína ferritina y sus derivados.^[16]

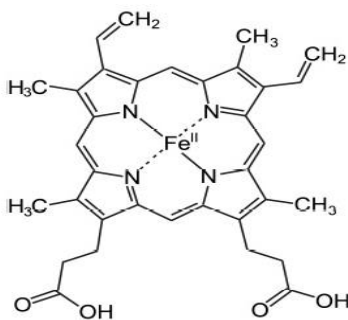


Figura 3. Estructura del grupo hemo, ion fierro unido a cuatro anillos pirrolicos.^[19]

La hemoglobina está compuesta por una proteína llamada globina, unida a una agrupación química denominada “hem”, la cual contiene hierro, responsable de su color (Figura 4). El contenido normal de hemoglobina en sangre es de 13.5 a 18g/ 100ml en varones.^[18]

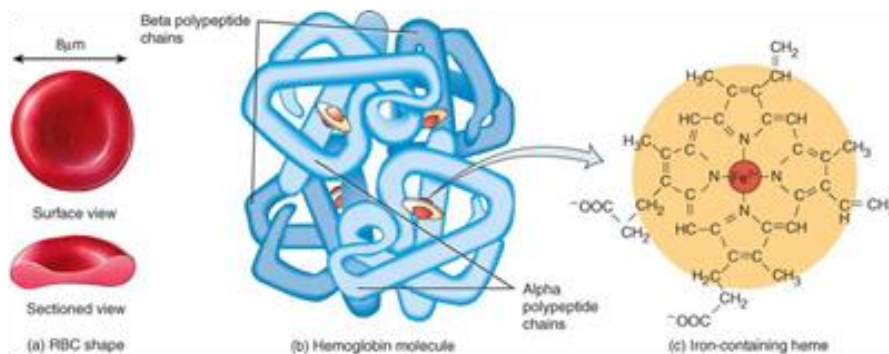


Figura 4. Estructuras de A) eritrocito, B) molécula de hemoglobina y C) hierro contenido en el grupo hem.^[20]

1.2.1.2. METABOLISMO DEL HIERRO

El hierro es un elemento esencial para la vida, puesto que participa prácticamente en todos los procesos de oxidación-reducción. Lo podemos hallar formando parte esencial de las enzimas del ciclo de Krebs, en la respiración celular y como transportador de electrones en los citocromos. Está presente en numerosas enzimas involucradas en el mantenimiento de la integridad celular, tales como las catalasas, peroxidasas y oxigenasas.^[21]

El hierro tiene una función esencial en el metabolismo de los mamíferos por su capacidad para aceptar y donar electrones, como componente fundamental del grupo hemo de la hemoglobina, la mioglobina, los citocromos y otras enzimas.^[22] El contenido total de hierro de un individuo normal es aproximadamente de 4 a 5 g en el hombre.^[23] En individuos con un estado nutricional óptimo alrededor del 65 % de hierro se encuentra formando parte de la hemoglobina, el 15 % está contenido en las enzimas y la mioglobina, el 20 % como hierro de depósito y solo entre el 0,1 y 0,2 % se encuentra unido con la transferrina como hierro circulante.^[24]

La mayor parte de este hierro es hemoglobínico contenido en los eritrocitos circulantes y en la médula ósea. La función de los eritrocitos es el transporte del oxígeno desde los pulmones al resto del organismo. La proteína que facilita este proceso es la hemoglobina, que contiene oxígeno y es la

responsable de dar el color rojo a la sangre. La otra porción destacada es el hierro de depósito de carácter intracelular como la ferritina y hemosiderina.

El ciclo del hierro podríamos definirlo como con un carácter cerrado puesto que en condiciones fisiológicas las pérdidas son mínimas, se compensan a través de la dieta y este mineral es reutilizado por el organismo. Cuando los eritrocitos mueren, la hemoglobina se desintegra en el bazo y la médula ósea por la acción de los macrófagos.^[25] Su elevado potencial redox, junto a su facilidad para promover la formación de compuestos tóxicos altamente reactivos, determina que el metabolismo de hierro sea controlado por un potente sistema regulador.^[26]

1.2.2. GLÓBULOS BLANCOS

La sangre contiene cinco tipos de leucocitos maduros: 1) Linfocitos, 2) Monocitos, 3) Neutrófilos, 4) Eosinófilos y 5) Basófilos (Figura 5).^[16] Los glóbulos blancos (leucocitos) son células nucleadas, no constituyen un grupo celular unitario. Su número es de 4,000 – 10,000/ μ l de sangre.^[18] La mayor parte de estas células se encuentran en la médula ósea, así como en los tejidos y órganos, donde cumplen funciones especiales.^[27]

Los tipos de globulos blancos se pueden agrupar de acuerdo a las características morfológicas y funcionales compartidas. Los neutrofilos, macrófagos y monocitos reciben el nombre de **fagocitos** por que engloban e ingieren partículas extrañas como bacterias (fagocitosis). A menudo se denominan inmunocitos por ser responsables de la respuestas inmunitarias específicas contra invasores. Los basofilos, eosinofilos y los neutrofilos se denominan **granulocitos** por que contienen granulaciones citoplasmáticas que les dan un aspecto granular.^[16]



Figura 5. Clasificación y morfología de la línea linfocítica.^[28]

1.2.3. PLASMA

El plasma es la porción líquida de la sangre, de color paja. El agua es el principal componente y constituye el 92% de su peso total.^[16] El principal soluto en términos de su concentración es el Na^+ . Así como otros iones y moléculas orgánicas como metabolitos, hormonas, enzimas, anticuerpos y otras proteínas.^[17] También tiene bicarbonato sódico, fosfatos, potasio, entre otros compuestos de diferentes alimentos como: glucosa, urea, aminoácidos, ácidos grasos, etc.^[18]

Las albuminas son el tipo de proteínas más abundantes en el plasma y constituyen alrededor del 60% total. Las albuminas, globulinas, la proteína de la coagulación fibrinógeno y la proteína transportadora de hierro transferrina, representan más del 90% de la proteínas plasmáticas. El hígado sintetiza la mayor parte de proteínas plasmáticas y la secreta hacia la sangre.

Las proteínas plasmáticas participan en muchas funciones como la coagulación de la sangre y la defensa contra elementos extraños. Además, actúan como transportadores de hormonas esteroideas, colesterol, fármacos y algunos iones como hierro (Fe^{+2}), tal como lo describe la Tabla 1.^[16]

Tabla 1. Funciones de proteínas plasmáticas

Nombre	Fuente	Función
Albuminas	Hígado	Principales contribuyentes a la presión osmótica del plasma, transportadoras de diferentes sustancias.
Globulinas	Hígado	Factores de coagulación, enzimas, anticuerpos, transportadoras de varias sustancias.
Fibrinógeno	Hígado	Forma hebras de fibrinas esenciales para la coagulación de la sangre.
Transferrina	Hígado	Transporte de hierro

1.3. ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA – VISIBLE

La espectrofotometría UV-Visible (UV-VIS) es una práctica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. La espectrofotometría UV-Visible se basa en la medición de absorción de radiación UV o visible por determinadas moléculas, la radiación correspondiente a estas regiones del espectro electromagnético causa transiciones electrónicas a longitudes de onda característica de la estructura molecular de un compuesto. ^[29]

La espectrofotometría UV – vis (Figura 6) utiliza el espectro electromagnético y su efecto sobre la materia es producir transiciones electrónicas entre los orbitales atómicos y/o moleculares de la sustancia. ^[31]

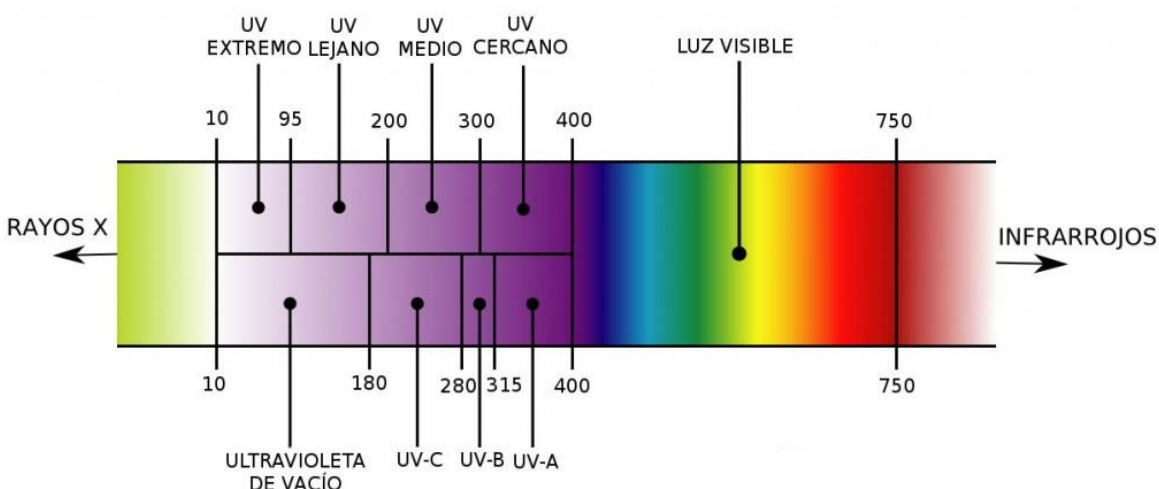


Figura 6. Espectrofotometría UV- Vis. [30]

La espectrofotometría uv-visible es utilizada generalmente en la valoración cuantitativa de soluciones de iones metálicos de transición y compuestos orgánicos, ambos absorben la luz. La Ley de Beer-Lambert estipula que la absorbancia de una solución es directamente proporcional de la concentración de la solución, por lo que la espectrofotometría uv-visible puede usarse para determinar la concentración de la solución.^[29]

El espectrofotómetro UV-Visible es un instrumento óptico que tiene la capacidad de resolver radiaciones de diferentes longitudes de onda dentro del rango ultravioleta y visible (por lo general este rango se encuentra dentro de los valores de 190 a 1,100 nm).

Está compuesto por una fase luminosa, monocromador, elementos fotodetectores y un sistema de registro.

- **Fase luminosa:** una bombilla pequeña de filamento enrollado es ideal para concentrar la luz en un haz intenso. La incandescencia causada por la luz visible de la lámpara de tungsteno-halógeno se basa en las altas temperaturas de calentamiento que alcanzan el filamento.
- **Monocromadores:** descompone la luz incidente de un espectro de luz, es decir, se encarga de separar y seleccionar la radiación de onda que se quiere analizar. Está compuesto por las rendijas de entradas y salida de, colimadores

y el elemento de dispersión, en los Monocromadores convencionales se usa el prisma como elemento de dispersión.

- **Elementos fotodetectores:** es la parte del instrumento que recibe la intensidad de radiación monocromática de la muestra analizada y la transforma en una señal eléctrica que es medida y comparada con un valor de referencia. El material fotosensible del cátodo emite electrones al ser irradiados, debido al voltaje aplicado entre los electrodos los electrones se dirigen a los ánodos, este flujo de electrones permite que por el circuito fluya una corriente cuya intensidad es directamente proporcional a la intensidad de la luz que se mueve al fototubo.
- **Sistema de registro:** sirve como controlador del equipo, ya que este será el encargado de procesar la información que proviene de los circuitos electrónicos. [29]

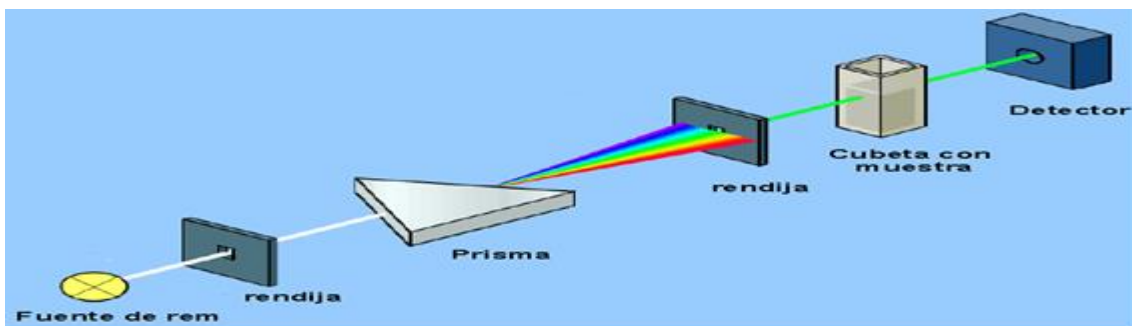


Figura 7. Estructura básica del espectrómetro UV- Vis. [32]

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente, existen diversas enfermedades a causa de concentraciones elevadas de minerales pesados, que aumentan dentro del organismo debido a factores como la dieta, herencia, medicamentos, etc.

En investigaciones previas se describe como la terapia de quelación de Hierro, Calcio en otros, el cual el EDTA reduce el exceso del ión metálico en el organismo, sin embargo los medicamentos empleados producen diversas reacciones adversas y tienen costes muy elevados. ¿Cuál será el efecto del EDTA sobre los iones Fe^{2+} ?

3. JUSTIFICACIÓN

La metodología se ha respaldado por lo observado en investigaciones anteriores en terapia de quelación de hierro, comparando tres medicamentos destinados para la reducción de Fe^{2+} en el organismo, resaltando su acción quelante. Aclarando que no se realizó una comparación experimental de los medicamentos y el EDTA, solo se tomó como referencia en comparación como posible terapia.

Esta investigación in vitro analiza los efectos que el EDTA al 14% ejerce sobre iones hierro y en niveles de hemoglobina de muestras sanguíneas. Los datos obtenidos proporcionaran más información sobre el comportamiento en el aumento de la concentración de EDTA, ya que hay un limitado conocimiento sobre este tema.

4. HIPÓTESIS

Las concentraciones de hierro sérico y hemoglobina se verán o no alteradas ante la exposición de EDTA al 14%.

5. OBJETIVOS

5.1. GENERAL

Evaluar el comportamiento de EDTA al 14% sobre concentraciones de hierro sérico y hemoglobina por espectrofotometría UV - Vis

5.2. ESPECIFICOS

- Obtener las muestras sanguíneas de pacientes totalmente sanos
- Preparar el reactivo cianometahemoglobina
- Obtener los valores iniciales de absorbancia de hemoglobina de las muestras a través del método de cianometahemoglobina
- Determinar los valores de hemoglobina con EDTA al 14% en diferentes diluciones
- Determinar la relación en la concentración sérica de Fe^{2+} sin dilución y con dilución de EDTA
- Analizar mediante la técnica de espectrofotometría UV- Vis

6. UNIVERSO DE TRABAJO

- **Tipo de Estudio:** Prospectivo, Observacional, Transversal y Analítico.
- **Tamaño de la muestra:** el muestreo se realizó mediante la selección de personas en base de criterios de inclusión y exclusión. Los análisis fueron realizados en muestras de cuatro personas.
- **Muestra en estudio:** Sangre total y suero de la misma persona.
- **Criterios de Inclusión:** se incluyeron jóvenes masculinos sanos de 20 a 25 años, de la Facultad Ciencias Químicas de la BUAP.
- **Criterios de Exclusión:** Individuos que no cumplan con los requisitos establecidos y quienes no acepten la prueba.
- **Método estadístico:** Tipo Descriptivo.

7. METODOLOGÍA

7.1. MATERIAL Y MÉTODOS

Pipetas volumétricas de 5ml	Probeta 1 L
Pipeta calibrada de 20µl y 200 µl	Vaso de precipitado diferentes volúmenes
Puntas amarillas para pipeta (las necesarias)	Espátula
Tubos de eppendorf	Piseta
Tupos de ensayo	Gradillas
Cubetas de espectrofotómetro	Jeringa

7.2. MATERIAL BIOLÓGICO

Muestras de sangre (tonalidad oscura)

7.3. REACTIVOS

Cianometahemoglobina (HiCN)

EDTA

7.4. EQUIPO

Espectrofotómetro UV GENESYS 20 THERMO CIENTIFIC

Balanza analítica

Hemograma KBC -3000

7.5. PROCEDIMIENTO

Se pesa por separado cada reactivo para solución cianometahemoglobina (Anexo 2), disolviéndose por separado en 1L de agua destilada. Se guarda en una botella oscura y se rotula.

Principio del Método de la HiCN

El método de la HiCN tiene como fundamento la conversión de toda la Hb en HiCN, cuya absorbancia es leída en un fotocolorímetro (filtro verde-amarillo) o en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm. Dicha transformación se lleva a cabo en dos etapas (18): en la primera el ferricianuro potásico [$3 \text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$] pasa el Fe^{+2} a Fe^{+3} (Hi) y, en la segunda, el cianuro potásico [KCN] convierte a la Hi (metaHb) en HiCN (cianometahb). Todos los derivados de la Hb [Hb, HbO₂, HbCO, Hi] son convertidos en HiCN, salvo la HbS (sulfoHb).

Procedimiento

En tubos de ensayo se colocan 5 ml de solución Drabkin, se agregan 20 μl de la muestra (sangre total), se lava varias veces con la pipeta.

El método es llevado a cabo de forma manual por lo cual debe homogeneizarse por inversión repetida del tubo unas 30 veces como mínimo. Se deja reposar por un minuto y se procede a su lectura.

Las características físicas de este diluyente son las siguientes: color amarillo pálido, una transparencia absoluta, un pH de 7.2 (7.0 -7.4), un espectro de absorción lumínica característico de la HiCN, y una absorbancia a 540 nm vs blanco de reactivo. Esta solución de trabajo es estable por lo menos seis meses a temperatura de refrigeración, siempre y cuando se conserve en botellas de polietileno, aunque es preferible el uso de botellas de borosilicato marrón.

Preparación de EDTA al 14%

Se pone en un vaso 10 ml de agua destilada y se agrega 1.4 gr de EDTA (Anexo 4). Se guarda en un frasco oscuro y se rotula.

Preparación de disoluciones 1:1, 1:2 y 1:3

En tres tubos de eppendorf se coloca las siguientes cantidades de reactivos:

Concentración	Sangre	EDTA
1:1	200µl	200µl
1:2	200µl	400µl
1:3	200µl	600µl

Una vez terminadas las soluciones se dejan en refrigeración durante 24 hrs. Transcurrido el tiempo se toma 20 µl de las disoluciones anteriores agregando 5 ml de solución Drabkin por tubo.

Se lleva al UV y se lee su absorbancia a 540 nm.

Determinación De Hierro Sérico

Principio Del Método

El hierro se disocia del complejo sérico hierro-transferrina en medio ácido débil. El hierro libre se reduce a ión ferroso mediante el ácido ascórbico. Los iones ferrosos en presencia de FerroZine forma un complejo coloreado:

Reactivos

R1 Tampón	Acetato pH 4,9	100 mmol/L
R2 Reductor	Ácido ascórbico	99,7%
R3 Color	FerroZine	40 mmol/L
IRONCAL	Patrón primario acuoso de Hierro	100µg/Dl

Material Adicional

- Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 562 nm.
- Cubetas de 1,0 cm de paso de luz.

Muestras

Suero o plasma heparinizado.

Libre de hemólisis. Separado lo antes posible de los hematíes.

Estabilidad de la muestra: El hierro es estable de 7 días a 2-8°C

Procedimiento

1.- Condiciones del ensayo:

Longitud de onda: 562 nm (530-590)

Cubeta: 1 cm paso de luz

Temperatura. 37°C / 15- 25°C

2.- Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.

3.- Pipetear en una cubeta:

	Blanco RT	Patrón	Blanco Muestra	Muestra
RT(ml)	1,0	1.0	1.0	1.0
R3(gotas)	1	1	-----	1
Agua destilada (µl)	200	-----	-----	-----
Patrón (µl)	-----	200	-----	-----
Muestra (µl)	-----	-----	200	200

4.- Mezclar e incubar 5 min a 37°C o 10 min a temperatura ambiente.

5.- Leer las absorbancias (A) del Patrón y la muestra frente al Blanco de reactivo. El color es estable como mínimo 30 minutos.

Cálculos

$$\frac{(A) \text{ muestra} - (A) \text{ blanco muestra}}{(A) \text{ patron}} \times 100 (\text{conc. patron}) \frac{\mu\text{l}}{\text{dl}} \text{ de hierro}$$

Factor de conversión: µg/dL x 0,179= µmol/L.

Valores De Referencia

Hombres

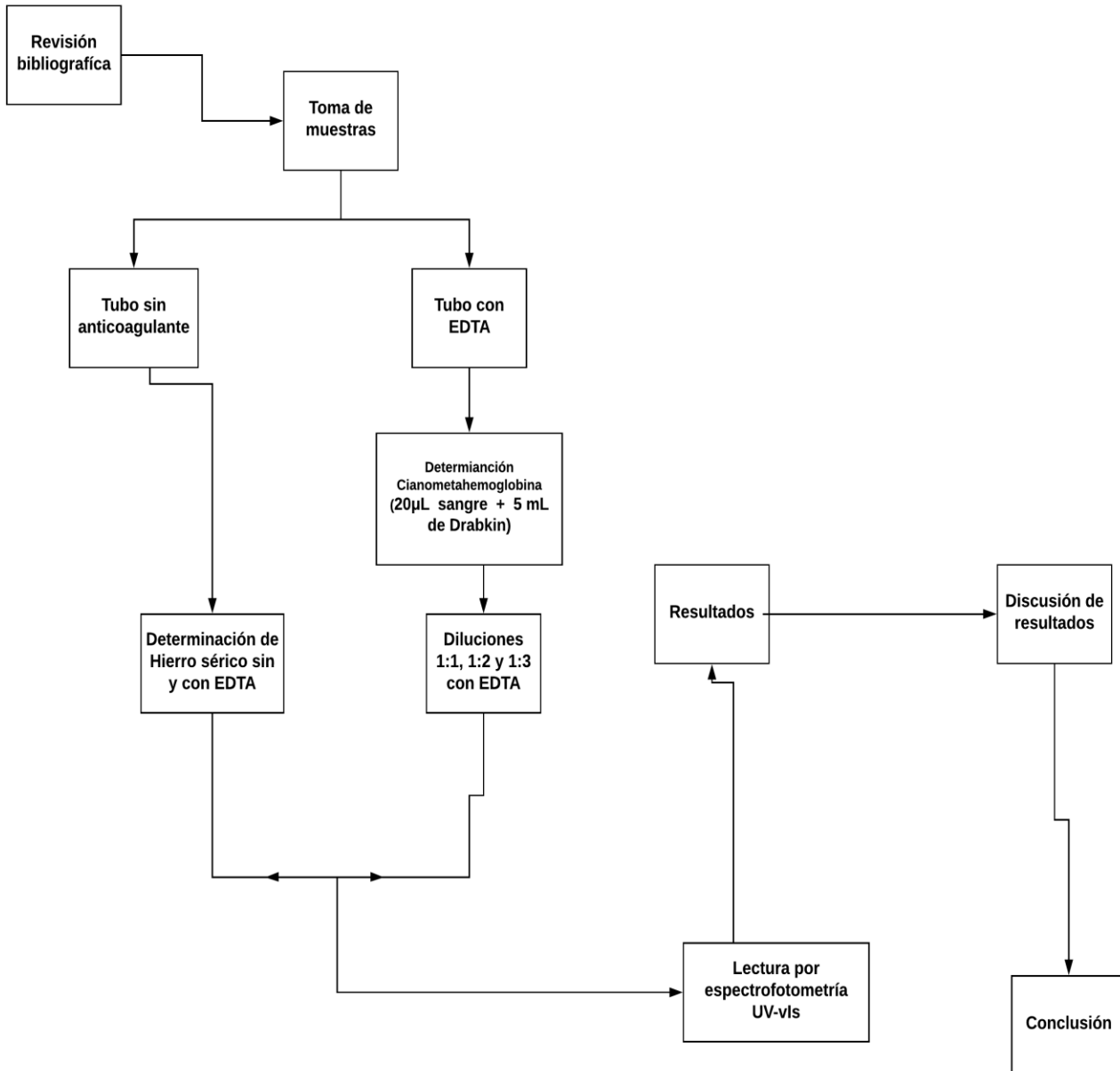
65-175 µg/dL \cong 11,6-31,3 µmol/L

Mujeres

40-150/dL \cong 7,16-26,85 µmol/L

Estos valores son orientativos. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

8. DIAGRAMA DE TRABAJO

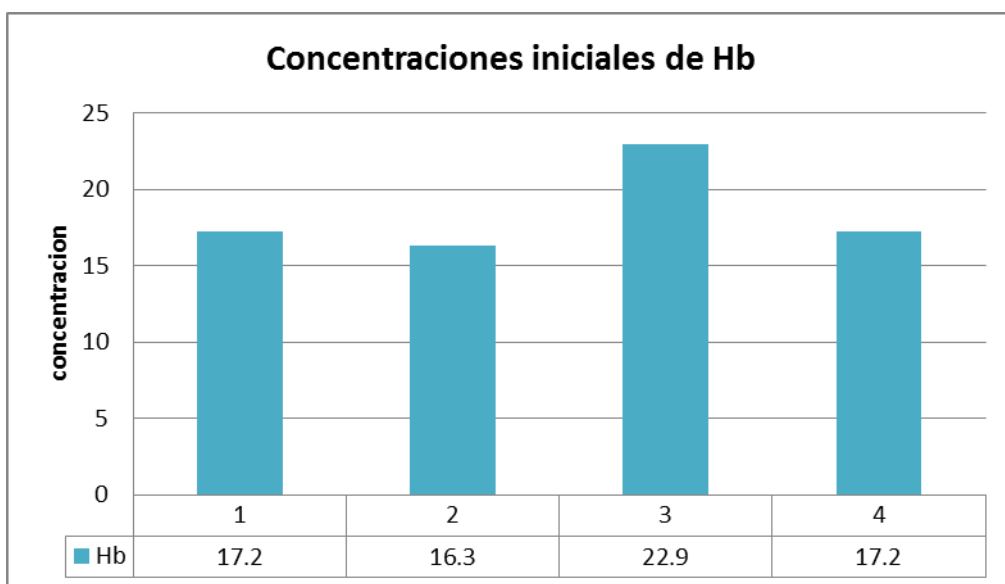


9. RESULTADOS

Durante la investigación se trabajó con un total de cuatro muestras sanguíneas, dos por cada individuo tomando en cuenta los criterios de inclusión ya mencionados anteriormente. Se les realizó biometría hemática por método automatizado (KBC- 3000), los valores obtenidos se muestran en la tabla 1.

Muestra	1	2	3	4
Hemoglobina	17.2 g/dl	16.3 g/dl	22.9 g/dl	17.2 g/dl

Tabla 1. Determinación de hemoglobina por biometría hemática.



Grafica 1. Concentraciones iniciales de Hb.

De las muestras recopiladas se seleccionó la muestra de concentración de Hb mayor o igual a 13.5 a 18 g/dl en varones (valor de referencia), la cual se ocupó como muestra control y se le realizaron diluciones normal y con EDTA (1:1, 1:2 y 1:3,) en relación sangre /EDTA al 14 % y se determinó la concentración de Hb con el método de Cianometahemoglobina, trabajando 6 soluciones, obteniendo los siguientes resultados:

<u>Normal</u>		<u>Con EDTA</u>	
Soluciones	Absorbancia	Diluciones	Absorbancia
1	0.630	1:1	0.494
2	0.606	1:2	0.225
3	0.587	1:3	0.154

Tabla 2. Concentraciones de la técnica Cianometahemoglobina normal y con EDTA de la muestra control.

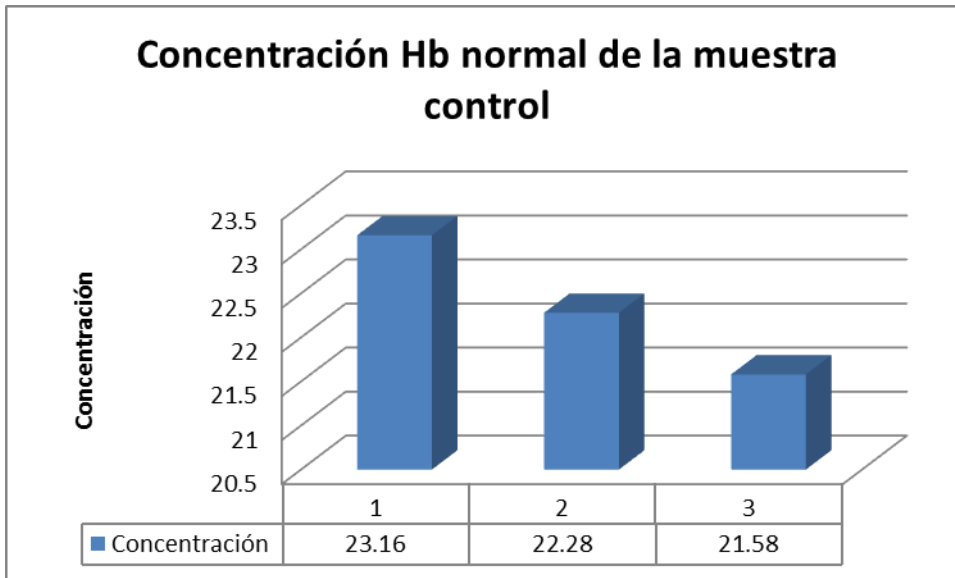
Para la determinación de cianometahemoglobina en gr/dl se utilizó el siguiente cálculo:

$$\text{Hb (gr/dl)} = \frac{(A) \text{ muestra}}{(A) \text{ St} * [\text{conct. St}]}$$

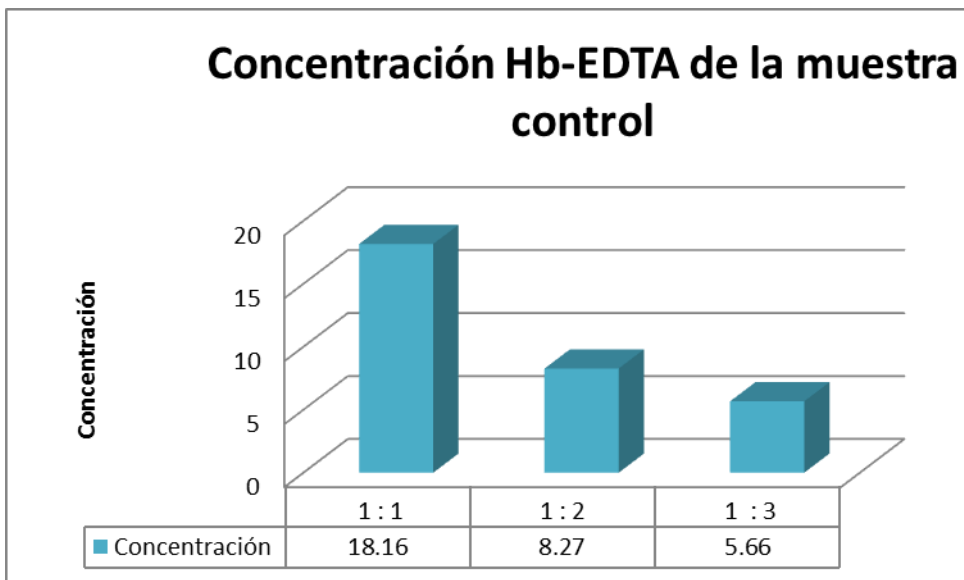
Obteniéndose lo valores presentados en la tabla 3:

<u>Normal</u>		<u>Con EDTA</u>	
Soluciones	Concentración (gr/dl)	Diluciones	Concentración (gr/dl)
1	23.16	1:1	18.16
2	22.28	1:2	8.27
3	21.58	1:3	5.66

Tabla 3. Concentración de niveles de Hb antes y después del agregado de EDTA.



Gráfica 2. Concentraciones iniciales de soluciones antes de EDTA en la muestra analizada del alumno en estudio con la mayor concentración de Hb.

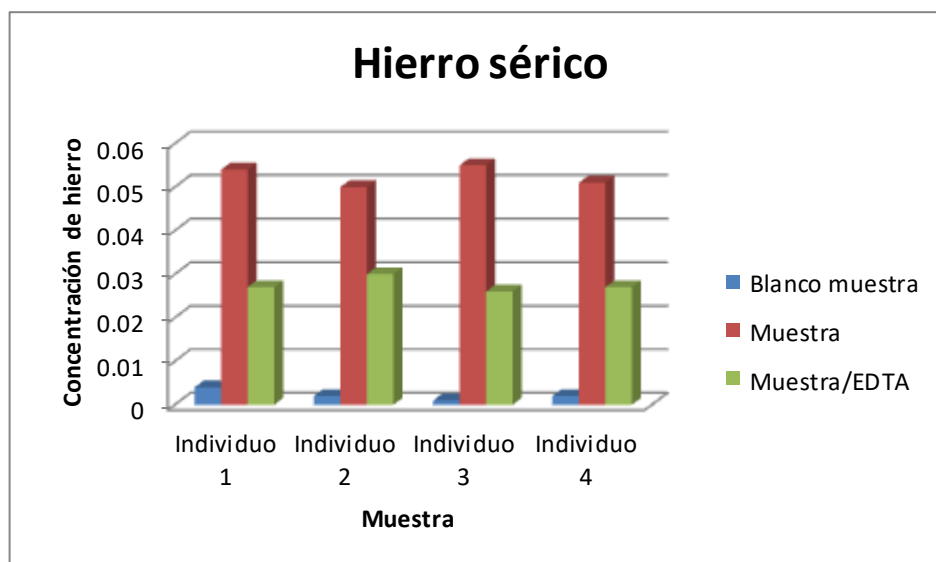


Gráfica 3. Concentraciones finales después del agregado de EDTA en la muestra analizada del alumno en estudio con la mayor concentración de Hb.

Para la técnica de determinación de Hierro, se separó el suero del paquete celular colocándolo en tubos de eppendorf. Se llevó a cabo la técnica determinándola por espectrofotometría UV-vis (espectrofotómetro Genesys 20), obteniendo resultados mostrados en la Tabla 4:

	Absorbancias			
	Individuo 1	Individuo 2	Individuo 3	Individuo 4
RT	0.009	0.009	0.009	0.009
Patrón	0.048	0.048	0.048	0.048
Blanco Muestra	0.004	0.002	0.001	0.002
Muestra	0.054	0.050	0.055	0.051
Muestra/EDTA	0.027	0.030	0.026	0.027

Tabla 4. Absorbancias de Hierro Sérico, antes y después de la agregación de EDTA.

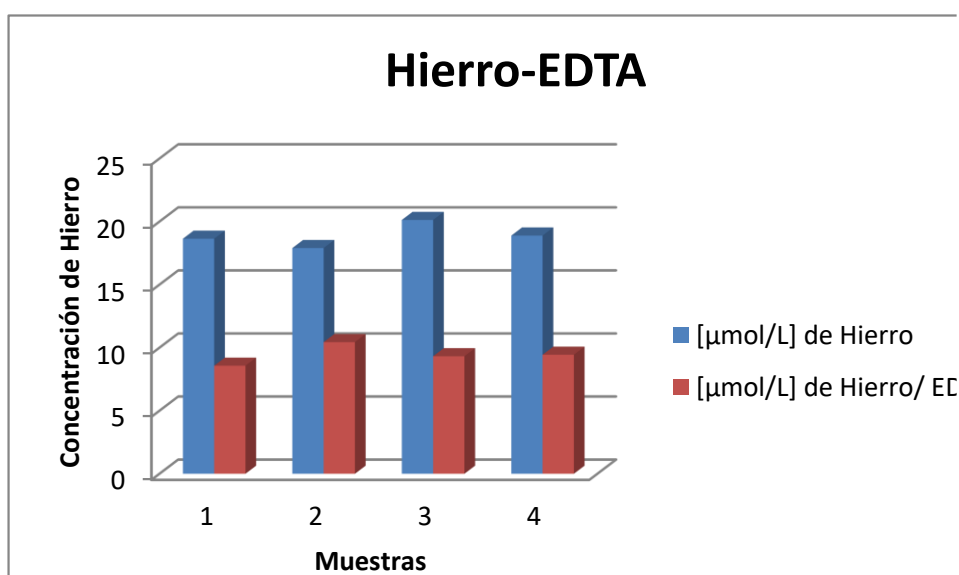


Grafica 4. Datos comparativos de Hierro Sérico de las cuatro muestras antes y después de la administración de EDTA de los alumnos en estudio.

Se sustituyó los resultados en la formula calculando de la concentración final de Hierro sérico normal y con EDTA al 14% (tabla 4):

	Individuo1	Individuo 2	Individuo 3	Individuo 4
[$\mu\text{mol/L}$] de Hierro	18.64	17.9	20.13	18.89
[$\mu\text{mol/L}$] de Hierro/ EDTA	8.57	10.44	9.32	9.44

Tabla 5. Concentraciones finales de Hierro Sérico antes y después de la agregación de EDTA, notando una clara disminución en los valores.



Gráfica 5. Comparación de las concentraciones de Hierro antes y después con EDTA en las muestras analizadas de los alumnos en estudio.

10. DISCUSION DE RESULTADOS

La obtención de las muestras fue por medio de venopuncion, llevando acabo con anterioridad el protocolo de consentimiento de los pacientes (anexo 1). Para la obtención de suero, las muestras fueron llevadas a la centrifugadora C-600 a un tiempo de 5 min a 2500 rpm. Se hizo la recolección del plasma y del suero para realizar las técnicas correspondientes.

Se llevó a cabo la técnica de determinación de Hierro apegándonos al marbete SPINREACT. La lectura de las muestras fue determinada por:

- Espectrofotómetro UV GENESYS 20

El EDTA disminuye la concentración de Hb en las muestras de estudio así como la concentración de Hierro Sérico. Los valores de absorbancia de la muestra control en cada una de las diluciones muestran cambios, disminuyendo con el agregado de EDTA respecto a sus lecturas iniciales, así como los valores de absorbancia de las muestras de Hierro sérico en cada una de los individuos. El EDTA ejerce el efecto quelante sobre la hemoglobina e iones Fe^{2+} .

Utilizamos la concentración al 14% de EDTA debido a que todos sin excepción estamos expuestos al uso de aditivos en alimentarios, medicamentos y productos para la higiene y el aseo personal además de consumirlo en el agua de consumo.

11. CONCLUSION

- 1) Los valores de absorbancia de la muestra control en cada una de las diluciones muestran cambios, disminuyendo con el agregado de EDTA respecto a sus lecturas iniciales.
- 2) Los valores de absorbancia de las muestras de Hierro sérico en cada una de las diluciones muestran cambios, disminuyendo con el agregado de EDTA respecto a sus lecturas iniciales.
- 3) Las absorbancias obtenidas por las muestras demuestran disminución con respecto a la dilución.
- 4) El EDTA tiene efecto sobre la hemoglobina.
- 5) El EDTA tiene efecto sobre iones Fe^{2+} .
- 6) Este trabajo sirve como referencia para realizar investigación para considerar el EDTA como alternativa en la terapia de quelación de hierro.

12. ABREVIATURAS

BH- Biometría Hemática

EDTA- Ácido Etilen Diamino Tetraacético

HiCN - Cianometahemoglobina

Hb- Hemoglobina

13. ANEXOS

ANEXO 1

CONSENTIMIENTO INFORMADO: Toma de muestras biológicas

CONSENTIMIENTO Lugar y Fecha

.....

Firma del paciente (familiar o representante legal en caso de incapacidad)

DNI.....

Firma del Profesor (responsable de la información)

No. Colegiado.....

DENEGACIÓN Lugar y Fecha

.....

Firma del paciente (familiar o representante legal en caso de incapacidad)

DNI.....

Firma del Profesor (responsable de la información)

No. Colegiado.....

REVOCACIÓN Lugar y Fecha.....

Firma del paciente (familiar o representante legal en caso de incapacidad)

DNI.....

Firma del profesor (responsable de la información)

No. Colegiado.....

Fecha de Validación.....

ANEXO 2

Preparación reactivo cianometahemoglobina (Drabkin)

Reactivos

Bicarbonato de sodio.....	1gr
Ferrocianuro de potasio.....	0.05 gr
Cianuro de potasio.....	0.02 gr
Agua destilada.....	1000 ml

Material

1 vaso de precipitado de 1L

1 probeta de 1Ll

1 espátula

1 balanza

1 embudo

Frasco

ANEXO 3

Reactivo diluyente: (Drabkin, modificado por Van Kampen y Zijlstra (VKZ):

K₃ Fe (CN)₆ (RA).....200 mg

KCN (RA).....50 mg

KH₂PO₄ (RA).....140 mg

Sterox SE (Harleco).....0.5 ml

H₂O destilada.....1000 ml

ANEXO 4

Preparación de EDTA al 14%

Reactivos

EDTA..... 1.4 gr

Agua destilada..... 100 ml

Material

1 espátula

1 parrilla

1 pipeta de 5 ml

Frasco 10 ml

Piseta

14. BIBLIOGRAFÍA

1. Guatemala, P. (2017). QUELACIÓN INTRAVENOSA, LA TERAPIA MÁS EFECTIVA PARA COMBATIR LA ARTERIOSCLEROSIS. Promesa Guatemala, 1-3.
2. Gerardo, P. R. (Mayo de 2017). Evaluacion IN VITRO de los efectos del anticoagulante EDTA (etilendiamintetraacetico) sobre los valores de hemoglobina y los componentes celulares de muestras sanguineas. Puebla, Puebla, México.
3. Bedolla, R. M. (2017). Evaluacion IN VITRO de los efectos del anticoagulante EDTA (etilendiamintetraacetico) sobre los valores de hemoglobina y los componentes celulares de muestras sanguineas. Puebla, Puebla, México
4. Karina, Q. G. (2015). Determinación de fosfatasa alcanina ósea, calcio sérico, biometría hemática, calcio e hierro por absorción atómica en ratas descalcificadas por EDTA. Puebla, Puebla, México.
5. Bedolla, R. M. (2015). Determinación de fosfatasa alcanina ósea, calcio sérico, biometría hemática, calcio e hierro por absorción atómica en ratas descalcificadas por EDTA. Puebla, Puebla, México.
6. Egea, J. S. (1997). El ácido Etilen Diamino (EDTA) y su uso en endodoncia. 1.
7. Rodríguez, J. (2014). FMF - Foro de Mineralogía Formativa. Recuperado el 25 de Octubre de 2017, de <http://www.foro.minerales.com/forum/viewtopic.php?t=10199>
8. Rodríguez, C. O. (2003). EDTA: THE CHELATING AGENT UNDER ENVIRONMENTAL SCRUTINY. Renewable Resources Laboratory, 901-902.
9. Martindale, Guía completa de consulta farmacoterapéutica, 1ª ed. (2003).
10. The Merck Index, 13ª ed. (2001).

11. Monografías Farmacéuticas, C.O.F. de Alicante (1998).
12. Handbook of Pharmaceutical Excipients 6th ed., 2009.
13. Östby, N. (2008). Chelation in root canal therapy. Ethylenediamine tetraacetic acid for cleansing and widening of root canals. . 3-11.
14. Arbeláez, E. P. (1953). Quelatación. La teoría de los ligandos. 1-5.
15. Donnersberger, A. B. (2002). Libro de laboratorio de anatomía y fisiología. Barcelona : Editorial Paidotribo.
16. Silverthorn, D. U. (2008). Fisiología Humana. Un enfoque integrado. Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana, S.A.
17. Fox, S. I. (2014). Fisiología Humana . México D.F: McGRAW- HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A .
18. Vay, D. L. (2004). Anatomía y Fisiología Humana . Barcelona : Paidotribo.
19. Villavicencio-Queijeiro, A. (2012). La mitocondria como fábrica de cofactores: biosíntesis de grupo hemo, centros Fe-S y nucleótidos de flavina (FMN/FAD). SciELO, 2.
20. CASTAÑOS, E. (5 de Julio de 2015). LIDIA CON LA QUIMICA . Recuperado el 24 de Octubre de 2017, de <https://lidiaconlaquimica.wordpress.com/tag/hemoglobina/>
21. Andrews, N. (1998). Disorders of iron metabolism and sideroblastic anemia. . Nathan and Oski's Hematology of infancy and childhood., 23-61.
22. N, G. R. (2010). Conceptos actuales sobre fisiología. SAH, 1-2.
23. Refsun, A. (1984). Regulation of iron balance by absorption and excretion. . 67-74.
24. Wick M, P. W. (1996). Iron metabolism, diagnosis and therapy of anemias.

25. VILAPLANA, M. (2001). El metabolismo del hierro. Farmacéutica comunitaria. Máster en Nutrición y Ciencias de los Alimentos., 123-124.
26. Hentze, M. (1993). Iron regulatory factor - the conductor of cellular iron regulation. Annual Course. Advan Haematol, 36-48.
27. Thews, G. (1983). Anatomía, Fisiología y Patofisiología del hombre. Manual para Farmacéuticos y Biólogos. Barcelona : Reverté.
28. CENTER, S. C. (28 de Septiembre de 2007). Macrófago . Recuperado el 26 de Octubre de 2017, de <https://siteman.wustl.edu/glossary/cdr0000044054/>
29. Espectrofotómetro, E. (2016-2017). El Espectrofotómetro. Recuperado el 4 de Noviembre de 2017, de <https://elespectrofotometro.com/espectrofotometria-uv-visible/>
30. Bello, D. G. (27 de Mayo de 2015). DIMETILSULFURO. Recuperado el 20 de Octubre de 2017, de <http://dimetilsulfuro.es/2015/05/27/solares-con-filtros-quimicos-o-fisicos/>
31. Association, A. H. (2002). Standard methods for the examination of water and wastewater .
32. Fernández, G. (18 de Mayo de 2015). Química Orgánica . Recuperado el 24 de Octubre de 2017, de <http://www.quimicaorganica.net/esquema-espectrofot%C3%B3metro.html>
33. Santiago, N. L. (2010). Terapia de quelación del hierro. Asociación Mexicana de Medicina Transfuncional.A.C., pp S80-S86.