

**D CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUIMICA**



**Diseño y Evaluación de un sistema colorimétrico para análisis clínicos en
celdas ELISA.**

Trabajo Especial de Grado presentado
ante la ilustre Universidad Central de
Venezuela por la Br. Andreina del V
Briceño Marquez para optar al título de
Licenciado en Química. Tutores: Dr.
Freddy González Mujica y Dr. Jimmy
Castillo. (UCV)

Caracas, Abril 2009

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: **Í Diseño y Evaluación de un sistema colorimétrico para análisis clínicos en celdas ELISAÍ**. Presentado por la **Br. Andreina del Valle Briceño Marquez** certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciado en Química.

Dr. Jimmy Castillo
(Director)

Dr. Freddy González Mujica
(Director)

Dr. José Chirinos
(Jurado)

Dr. Héctor Gutiérrez
(Jurado)



Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

Dedicado a Dios Todopoderoso, mi padre celestial, quien ha sido el guía en mis años de estudio, mi consuelo en los momentos de angustia y mi ánimo en la tribulación. Hoy este trabajo es posible gracias al amor y la misericordia que has tenido conmigo.

Dedicado también a mis padres que me han dado vida y han sido motivo principal de inspiración. Los amo muchísimo.

A mis padres que me apoyaron y me apoyan hoy en día. Gracias a ustedes que me han dado todo sin recibir nada a cambio, por hacer de mis años de estudio una experiencia grata e indescriptible y recordarme siempre lo importante que soy para ustedes. Por el gran amor que les tengo gracias por ser mi inspiración.

A mi esposo por animarme cuando desesperaba por los estudios, por llegar a mi vida y formar parte de mi inspiración. Gracias cielo.

A mis tutores: Dr. Freddy González Mujica por el interés, la dedicación y el entusiasmo que mostró y Dr. Jimmy Castillo a los dos por ser partícipes de este logro.

A la profesora Yosmery Brito quien fue también mi tutora, por el tiempo dedicado comprensión y entusiasmo que siempre mostró para conmigo. Muchas gracias.

La mayoría de los análisis clínicos que se realizan en la actualidad, se basan en ensayos colorimétricos, donde las propiedades ópticas de la sustancia de interés, permiten su detección y posterior cuantificación, mediante la aplicación de la Ley de Beer. Para detectar la radiación absorbida por el analito, suelen utilizarse espectrómetros sencillos, tales como fotocolorímetros y/o equipos dispersivos altamente sofisticados, tales como espectrofotómetros o sistemas multicanal. Normalmente en este tipo de análisis, se requiere procesar simultáneamente una elevada cantidad de muestras, por tal razón se han desarrollado los denominados lectores de placas de ELISA+, que permiten medir en un solo paso hasta 96 muestras. Estos lectores presentan una alta sensibilidad y emplean sistemas mecánicos para desplazar la muestra y leer los 96 pozos uno a uno o en el mejor de los casos en grupos de 8. En el presente trabajo, se construyó un analizador colorimétrico, para ser utilizado en la realización de algunos ensayos del tipo inmuno-enzimáticos, ELISA. Este analizador tiene una fuente de radiación que consiste de un arreglo plano de diodos de emisión de luz, leds, color blanco. El receptáculo de la muestra es una placa ELISA de 96 micro-pozos y el sistema de detección es una cámara Web. El dispositivo se utilizó para determinar simultáneamente la absorción de luz sobre soluciones coloreadas, contenidas en los micro-pozos de la placa ELISA. Para el tratamiento de los datos, se diseñó un software que permite capturar las imágenes de la placa, digitalizarla y separarla en sus componentes RGB (rojo, verde y azul) e intensidad. De esta manera, se transforman las imágenes en superficies de respuesta de intensidades para cada color al que responde los filtros de la cámara, permitiendo de esta forma al compararlo con una referencia, calcular la absorbancia de un punto en particular de la imagen y así mediante una curva de calibración obtener la concentración de una determinada sustancia en ese punto. El sistema colorimétrico se comparó con respecto a un espectrofotómetro convencional, se obtuvo una menor sensibilidad del primero respecto al segundo, no obstante los demás parámetros de calibración, fueron similares en magnitud con lo cual se concluyó que ambos sistemas presentaban una eficiencia analítica similar .

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

ión del analizador, en la determinación de las concentraciones de glucosa y de proteínas en plasma de ratas. Se obtuvieron en los animales estudiados, niveles de glucosa en el intervalo de 750 a 3000 mg.L^{-1} , mientras que para las proteínas, los niveles fueron de 2.5 a 10 $\text{g}/100 \text{ mL}$. Ambos resultados están dentro de los niveles normales, para la glucosa $600 . 1000 \text{ mg.L}^{-1}$ y para las proteínas entre $6,4 . 8,3 \text{ g}/100 \text{ mL}^{-1}$, con estos valores los animales presentan ausencia en las patologías esperadas, esto es diabetes y enfermedades renales, respectivamente. Los resultados obtenidos fueron comparados con aquellos suministrados por un espectrómetro convencional, se encontró que los resultados no presentan diferencias significativas a un nivel de confianza del 95%, lo que indica una alta exactitud del sistema. Estos resultados permitieron validar la eficiencia del analizador diseñado en la realización de estos análisis clínicos en muestras reales. Por otro lado, se obtiene una precisión del 7-8% para el sistema colorimétrico y de 4-6% en el espectrómetro al determinar proteínas; mientras que para la glucosa se obtuvo una precisión de 2-9% en el sistema propuesto.

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

Introducción	10
2.- Marco teórico	12
2.1.- Definición de la glucosa	12
2.2 Ciclo de producción de la glucosa	12
2.3. Importancia de la determinación de glucosa en los seres humanos	15
2.4. Importancia de la determinación de proteínas en los seres humanos	15
3.- Técnicas aplicadas para la realización de exámenes clínicos mediante Química clínica.	16
3.1.- Instrumentos espectroscópicos utilizados en la realización de análisis clínicos	18
4.- Tendencias actuales en diseños de espectrofotómetros mediante procesamiento computarizado de imágenes	20
4.1 Implementación de tecnología opto-electrónica y procesamiento computarizado de imágenes, en el diseño de lectores de Absorbancia	21
5.- Justificación y objetivos del proyecto	24
6.- Parte Experimental	26
6.1. Reactivos.	26
6.2. Soluciones	26
6.3.- Muestra	26
6.4.- Instrumentación	27
6.4.1.- Sistema colorimétrico: Lector de Absorbancia	27
6.4.1.1.- Descripción del sistema	27
6.4.1.2.- Funcionamiento del sistema	28
6.4.2.- Espectrómetro Ocean Optic	30
7.- Metodología experimental	31
7.1.- Optimización y evaluación del Lector de Absorbancia	31
7.2.- Obtención y preparación de la muestra	31
7.3.- Determinación de la glucosa en sangre	32
7.3.1.- Método Glucosa Oxidasa	32
7.4.- Determinación de proteínas en plasma de ratas	34
7.5.- Aplicación del sistema colorimétrico	35

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

	36
8.1.- Calibración del sistema colorimétrico	36
8.1.1.- Soluciones coloreadas	..36
8.1.2.- Calibración de Glucosa	.41
8.1.3.- Calibración de proteínas	..42
8.2.- Aplicación del sistema en la determinación de glucosa	44
8.3.- Aplicación del sistema en la determinación de proteínas totales	.48
8.4.- Comparación de métodos en la determinación de glucosa	..49
9.- Ventajas del sistema colorimétrico propuesto	.50
Conclusiones	..51
Recomendaciones	.52
Bibliografía	..53
Glosario	...55

La química clínica está enfocada en la realización de exámenes de rutina, para la cuantificación de especies de interés en fluidos biológicos, determinación de reserva electrolítica y bióxido de carbono en la sangre. Existen muchos exámenes diferentes para analizar casi todos los tipos de componentes químicos presentes en la sangre o en la orina. Entre los componentes que se determinan comúnmente, están la glucosa, los electrolitos, las enzimas, las hormonas, los lípidos (grasas), las proteínas y otras sustancias metabólicas. Para la determinación de estos componentes, suelen utilizarse ciertos procesos químicos, tales como reacciones colorimétricas, en la cual la sustancia de interés presente en la muestra biológica reacciona con sustancias específicas produciendo especies coloreadas. Existe una dependencia entre la concentración y la magnitud del color de dichas especies, esto es a mayor intensidad del color mayor será la concentración de la sustancia y viceversa. Esta dependencia se expresa matemáticamente mediante la ley de Lambert- Beer, la cual establece una relación directamente proporcional entre la cantidad de luz que absorbe el analito, su absorbancia y la concentración de la misma. De esta forma, es posible cuantificar la sustancia mediante métodos espectroscópicos.

Para la realización de los análisis de química clínica, suelen utilizarse los denominados lectores de absorbancia, estos son equipos que permiten procesar un elevado número de muestras en celdas que consisten de 96 micro -pozos y donde se llevan a cabo análisis de ensayos inmuno-enzimáticos (ELISA). La detección de radiación suele realizarse mediante fotómetros o espectrofotómetros.

La configuración y los componentes instrumentales de los lectores de absorbancia, requieren de personal especializado y condiciones ambientales específicas. Por tal razón, suelen estar ubicados en laboratorios clínicos de hospitales y clínicas, que posean la infraestructura adecuada. Esto trae como consecuencia, que gran parte de los análisis clínicos se centralicen en las grandes ciudades.

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

desarrollo y principalmente en sus zonas rurales, de baja actualización tecnológica, el uso de los equipos convencionales para análisis clínicos de rutina suelen verse limitados, debido a que normalmente no existe una infraestructura adecuada para la instalación de los mismos en estos sitios. Entonces surge como una necesidad urgente, el poder disponer de instrumentos médicos sencillos que puedan ser utilizados por cualquier operador en un momento y lugar determinado. En este sentido, actualmente existen algunos dispositivos de este tipo, que permitan realizar ciertos análisis clínicos en situ, tales como la medición de glucosa, colesterol en sangre, etc; lo que ha causado gran impacto en el campo de la medicina moderna. Estos equipos son el resultado del gran auge tecnológico actual.

Hoy en día, el uso de componentes opto-electrónicos, el desarrollo de sistemas para adquirir y procesar imágenes digitales y la disponibilidad de computadoras con software de alta capacidad de procesamiento, ha fomentado el desarrollo de equipos simples, portátiles y robustos que ofrecen resultados confiables en corto tiempo, aplicables a diversas disciplinas: medio ambiente, industria petrolera, medicina, etc. En el área médica se han desarrollado lectores de absorbancia con estas nuevas tecnologías, que permiten la evolución de equipos costosos, con largos tiempos de análisis, hacia equipos de medición simultánea, bajo costo y que permitan analizar un elevado número de muestras en corto tiempo, con el aumento en la rentabilidad de los análisis. Esto favorece la descentralización de los análisis clínicos.

2.1.- Definición de la glucosa

La glucosa es un compuesto químico de fórmula molecular $C_6H_{12}O_6$, cuya estructura se presenta en la figura 1, esta pertenece al grupo de compuestos bioquímicos denominado glúcidos, en particular la glucosa es un glúcido monosacárido¹. Los glúcidos se denominan también: azúcares, sacáridos, carbohidratos e hidratos de carbono que se encuentra en las frutas y en la miel; estos constituyen el grupo de biomoléculas más abundante sobre la superficie terrestre y suponen aproximadamente el 75 por ciento de la materia orgánica total. Estos compuestos se obtienen tras la fijación de CO_2 en el reino vegetal y posterior proceso de la fotosíntesis.

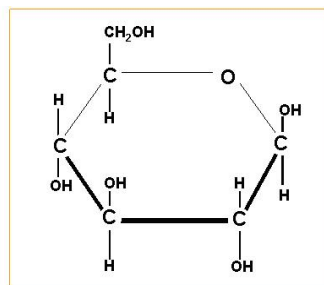


Figura 1. Molécula de glucosa

2.2.- Ciclo de Producción de la Glucosa en el organismo.

Los glúcidos intervienen en las principales funciones biológicas desde el punto de vista nutricional/energético de los seres vivos. Estos son fuente inmediata de energía para la inmensa mayoría de las células del cuerpo humano ². Muchos órganos, como el cerebro, necesitan obtener su energía de la glucosa aportada por la sangre (ver figura 2). Los niveles de glucosa sanguínea, glicemia, se mantiene entre límites muy estrechos gracias a un equilibrio entre los mecanismos que aportan glucosa y los que la retiran de la sangre. Entre los mecanismos que aportan glucosa a la sangre están: a) la absorción intestinal, que ocurre cada vez que

Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

glicólisis y la gluconeogénesis la cual se produce cuando estamos en ayunas y la reserva de glicógeno presente en el hígado pasa a la sangre, c) la neoglucogénesis que permite la producción de glucosa a partir de compuestos que no son carbohidratos.

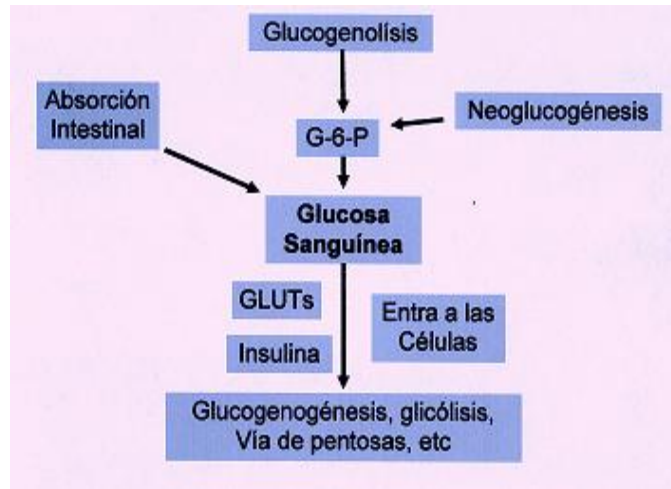


Figura 2. Esquema producción de glucosa en sangre

La ruta biológica principal mediante la cual la glucosa en la sangre, es utilizada por las células para obtener parte de su energía química es la glicólisis. En este proceso biológico, se producen moléculas de ATP por la utilización de glucosa en ausencia de oxígeno molecular; con la formación de piruvato y/o lactato y en otros organismos como las levaduras se produce etanol, mediante el proceso de fermentación. A través de la glicólisis, la glucosa se convierte en piruvato, el cual puede luego ser oxidado completamente en CO_2 y H_2O ³.

Determinación de glucosa en los seres humanos.

La glucosa es la principal fuente de energía para el metabolismo celular. Se obtiene fundamentalmente a través de la alimentación y se almacena principalmente en el hígado, el cual tiene un papel primordial en el mantenimiento de los niveles de glucosa en la sangre. El hígado es el órgano encargado de formar y almacenar glucógeno, no solo para su uso sino para mantener una concentración constante de glucosa en sangre, para que otros tejidos, especialmente el cerebro, tengan un suministro adecuado de este substrato ⁴.

La insulina es una hormona producida por el páncreas, que regula los niveles de glucosa en la sangre y permite que estos permanezcan en concentraciones adecuadas. Cuando la insulina es insuficiente, la glucosa se acumula en sangre y si esta situación se mantiene da lugar a una serie de complicaciones en distintos órganos⁴. Por esta razón, es importante mantener un monitoreo continuo de los niveles de glucosa en el organismo. El nivel de glucosa en la sangre es lo que conocemos como glucemia².

La determinación de los niveles de glucosa en sangre y orina es uno de los parámetros más medidos en bioquímica clínica y de los más importantes para fines diagnósticos, dietéticos y terapéuticos. En ayunas se mantiene relativamente constante, entre 90 - 100 mg por 100 mL, mediante la regulación hormonal de la insulina y el glucagón. Cuando se detecta un aumento en los niveles de glucemia, el paciente puede presentar enfermedades como la diabetes mellitus. En el caso de diabéticos, el nivel de glucemia que se alcanza es más alto y duradero que en personas normales ².

La hipoglucemia es una concentración de glucosa en la sangre anormalmente baja, inferior a 50 ó 60 mg por 100 mL. La hipoglucemia puede deberse a diversas causas; en personas sanas suele ser consecuencia de un ayuno muy prolongado debido a que el organismo sigue utilizando la glucosa una vez que ya no queda glucógeno en el hígado para producirla. También aparece en casos de trastornos

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

consumo de alcohol. En personas que padecen diabetes mellitus es muy habitual. En este caso, suele deberse a un exceso en la administración de insulina exógena o de medicamento oral antidiabético. Si se administran cuando no se ha comido lo suficiente, los niveles de glucosa pueden bajar hasta producir una hipoglucemia severa. En este tipo de pacientes también se puede producir por un exceso de ejercicio unido a una escasa ingesta de alimentos ya que la actividad física promueve la utilización de glucosa por los tejidos ³.

2.4. - Importancia de la determinación de proteínas en los seres humanos.

Las proteínas son un constituyente muy importante en las células y tejidos del cuerpo humano. Se componen de aminoácidos. Existen diferentes tipos de proteínas como las enzimas, algunas hormonas, la hemoglobina, el LDL (transportadora del colesterol), el colágeno, las inmunoglobulinas, entre otras, todas con diferentes funciones⁵.

Las proteínas totales presentes en el plasma sanguíneo se pueden separar en dos grandes grupos: la albumina que representa el 60% y el resto son las globulinas. La albumina se encarga de transportar muchas moléculas pequeñas y mantiene el equilibrio entre la presión sanguínea y la presión osmótica.

La determinación de proteínas es un análisis que mide la cantidad de proteínas totales en el plasma sanguíneo, con el fin de evaluar la posible presencia de enfermedades nutricionales, enfermedades del riñón o del hígado, o bien que el cuerpo no las absorba suficientemente⁵.

la realización de exámenes clínicos mediante química clínica.

La espectroscopia de absorción molecular en la región espectral UV/Visible, constituye una de las técnicas más utilizada en áreas como biología, medicina forense, ingeniería, agricultura y química clínica. La cuantificación de ciertos componentes químicos en sangre y en orina se realiza de forma indirecta mediante la aplicación de métodos espectroscópicos. En estos se mide la cantidad de radiación producida o absorbida por las especies moleculares en función de la longitud de onda utilizada, lo cual puede dar información cualitativa y cuantitativa de la muestra obedeciendo a la ley de Beer⁶. De acuerdo con la ley de Beer, la absorbancia es directamente proporcional a la concentración del compuesto mediante la ecuación:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot b \quad (1)$$

Siendo ϵ una constante denominada absortividad molar o coeficiente de extinción, característica del soluto, b el paso óptico de la cubeta de medida (expresado en cm), y c la concentración del soluto.

Las medidas espectrofotométricas son sencillas, fáciles de interpretar, susceptibles de automatización y altamente sensibles, esto las convierte en una de las herramientas de análisis preferidas para la realización rutinaria de exámenes clínicos. Por otro lado, la realización de ciertos análisis de química clínica también suelen realizarse mediante la técnica de fluorescencia molecular. En muchos casos, se prefiere esta técnica analítica debido a su elevada sensibilidad y selectividad que suele ser de uno a tres órdenes de magnitud superior a la espectroscopia de absorción.

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

fluorescencia, la muestra se excita a la longitud de onda de excitación y se mide la emisión a una longitud de onda mayor, llamada longitud de fluorescencia o emisión. Esto es debido a que las especies que han sido excitadas se relajan luego hacia el estado fundamental liberando el exceso de energía en forma de fotones. La fluorescencia se registra colocando el detector en dirección perpendicular con respecto a la fuente de radiación incidente y a la muestra, existe otra disposición de medir fluorescencia donde el ángulo que forman el detector, la fuente y la muestra es 45° , aunque este último es muy poco utilizado ⁶.

La concentración de un analito se puede determinar mediante fluorescencia molecular, dado la relación directamente proporcional entre la intensidad de emisión de fluorescencia (F) y la concentración, derivada de la ley de Beer y la cual se expresa mediante la siguiente ecuación:

$$F = K^* P_o c \quad (2)$$

Donde K^* es la constante de proporcionalidad, P_o es la energía de la radiación que incide en la muestra y c la concentración de la especie fluorescente.

roscópicos utilizados en la determinación de análisis clínicos.

Los instrumentos utilizados en la realización de análisis clínicos, son los lectores de absorbancia. Estos son equipos de laboratorio diseñados para detectar eventos biológicos, químicos y físicos en un gran número de muestras³.

Los lectores de absorbancia presentan los mismos componentes que los equipos espectrofotométricos convencionales, diferenciándose en el contenedor de la muestra, que consiste de una celda ELISA que puede contener desde 96 hasta 384 micro. pozos (ver figura 3), que permite la determinación de un gran número de muestras simultáneamente.

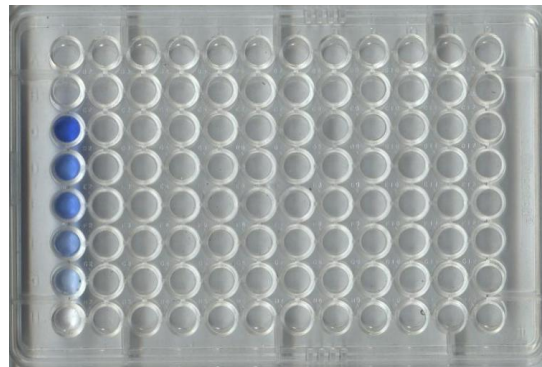


Figura 3. Placa de 96 pozos para análisis ELISA.

Estos dispositivos utilizan técnicas ópticas para evaluar el contenido en cada micro-pozo. Por ejemplo, un lector ELISA es usado para medir la intensidad de color formado en cada pozo. Esta técnica se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción cuyo producto, por ejemplo un colorante, puede ser medido espectrofotométricamente. Este principio tiene muchas de las propiedades de un inmuno ensayo ideal: es versátil, robusto, barato y simple en su realización³.

comercial es el modelo Synergy™ HT, ver figura 4, este contiene un micro-plato para la detección múltiple que utiliza dos series ópticas independientes, para sus medidas de absorbancia tiene una lámpara de xenón con un monocromador que permite seleccionar la longitud de onda y un fotodiodo para la detección. Este sistema permite la selección de cualquier longitud de onda para medidas que van desde 200 nm a 999 nm. Además, permite realizar medidas de fluorescencia utilizando una lámpara de tungsteno-halógeno con filtros de interferencias y un foto multiplicador. The Synergy HT integra automáticamente la excitación del rayo de xenón y monocromador con la emisión del filtro de interferencia y el foto multiplicador ⁷.



Figura 4. Synergy HT lector de micro-plato multi detección

Los sistemas de detección de radiación de estos equipos, varían según el selector de longitud de onda utilizado. Por ejemplo, en el equipo descrito anteriormente, se utilizó para la detección un espectrofotómetro. Estos son dispositivos que utilizan un sistema de monocromación para la obtención de espectros y permiten realizar la detección secuencial de varios componentes. No obstante también pueden utilizarse fotómetros en la realización de análisis clínicos de rutina. Estos últimos presentan como ventaja su sencillez, resistencia y bajo costo. Tanto los fotómetros como los espectrofotómetros pueden ser de haz sencillo o de doble haz. Además en la actualidad existen instrumentos de canales múltiples, con los cuales se puede obtener un espectro completo y una detección simultánea.

**en diseños de espectrofotómetros mediante
procesamiento computarizado de imágenes.**

Recientemente, se han empleado componentes opto electrónicos en la configuración de sistemas espectroscópicos clásicos, que hacen del mismo un equipo portátil, robusto y de fácil traslado a campo. Se ha reportado⁸⁻¹² el uso de diodos de emisión de luz (Leds) o pantallas de computadoras como fuente de excitación y recientemente la utilización de cámaras web como detectores de la radiación. La combinación entre el uso de fuente de excitación de pantallas de computadoras y cámaras web como sistemas de detección se ha denominado como la técnica *computer screen photo-assisted technique* (CSPT). Esta resulta una propuesta muy atractiva en la realización de ensayos espectroscópicos.

En el 2003, Filippini y colaboradores⁸, desarrollaron una plataforma para una micro placa de 96 celdas en combinación con una pantalla de un ordenador programable como fuente de luz convencional y una cámara web como se observa en la figura 5. Este sistema se utilizó para detectar compuestos en el plasma sanguíneo como la droga formoterol, evaluar ensayos basados en melanóforos, así como el seguimiento de la melatonina y los efectos de MSH.

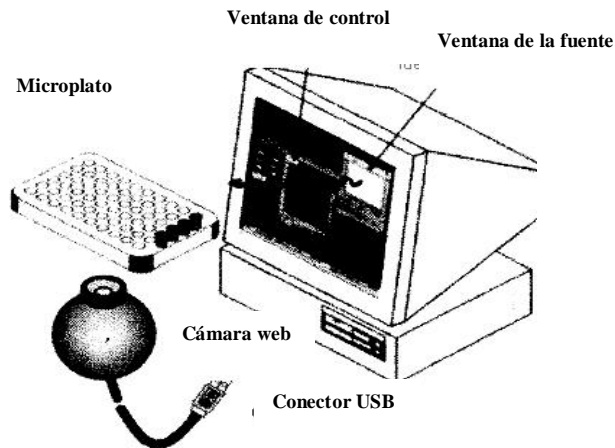


Figura 5. Diagrama de CSPT con un micro plato.

laboradores⁹, desarrollaron un modelo de redes neuronales artificiales para determinar simultáneamente Al (III) y Fe (III) en aleaciones utilizando azul cromo S (CAS) como agente cromático. Estos autores reportan el uso de una cámara digital como detector en las reacciones colorimétricas, ofrece una vía de alto rendimiento en las mediciones analíticas desde el punto de vista cualitativo y cuantitativo. La información analítica en la cámara digital se procesa en tres canales de detección: rojo, verde y azul. Cada canal evalúa en un rango de 0 a 255 (8 bits) por color. La distribución espectral de la fuente de luz y la curva espectral reflejada del objeto analizado, juegan un papel importante en el color obtenido a través de cada canal. Para ellos el uso de las imágenes digitales incrementa la posibilidad de utilizar software de computadoras requiriéndose menor tiempo en el análisis en comparación con las técnicas espectrofotométricas convencionales.

En el 2005, Filippini y colaboradores¹⁰, utilizaron la técnica CSPT para detectar la unión de hebras de DNA complementario a un zwitterion luminiscente derivado del politiofeno. El complejo originado es una secuencia altamente específica de indicador, basado en un enlace no covalente de DNA soluble en agua, capaz de producir y combinar una señal absorción . emisión legible por CSPT.

Posteriormente, Filippini y colaboradores¹¹, realizaron un trabajo de caracterización de impresiones de varios colores sobre una hoja blanca utilizando una pantalla de computadora portátil como fuente de energía y una cámara web convencional como detector. El sistema utilizado se presenta en la figura 6, la pantalla ilumina las muestras contenidas en una plantilla de micro-pozos colocada a 45 grados respecto a esta y al plano de la cámara. La imagen de las muestras con sus diferentes colores se captura de forma sincronizada con la iluminación por una cámara web estándar, que tiene un detector CCD operando a una resolución de 320*240 píxeles. La iluminación y la configuración de la cámara son controlados por el programa de software Matlab ® que da un video de las muestras.

Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

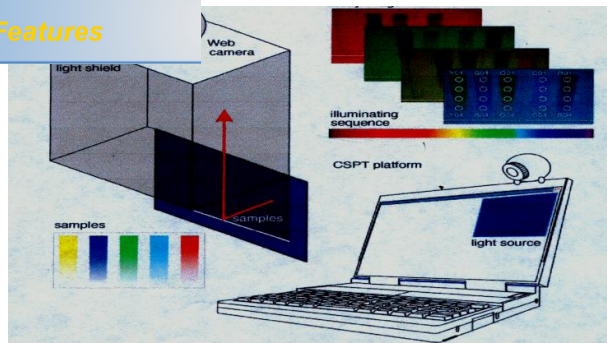


Figura 6. Esquema del CSPT

En el 2007, Alimelli y colaboradores¹², evaluaron cuantitativamente complejos para el caso de rojo vino utilizando la tecnología CSPT. Estos investigadores, desarrollaron un sistema de procesamiento de imágenes, ver figura 7, que funcionó como un espectrofotómetro, capaz de clasificar y reconocer sustancias de acuerdo a sus propiedades de absorción y emisión. La medida del color en estos equipos esta sujeta a tres filtros definidos, ellos son el canal rojo, verde y el azul de la cámara (RGB), dándole al equipo suficiente sensibilidad para detectar el cambio de color en una muestra.

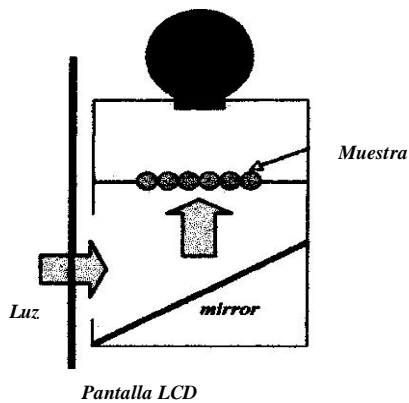


Figura 7. Esquema del montaje para las medidas de rojo vino.

tecnología opto-electrónica y procesamiento computarizado de imágenes, en el diseño de lectores de absorbancia

En el 2007, Castillo y colaboradores¹³, desarrollaron y evaluaron un analizador de absorbancia de multi- celdas para análisis clínicos. Éste equipo, (ver figura 8) se utilizó como un prototipo de lector de absorbancia portátil y de bajo costo, el cual consistió de un arreglo de diodos de emisión de luz (Leds), como fuente de excitación y una cámara web como detector. La fuente de excitación, ilumina el plato de 96 celdas y la cámara captura la imagen con 640 x 480 píxeles. Los datos se procesaron utilizando una computadora portátil mediante el programa Matlab 7.2.0.232 (R2006a) que fue diseñado en laboratorio, para obtener curvas de calibración y lecturas de concentración tanto de estándares como de muestras simultáneamente. Este sistema fue evaluado con diferentes series de soluciones: rojo neutro; complejo cobre- amonio (II) y naranja de metilo, con el fin de calibrar el sistema, desde la iluminación hasta la detección de la señal y aplicarlo a muestras clínicas.

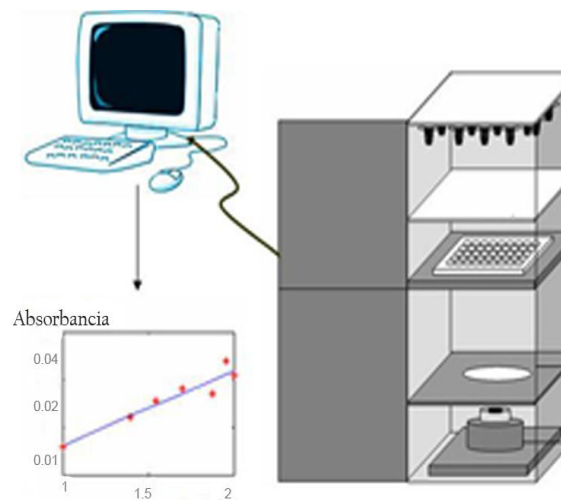


Figura 8. Esquema del prototipo de lector de absorbancia.

OS DEL PROYECTO.

De la revisión bibliográfica anterior se desprende que los equipos convencionales utilizados en análisis clínicos, suelen ser sofisticados, costosos, requieren de largos tiempo de análisis, además de personal especializado e infraestructura física adecuada. No obstante, estos equipos poseen alta capacidad para el procesamiento de un elevado número de muestras, lo cual es de vital importancia para la realización de dichos exámenes. Surge entonces la necesidad de diseñar dispositivos sencillos, robustos, portátiles y de coste relativamente bajo, que puedan ser utilizados en la realización de análisis clínicos de rutina. En tal sentido, recientemente, diversos investigadores han explorado el uso de diodos de emisión de luz (Leds) como sistemas de iluminación no convencionales y una cámara web digital como sistema de detección sobre celdas ELISA. Esto con la finalidad de evaluar la aplicación de la fotografía digital y de procesamiento computarizado de imágenes, en la construcción de nuevos diseños de los lectores de absorbancia. Los dispositivos con detección de cámara web se han utilizados en la determinación de ciertos compuestos químicos en suero sanguíneo, obteniendo resultados satisfactorios¹³. Sin embargo, su aplicación en análisis clínicos no ha sido lo suficientemente explotada, por tal razón, se justifica realizar todos los trabajos que permitan diseñar y validar estos equipos en aplicaciones clínicas.

El presente trabajo evaluó la aplicación de un analizador colorimétrico formado por un arreglo de diodos de emisión de luz y una cámara web para el análisis de muestras clínicas por la técnica ELISA. El analizador se utilizó en la determinación cuantitativa de glucosa y proteínas, mediante absorción molecular UV-visible, en muestras de plasma sanguíneo de ratas. Por otro lado, este dispositivo se construyó con componentes instrumentales simples, que facilita su traslado a lugares que son de difícil acceso, para equipos convencionales por su tamaño y elevado costo. Esto contribuye a diversificación de los análisis clínicos en zonas no urbanas.

Evaluar la eficiencia de un dispositivo colorimétrico en la determinación de glucosa y proteínas en muestras biológicas.

Objetivos específicos:

- 1.- Optimización del Sistema Colorimétrico
- 2.- Evaluar la eficiencia del Sistema:
 - 2.1 Realizar la calibración del Sistema utilizando indicadores químicos.
 - 2.2 Comparar la sensibilidad del Sistema Colorimétrico con respecto a un espectrómetro convencional.
- 3.- Establecer la correlación en la exactitud obtenida del Sistema Colorimétrico y un espectrómetro convencional.
- 4.- Aplicar el Sistema Colorimétrico a muestras reales de interés biológico.

6.1 Reactivos:

Se utilizaron los siguientes reactivos: sulfato de cobre penta-hidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) al 99% de pureza, naranja de metilo y Amarillo de alizarina R suministrados por la casa comercial Riedel - de Haën. También, fueron utilizados: un estándar de glucosa al 99% distribuido por la casa Merck, un Kit para la aplicación del método glucosa oxidasa de la casa Merck y kit reactivo de Lowry.

6.2 Soluciones

Se prepararon soluciones estándares de cobre (II) de 2000 ppm, naranja de metilo de 1000 ppm y amarillo de alizarina de 2000 ppm. Las soluciones de calibración se prepararon por dilución adecuada de las soluciones estándares. Para el naranja de metilo el intervalo de concentración fue de 25 a 250 ppm en medio ácido a pH 4; para el complejo cobre-amoniaco(II) el intervalo de trabajo fue entre 100 y 700 ppm. Estas soluciones fueron utilizadas en la calibración de los diferentes canales de detección RGB de la cámara web. También, se utilizaron soluciones estándares de albúmina sérica.

6.3 Muestra

Las muestras reales de suero fueron obtenidas en la sección de Bioquímica Médica del Instituto de Medicina Experimental, Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela.

6.4.1.- Sistema colorimétrico:

6.4.1.1.- Descripción del equipo

Se utilizó un sistema colorimétrico construido en el laboratorio de Espectroscopia Láser de la escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela, cuyo diagrama experimental se presenta en la figura 9. Este dispositivo es un equipo robusto, portátil que utiliza como fuente de excitación, una placa de bombillos fluorescentes (Leds) y una pantalla difusora, para iluminar homogéneamente la celda para análisis de ELISA, constituida por 96 micro . pozos cada uno de los cuales posee una capacidad de 150 μ L. El sistema de detección consiste de una cámara web (Mini Camp Pro GE 98067), con un detector CCD de 640x480 píxeles de resolución, que graba la imagen de la celda a 24 cuadros/seg.

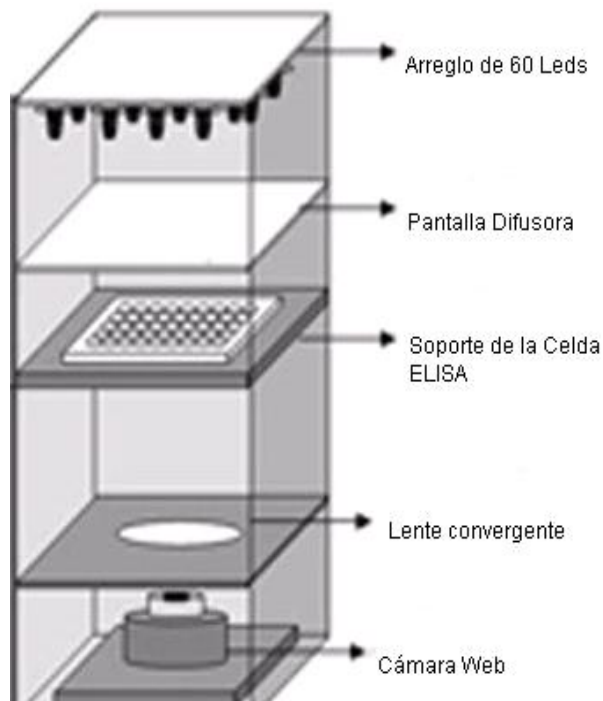


Figura 9. Esquema del diseño de un sistema colorimétrico para celdas ELISA

amiento del Sistema colorimétrico.

El proceso de medición de la absorbancia en el dispositivo utilizado, se lleva a cabo de la siguiente forma: la luz transmitida por cada micro-pozo crea una imagen que es capturada por la cámara web. El resultado es un video digital que se descompone en tres canales que corresponden a los colores primarios rojo, verde y azul (RGB). El espectro de absorción de cada filtro se presenta en la figura 10, el canal azul posee un máximo de absorción a una longitud de onda de aproximadamente 470 nm, mientras que los canales verde y rojo tienen un máximo de 540 y 630 nm respectivamente. La intensidad transmitida por cada pozo que contiene muestras, estándar o negro es capturada por cada color primario y la absorbancia se calcula mediante la ley de Beer.

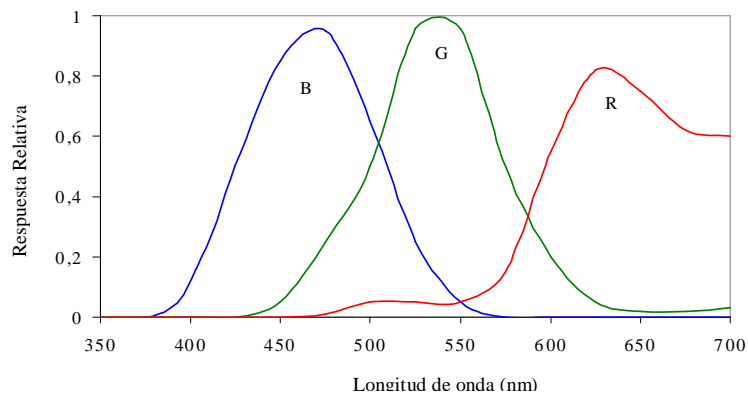


Figura 10. Espectro de los canales de filtros de la cámara web

El instrumento también cuenta con un software de fácil manejo para el cálculo de concentraciones de soluciones desconocidas denominado (SCC)¹⁴ diseñado en el laboratorio de Espectroscopia, que realiza la captura y el procesamiento digital de imágenes. El SCC inicialmente crea una plantilla de los pozos de la celda ELISA, mediante detección manual o automática (ver figura 11 y 12), que se origina por el uso filtro gausseano, algoritmo de Canny y el algoritmo de Hough, permitiendo que se transformen las imágenes capturadas en superficies de respuesta de intensidades para cada color al que responde los filtros de la cámara.

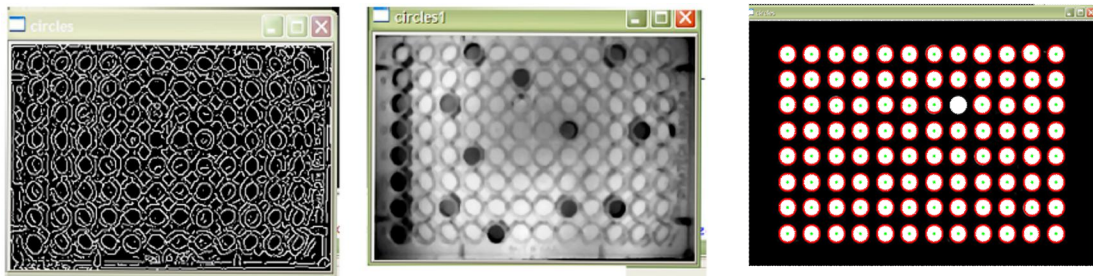


Figura 11. Detección automática utilizando a.-Algoritmo de Canny b.- Algoritmo de Hough

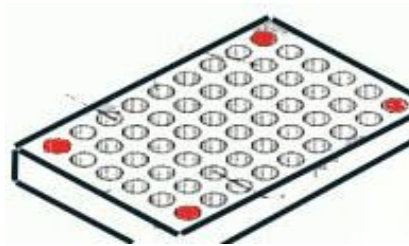


Figura 12. Detección manual al seleccionar los bordes de la placa ELISA

Posteriormente, a partir de fundamentos analíticos como interpolación lineal, algoritmo para el cálculo de mínimos cuadrados y error estándar en la estimación, se calcula la absorbancia y la concentración de un punto en particular de la imagen al compararlo con una referencia, generando las curvas de calibración de una determinada sustancia en cualquier pozo de la celda ELISA. (ver figura13). El SCC permite guardar cada experimento al generar un informe en PDF donde muestra los valores de absorbancia y de concentraciones de cada pozo en cada filtro de la cámara web.

Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

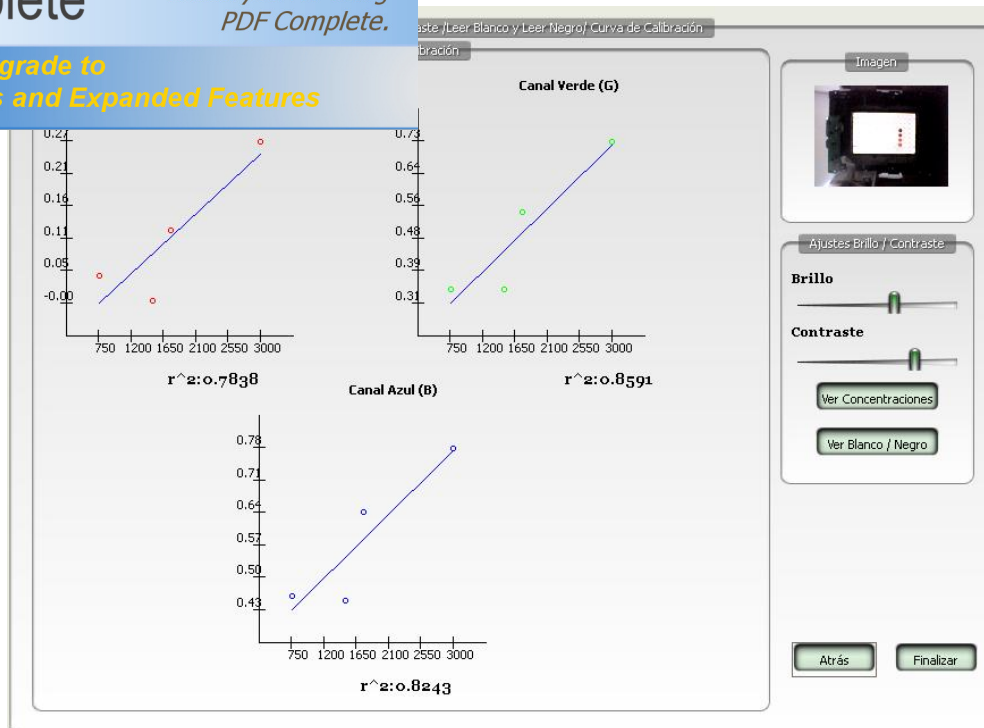


Figura 13. Diseño del software utilizado en el sistema colorimétrico para celdas ELISA

6.4.2 Espectrómetro Ocean Optic

Se utilizó un espectrómetro convencional Ocean Optics, modelo USB 2000, como equipo de referencia para validar los resultados obtenidos por el analizador. Este espectrómetro, consta de un monocromador Czerny-Turner cruzado simétrico de 42 mm de distancia focal de entrada y 68 mm de salida; red de 300 líneas mm^{-1} , reforzado a 500 nm y rango espectral entre 300 y 1100 nm. El detector consiste de un dispositivo de carga acoplado (CCD) de silicio, modelo Sony ILX511, de 2048 píxeles, rango espectral entre 200 y 1100 nm, sensibilidad de 75 fotones/cuentas a 400 nm y 41 fotones/cuentas a 600 nm.

7.1.- Optimización del Sistema Colorimétrico.

A partir de las soluciones coloreadas: naranja de metilo y complejo de cobre hexa-amoniacal; y las soluciones patrones de glucosa y de proteínas se realizó la calibración del equipo con el fin de ajustar el sistema de iluminación, detección y procesamiento del sistema colorimétrico. Según el color de las soluciones, se escogió el canal RGB donde ellas absorben. Por ejemplo, se utilizó el canal verde, para la solución de naranja de metilo, ya que esta presenta máximo de absorción que se encontró a 484nm al utilizar el espectrómetro, su banda espectral se extiende justo en el intervalo de longitudes de onda dentro del canal mencionado. En base a este criterio se recogen las medidas de absorbancia en el canal adecuado dependiendo del color de la muestra que se desea analizar por el sistema colorimétrico. La calibración de cobre hexa -amoniacal se midió utilizando el canal rojo, para la glucosa el canal verde y para las proteínas utilizando el canal rojo. Todos los datos fueron procesados por el software SCC, que mostró la concentración de las especies según el canal de color correspondiente.

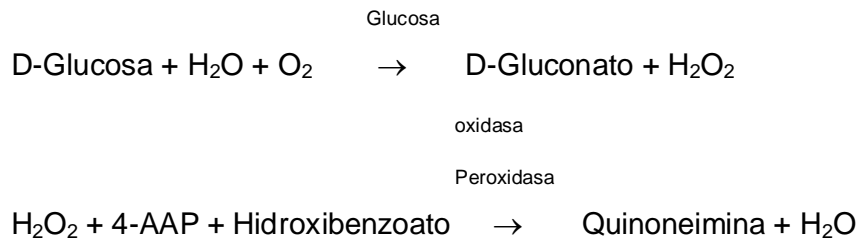
7.2.- Obtención y preparación de la muestra.

Ratas de la cepa Sprague. Dawley con un peso de 200 ± 20 g, se mantuvieron en ayuna de 24 horas y luego fueron sometidas al siguiente tratamiento: inicialmente, se anestesiaron con pentobarbital sódico (30 mg/kg de peso) y se tomó la primera muestra de sangre de la cola, que sirve como muestra de referencia. Luego mediante una sonda gástrica se suministro glucosa (1g/Kg de peso) en el estomago del animal. Posteriormente se tomaron muestras de sangre cada 30 min por 2 horas utilizando capilares heparinizados, se centrifugaron para separar el plasma con el cual se determinó la glucosa por el método de glucosa oxidasa / peroxidasa y proteínas por el método de Lowry.

7.3.1.- Método de Glucosa-Oxidasa

Para la determinación cuantitativa de glucosa en sangre, se utilizó el método glucosa oxidasa enzimática . colorimétrica. Este método emplea glucosa oxidasa que cataliza la oxidación de glucosa a peróxido de hidrógeno y ácido glucónico ¹⁵ y una modificación de la reacción de color de Trinder ¹⁶ catalizada por la enzima peroxidasa. En presencia de peroxidasa, la 4-aminoantipirina (4-AAP) e hidroxibenzoato es oxidada por el peróxido de hidrógeno para dar una coloración roja debido a la formación de quinoneimina, cuya longitud de onda de absorción esta entre 500-520 nm. La intensidad de color de la reacción es proporcional a la concentración de glucosa en la sangre.

El ensayo de la glucosa oxidasa se basa en la siguiente reacción:



El método de glucosa oxidasa . peroxidasa es una determinación indirecta de glucosa a partir de la formación de la quinoneimina. El reactivo de glucosa enzimática cuyos componentes se presentan en la tabla 1, en forma de polvo seco se disolvió lentamente sin agitar en agua destilada en un volumen según lo indicaba la etiqueta del frasco. Una vez separado el plasma de la sangre se congeló hasta el día del análisis.

s de los componentes de solución del reactivo.

Componentes	Concentración
Buffer fosfato	pH 7,5 ± 0.1
4-Aminoantipirina (4-AAP)	0,38 mM
p-Hidroxibenzoato de sodio	10 mM
Glucosa oxidasa	≥ 15 μ/ ml
Peroxidasa	≥ 1,2 μ/ ml
Azida de sodio	0,1%

Las muestras extraídas de la rata y los patrones de glucosa se trataron siguiendo las especificaciones indicadas en la tabla 2; luego se mezclaron bien y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 510 nm empleando los sistemas de medida: Colorimétrico y Ocean Optic. Los resultados de absorbancia se utilizaron para construir las curvas de calibración y posterior elaboración de las curvas de tolerancia a partir de las concentraciones de glucosa determinadas.

Tabla 2. Especificaciones de las mezclas a utilizar.

Sustancia	Cantidad
Muestra real	1,0 ml de reactivo + 10 μl de muestra
Patrón	1,0 ml de reactivo + 10 μl de patrón
Blanco	1,0 ml de reactivo

La determinación de la glucosa, se llevó a cabo mediante la siguiente ecuación a partir de un punto

$$\frac{A_m}{A_p} \times C_p$$

C_p: Valor del patrón de glucosa en mg L⁻¹.

A_m: Absorbancia de la muestra

A_p: Absorbancia del patrón.

Proteínas totales en plasma de ratas.

Generalmente, en química clínica se realiza este examen que permite cuantificar la cantidad total de dos clases de proteínas: albúmina y globulina. Con el fin de constatar, si un paciente sufre de una enfermedad hepática, de una enfermedad renal o si no hay una absorción suficiente de proteína por parte del organismo³.

La determinación de proteínas totales en plasma de ratas se realizó por una modificación del método de Lowry¹⁷, empleando albúmina sérica bovina como estándar como se esquematiza a continuación:

Tabla 3. Especificaciones para curva de calibración de proteínas.

Albúmina estándar (l)	Agua destilada (l)	Cantidad de albúmina (g)	Reactivo de Lowry	Reactivo de Folin-Ciocalteu
0	500	0		
25	475	12,5		
50	450	25	todos 1,5 mL esperar 10 min	todos 150 L
75	425	37,5		
100	400	50		

*Contiene 500 µg de albúmina / ml

Se agregó el reactivo de Lowry (solución A +B en proporción 100:1), donde A contiene: Na₂CO₃ 2%; NaOH 0.4% y SDS 1% y B es CuSO₄.H₂O al 4%. Al añadir el reactivo de Lowry se agitó y luego de 10 min, se agregó 150 l del reactivo de Folin diluido (1:1) con agua, se agitó nuevamente y transcurrido 45 min se midió la absorbancia a 660 nm.

Sistema colorimétrico en la determinación de glucosa y proteínas en plasma de ratas.

La aplicación del sistema colorimétrico se evaluó mediante la determinación de concentraciones de glucosa y proteínas en muestras de plasma, según el método de glucosa oxidasa y el método de Lowry, descritos en la sección 7.3 y 7.4, respectivamente.

Para la validación del Sistema colorimétrico, se analizaron simultáneamente las muestras para la estimación de la glucosa y proteínas, por un espectrofotómetro simultáneo convencional, modelo Ocean Optics. Los resultados obtenidos entre ambos equipos fueron comparados y se establecieron las correlaciones respectivas.

8.1.- Calibración del sistema colorimétrico.

Las curvas de calibración utilizadas para el sistema colorimétrico, fueron construidas a partir de una serie de estándares de naranja de metilo, de cobre amoniacal, glucosa y proteínas comprendidas en el intervalo lineal de trabajo específico de cada solución.

8.1.1.- Soluciones coloreadas.

La figura 14, presenta las curvas del complejo de cobre amoniacal, obtenida al medir la señal de absorbancia en los tres canales del detector CCD (RGB) de la cámara web. Se observa claramente el comportamiento lineal en la señal de absorbancia obtenida por el canal rojo. Para el canal verde, la absorbancia aumenta a medida que aumenta la concentración en el rango desde 100 a 500 mg/L. En el canal azul, la señal de absorbancia es cero, por lo que el complejo no absorbe en esta zona espectral.

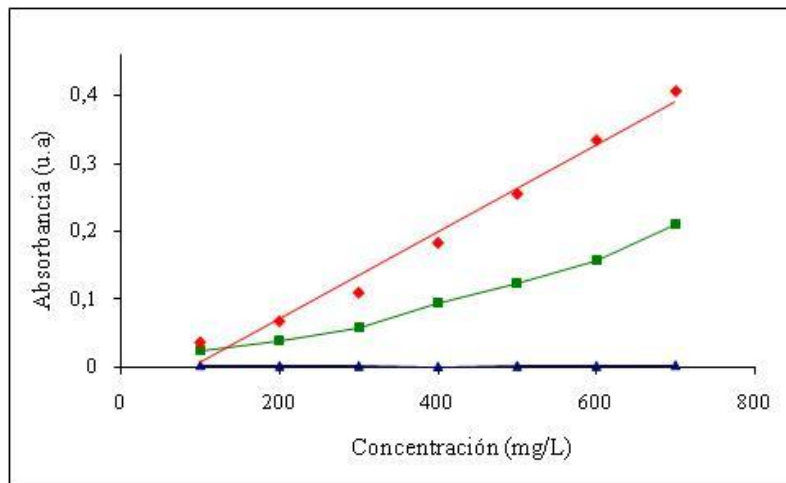


Figura 14. Curva de calibración para complejo de cobre amoniacal obtenida por la señal de absorbancia con el canal rojo (♦), verde (■) y azul (▲)

[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

alizamos naranja de metilo podemos observar que la solución absorbe tanto en el canal verde como en el azul, pero la mejor linealidad y sensibilidad corresponde al canal verde, mientras que en el rojo la señal es independiente de la concentración, dado que la solución no absorbe en esta zona espectral.

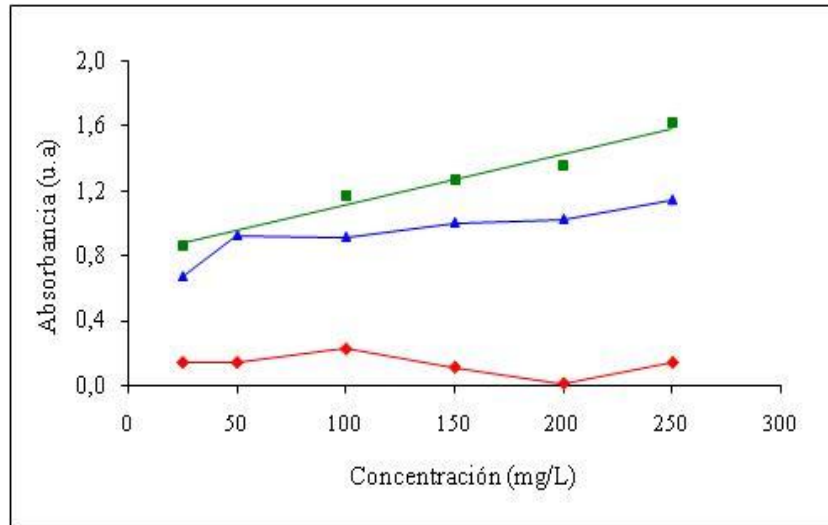


Figura 15. Curva de calibración para Naranja de Metilo obtenida por la señal de absorbancia con el canal rojo (♦), verde (■) y azul (▲)

Los resultados obtenidos para los tres canales CCD, a partir de las soluciones utilizadas se pueden explicar mediante sus espectro de absorción (ver figura 16 y 17) ya que el máximo de absorbancia para el complejo de cobre amoniacal se alcanza a una longitud de onda de 640 nm, que corresponde al intervalo espectral del canal rojo, mientras que la solución de naranja de metilo presenta su máximo de absorbancia a una longitud de 484 nm,

Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

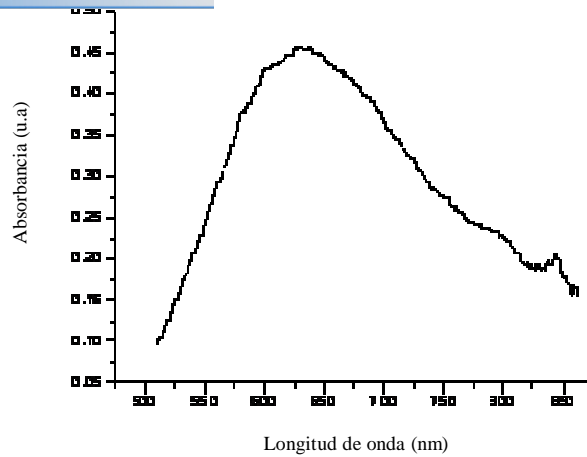


Figura 16. Espectro de absorción Complejo de cobre amoniacal (B) obtenido usando un espectrómetro convencional.

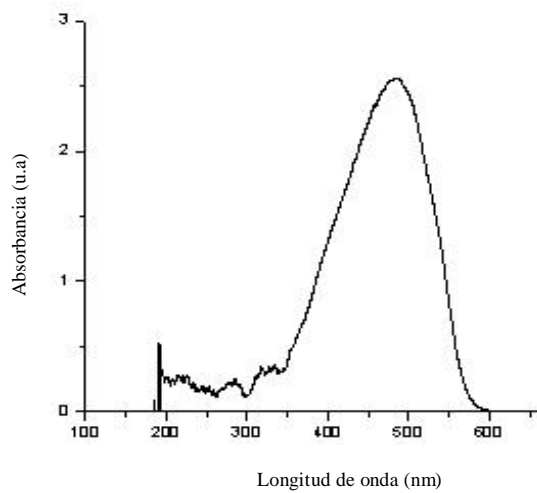


Figura 17. Espectro de absorción para naranja de metilo (A), obtenido usando un espectrómetro convencional.

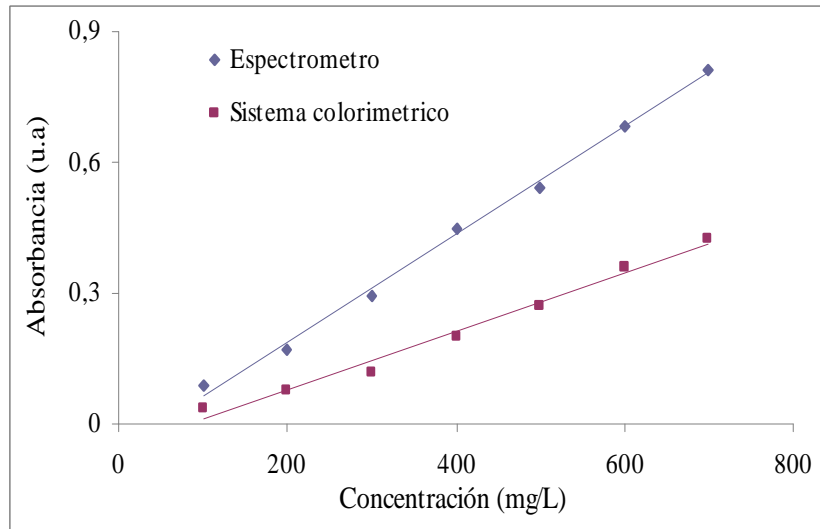
En la tabla 4 se observan los parámetros analíticos obtenidos de la calibración del sistema colorimétrico y del espectrómetro convencional, al utilizar las soluciones de naranja de metilo (anaranjado) y cobre amoniacal (color azul). Se observa que la principal diferencia entre los sistemas evaluados es la sensibilidad entre los equipos. Según los valores de la pendiente, el sistema colorimétrico es menos sensible que el equipo convencional, en un factor de dos para el complejo de cobre y de tres para el naranja de metilo. Esto ya ha sido reportado previamente en un trabajo realizado en la calibración de este sistema¹³, donde se atribuye la baja sensibilidad, al hecho de que la cámara Web no es selectiva en la longitud de onda de medición de la absorbancia, sino que utiliza radiación policromática del canal CCD de preferencia de la cámara web, en comparación con la radiación monocromática que selecciona el espectrómetro convencional. Respecto a la linealidad de la curva se observa que ambos sistemas presentan un elevado coeficiente de correlación, de igual forma se obtiene una precisión similar en ambos equipos ya que presentan igual error típico.

Tabla 4. Parámetros analíticos para las soluciones coloreadas: 1) Naranja de metilo
2) Cobre amoniacal

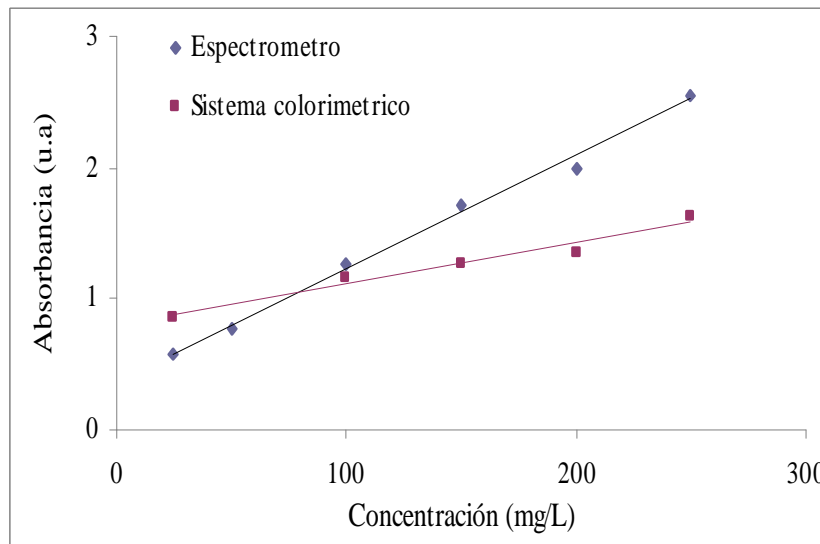
1	<i>Intervalo de Trabajo (mg L⁻¹)</i>					
	<i>Equipo</i>	<i>a (mg⁻¹ L)</i>	<i>b</i>	<i>S_{y/x}</i>	<i>R²</i>	
	<i>Sistema colorimétrico</i>	$(3,2 \pm 0,3) \times 10^{-3}$	$0,80 \pm 0,05$	$0,06$	$0,9676$	
						25-250
	<i>Espectrómetro</i>	$(8,0 \pm 0,3) \times 10^{-3}$	$0,36 \pm 0,05$	$0,06$	$0,9939$	
2	<i>Intervalo de Trabajo (mg L⁻¹)</i>					
	<i>Equipo</i>	<i>a (mg⁻¹ L)</i>	<i>b</i>	<i>S_{y/x}</i>	<i>R²</i>	
	<i>Sistema colorimétrico</i>	$(6,7 \pm 0,3) \times 10^{-4}$	$-0,06 \pm 0,02$	$0,02$	$0,9868$	
						100-700
	<i>Espectrómetro</i>	$(12,4 \pm 0,3) \times 10^{-4}$	$0,06 \pm 0,02$	$0,02$	$0,9963$	

[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

Las curvas de calibración obtenidas al utilizar un espectrometro convencional y el sistema colorimétrico para el complejo de cobre amoniacal (1) y el naranja de metilo (2) usando las mismas soluciones estándar en ambos equipos.



1



2

Figura 18. Réplicas de las curvas de calibración obtenida: 1.- complejo de cobre amoniacal; 2.- Naranja de Metilo

Se realizó la curva de calibración del sistema colorimétrico (figura 19), con soluciones estándares de glucosa en un intervalo comprendido entre 750-3000 mg/L y de tal forma comparar los resultados obtenidos con el sistema propuesto respecto al espectrómetro convencional a una longitud de onda de 510 nm. Se observa que el sistema colorimétrico presenta una sensibilidad ligeramente inferior al espectrómetro convencional. No obstante, si se comparan los parámetros de la curva de calibración de ambos equipos, ver tabla 5, se observa que estos poseen el mismo intervalo dinámico lineal y valores similares del error típico de la curva y el coeficiente de correlación. Estos resultados indican que el sistema colorimétrico es comparable al espectrómetro convencional.

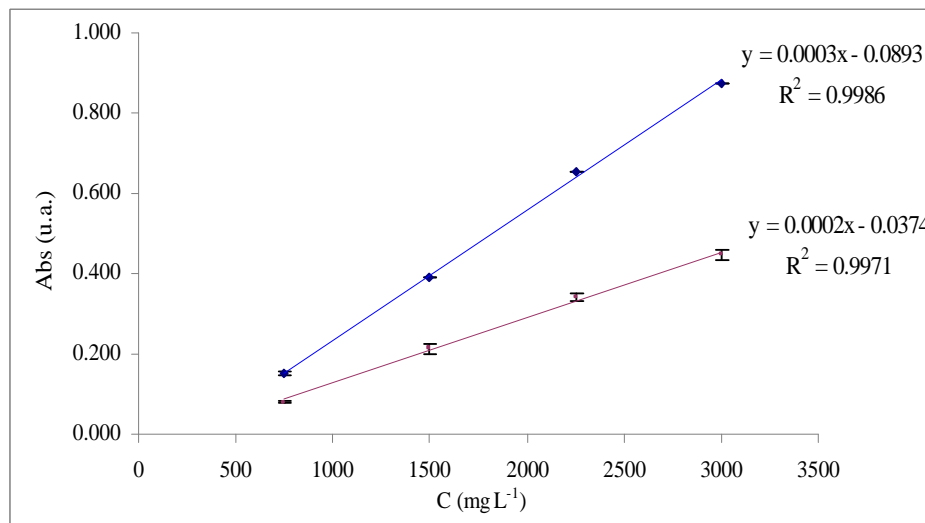


Figura 19. Curva de Calibración de Glucosa obtenida con los dos sistemas de medición de absorbancia

la curva de calibración, obtenidos por ambos sistemas de medición

Equipo	a (mg ⁻¹ L)	b	S _{y/x}	R ²	Intervalo de Trabajo (mg L ⁻¹)
Sistema colorimétrico	(2,00 ± 0,06) × 10 ⁻⁴	-0,04 ± 0,01	0,011	0,9971	750-3000
Espectrómetro	(3,00 ± 0,09) × 10 ⁻⁴	-0,09 ± 0,02	0,014	0,9986	

8.1.3.- Calibración de proteínas

Se realizó la calibración del sistema colorimétrico para la determinación de proteínas, utilizando soluciones estándares en un intervalo de trabajo comprendido entre 0 y 50 g y a una longitud de onda de 680 nm, como se explica en la sección 7.4. En la figura 20, se presentan las curvas de calibración obtenidas por ambos equipos, en ella podemos observar que la menor sensibilidad es para el sistema colorimétrico. Sin embargo, los parámetros de dicha calibración indican según tabla 6, que para el mismo intervalo dinámico lineal, los valores de error típico son iguales con similar coeficiente de variación. Esto indica que el sistema colorimétrico es comparable al espectrómetro convencional cuando se realiza la calibración de proteínas.

Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

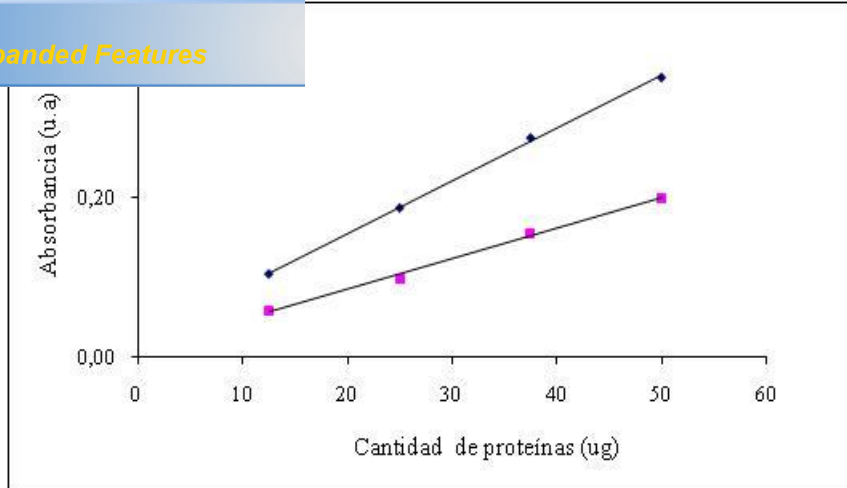


Figura 20. Curva de calibración de proteínas obtenidas por ambos equipos.

Tabla 6. Parámetros analíticos de la curva de calibración, obtenidos por ambos sistemas de medición

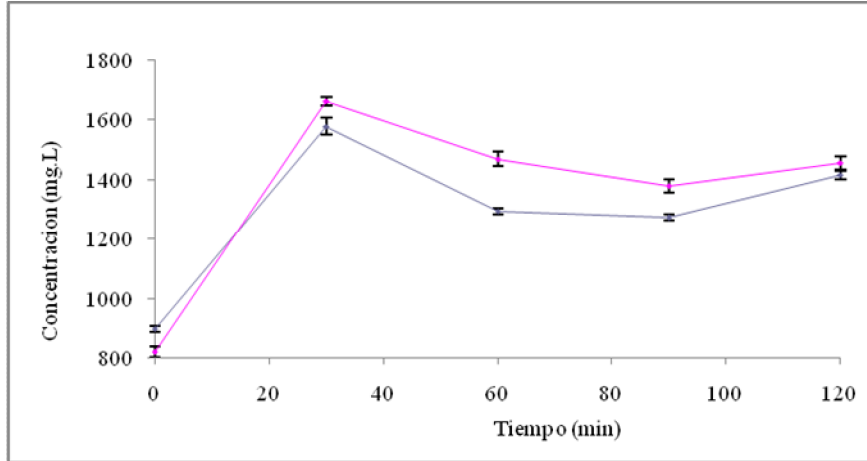
Equipo	$a (g^{-1})$	b	$S_{y/x}$	R^2	Intervalo de Trabajo (g)
Sistema colorimétrico	$(4 \pm 2) \times 10^{-3}$	$0,09 \pm 0,01$	0,004	0,9969	0-50
Espectrómetro	$(6,6 \pm 0,1) \times 10^{-3}$	$0,023 \pm 0,005$	0,004	0,9992	

En todos los casos de calibración: soluciones coloreadas, glucosa y proteínas observamos que la sensibilidad del sistema colorimétrico es menor que la obtenida por el espectrómetro convencional. La baja sensibilidad, se debe al hecho de que la cámara Web no es selectiva en la longitud de onda de medición de la absorbancia, sino que utiliza radiación policromática del canal CCD de preferencia de la cámara, en comparación con la radiación monocromática que selecciona el espectrómetro convencional. Respecto a la linealidad de la curvas se observa que ambos sistemas presentan un elevado coeficiente de correlación, de igual forma se obtiene una precisión similar en ambos equipos ya que presentan igual error típico en todos los casos estudiados.

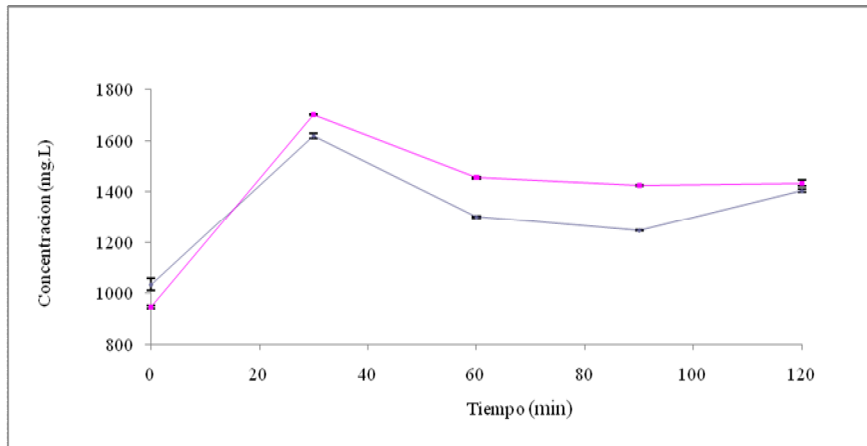
Colorimétrico en la determinación de glucosa.

Como parte de la aplicación analítica se determinó la curva de tolerancia a la glucosa¹⁸, la cual es un examen clínico que mide la capacidad del cuerpo para metabolizar la glucosa. Esta prueba sirve para diagnosticar diabetes mellitus y otros trastornos como Intolerancia a la glucosa e hipoglucemia reactiva.

En la figura 21, se presenta la curva de tolerancia a la glucosa de dos réplicas de una misma muestra de plasma sanguíneo, obtenida de dos animales diferentes. Las mediciones fueron realizadas tanto con el dispositivo propuesto como con el espectrómetro convencional. En todos los casos, se observa la tendencia típica del proceso de absorción intestinal de la glucosa¹⁹, el cual se inicia con una baja concentración del analito, que corresponde a la muestra sanguínea tomada en ayuno. Posteriormente, se observa un máximo en la concentración, originado por la cantidad conocida de glucosa que se le suministro vía oral al animal provocando un incremento en la concentración de este compuesto. Finalmente, se observa una disminución en la concentración debido a la entrada de la glucosa a las células del animal. Con respecto a la precisión del análisis, podemos observar que el sistema colorimétrico presenta una mayor dispersión en los datos con respecto al espectrómetro convencional, ver figura 21, cuando la determinación de la glucosa se realiza mediante el método de curva de calibración. El sistema colorimétrico es menos preciso que el convencional, debido a que la medición de la señal analítica se realiza por comparación entre imágenes digitalizadas de la muestra coloreada y la muestra de referencia; mientras que en el otro equipo, la medición se realiza con un sistema de monocromación y detección calibrado.



1



2

Figura 21. Réplicas de las curvas de tolerancia de glucosa obtenida: 1.- sistema colorimétrico; 2.- Espectrómetro

[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

comparan los niveles de glucosa obtenidos por ambos sistemas de medición, usando dos métodos de cuantificación: curva de calibración y método estándar descrito en la sección (8.3.1). En todos los casos, se observa que los resultados obtenidos en la concentración de glucosa a lo largo del tiempo, siguen la tendencia de una curva de tolerancia de la glucosa en un paciente no diabético. Esto es según la organización de la diabetes los niveles de glucosa son los siguientes: en ayunas la concentración debe estar entre 600 a 1000 mg L⁻¹, posteriormente durante 60 minutos la concentración debe estar por debajo de 2000 mg L⁻¹ y a 120 minutos debe ser inferior a 1400 mg L⁻¹. Entre 1400 y 1999 mg L⁻¹, se considera que existe intolerancia a la glucosa y es un grupo que tiene mayor riesgo de desarrollar diabetes. Mientras que los niveles por encima de 2000 mg L⁻¹ indican un diagnóstico de diabetes¹⁸. De acuerdo a los resultados obtenidos entre 700 y 2000 mg/L de concentración de glucosa, no hay evidencias patológicas de diabetes ni algún otro tipo de alteración en la glicemia de los animales estudiados. En cuanto a la precisión, el coeficiente de varianza estuvo entre 2 y 11% para el método de curva de calibración y entre 3 y 11 % para el método estándar. La relación entre el valor encontrado por cada sistema nos permite hablar de exactitud que estuvo en un intervalo entre 1 y 8 %, por tanto, el sistema colorimétrico fue validado en la determinación de glucosa en plasma sanguíneo de ratas.

Tabla 7. Concentraciones de glucosa encontrada por ambos equipos

Concentración normal de glucosa (mg.L⁻¹)	Concentración (mg.L⁻¹) Sistema colorimétrico	Concentración (mg.L⁻¹) Espectrómetro
Ayuna = 600-1000	897	979
60 min después < 2000	1619	1658
120 min después < 1400	1381	1376

Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

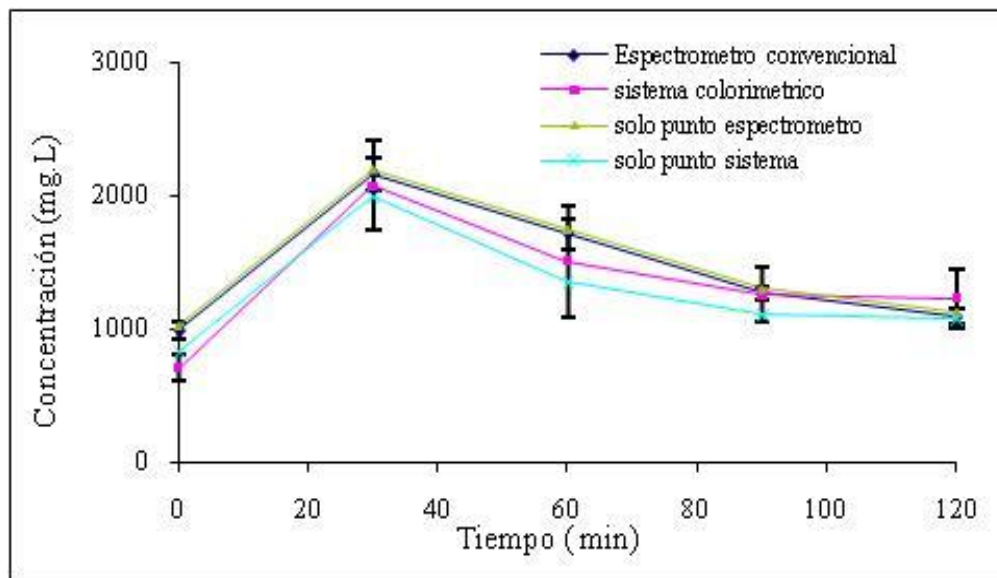
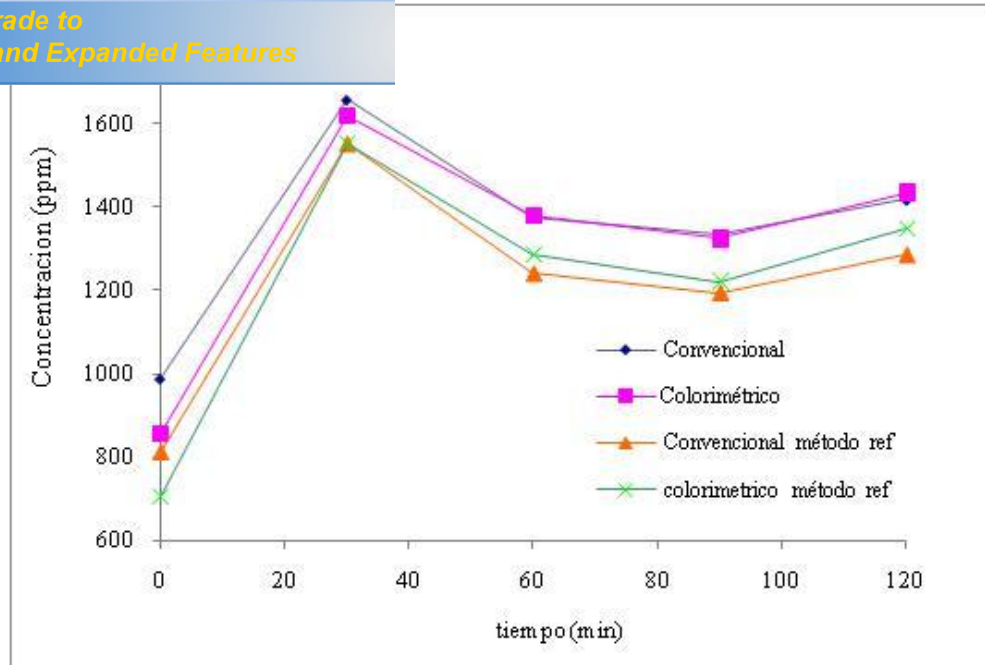


Figura 22. Curvas de tolerancia de glucosa obtenidas por el método de referencia y por curva de calibración.

Colorimétrico en la determinación de proteínas totales en plasma sanguíneos de ratas.

En la tabla 7, se presenta la concentración de proteínas totales expresada en gramos por cada 100 mL de solución, obtenida de dos animales diferentes. Las mediciones fueron realizadas con los dos sistemas de medición utilizados. Al comparar las dos medias experimentales, podemos ver que para el animal 1 existen diferencias significativas al nivel del 5 %. Mientras que para el animal 2 no existen diferencias significativas, porque la prueba t para 6 grados de libertad nos indica que ambos métodos sistema colorimétrico y el espectrómetro convencional proporcionan el mismo resultado. En cuanto a precisión el sistema colorimétrico tiene mayor dispersión en los datos, al tener mayor desviación estándar y coeficiente de variación entre 7 y 8%, mientras que el espectrómetro convencional tiene un coeficiente de variación menor entre 4 y 6 %.

En todos los casos de la tabla 7, se observa que la concentración de proteínas totales esta dentro del rango normal establecido¹⁹, el cual indica que el intervalo normal de proteínas es de 6,4 a 8,3 g por cada 100 mL de solución. Con estos resultados los animales estudiados no presentan enfermedades renales, del hígado ni mal absorción intestinal que son los posibles diagnósticos cuando los niveles de proteínas se encuentran fuera del rango normal⁴, por tanto el sistema colorimétrico fue validado en la determinación de proteínas totales en plasma sanguíneo.

Tabla 8. Parámetros analíticos de la concentración de proteínas en plasma, obtenidos por ambos sistemas de medición

Equipo	Concentración (g/100mL)	Coficiente variación (%)	Prueba t al 95%	Número de replicas
Sistema col.	6,6 ± 0,6	7	$t_{exp} = 2,5$	6
Espectrómetro	7,0 ± 0,3	4	$t_{teo} = 2,45$	6
Sistema col.	8,02 ± 0,8	8	$t_{exp} = 0,32$	6
Espectrómetro	8,01 ± 0,5	6	$t_{teo} = 2,45$	6

Rango normal de concentración de proteínas totales establecido⁵ es = 6,4 a 8,3 g/100 mL

en la determinación de glucosa.

La glucosa se determinó mediante la utilización de dos equipos diferentes: el espectrómetro y el sistema colorimétrico.

Para observar la correlación que existe entre ellos se construyó una curva de correlación (ver figura 23), donde se obtuvo un valor de pendiente de 1,16 y un $R^2=0,97$, lo que indica que existe muy buena correlación entre las medidas realizadas por ambos equipos ya que la pendiente dio un valor muy cercano a 1, que es el valor que garantiza que tan buena es la relación de medida por ambos métodos. Con estos resultados el sistema colorimétrico se puede utilizar para determinar glucosa y realizar cualquier análisis clínico donde los intervalos normales son amplios, siendo este un equipo de componentes económicos, robusto, sencillo y que es de fácil uso cuando no se requiere de alta sensibilidad como es el caso de la determinación de glucosa en plasma.

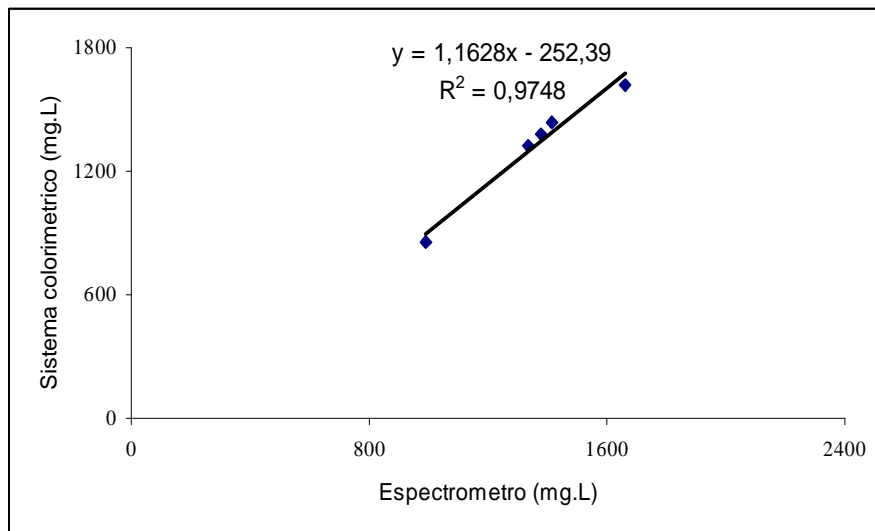


Figura 23. Curva de correlación de 2 métodos: Espectrómetro y del Sistema colorimétrico para la determinación de glucosa.

COLORIMÉTRICO PROPUESTO

El tiempo de análisis en el sistema colorimétrico es mucho menor en comparación al que se requiere en un espectrómetro convencional, ya que la placa ELISA utilizada en el equipo propuesto permite analizar 96 muestras en aproximadamente 3 min, mientras, que en el espectrómetro convencional analizar una muestra requiere un tiempo aproximado de 3 min como máximo, dependiendo del operado. Ese tiempo multiplicado por 96 muestras da 278 min, lo que nos indica que nos tardamos 92 veces mas en analizar 96 muestras con un espectrómetro convencional, que lo que tardaríamos en analizarlas con el sistema colorimétrico.

El sistema colorimétrico permite utilizar placas ELISA con pozos de mayor capacidad, que facilitan la reacción colorimétrica directamente en la placa, sin necesidad de trasvasar la(s) muestra(s) de tubos de ensayo a la placa, para medir in situ, una vez que transcurre el tiempo de reacción.

El software que posee el sistema colorimétrico evaluado a diferencia de otros equipos espectrofotométricos permite medir y construir la curva de calibración en cualquier posición de la celda ELISA. Además se puede medir más de una curva y varias muestras simultáneamente utilizando una única placa.

Se desarrolló un sistema colorimétrico para la medición de absorbancia, con sistema de detección de imágenes por cámara Web y un software amigable que provee una solución de bajo costo, fácil manipulación que no requiere de personal con entrenamiento especializado. Además permite ajustar la calibración en tiempo real, facilitando la configuración del análisis.

El sistema colorimétrico utiliza los filtros digitales de los colores primarios RGB de la cámara como selectores de longitudes de ondas con el fin de evaluar la absorbancia en rango visible del espectro.

La sensibilidad del sistema colorimétrico siempre fue menor en comparación con la registrada con un espectrómetro convencional.

El sistema propuesto se validó en la determinación de glucosa en plasma sanguíneo de ratas. Los resultados obtenidos estuvieron entre 700 y 1700 mg L⁻¹ con una precisión entre el 2 y el 9% para la rata 1; entre 700 y 2200 mg L⁻¹ con una precisión entre el 3 y 11 % para el animal 2 y entre 1000 y 2600 mg L⁻¹ con una precisión entre 2 y 11% para el animal 3 . Se demostró la exactitud del sistema colorimétrico, ya que los valores suministrados por este dispositivo en la determinación de glucosa, estuvieron acordes con los obtenidos por el sistema convencional.

El sistema colorimétrico se validó en la determinación de proteínas en plasma de ratas. Los resultados obtenidos fueron 6,6 g. 100 mL⁻¹ para el animal 1 y 8,2 g. 100 mL⁻¹ para el animal 2, los cuales se encuentran dentro establecido, para no padecer enfermedad por deficiencia de proteínas en el organismo con una precisión de 7-8% del sistema evaluado.



*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

Utilizar celdas ELISA con pozos de mayor capacidad que aumente el camino óptico aumentando a su vez la señal analítica registrada que es proporcional a la concentración del analito que se desea determinar.

Utilizar celdas ELISA con pozos de mayor capacidad que permitan realizar la reacción colorimétrica directamente sobre la placa, es decir, in situ con el fin de mejorar la sensibilidad del análisis al momento de tratar la muestra.

- [1] Christopher K., Van Holde E., *Enciclopedia Microsoft® Encarta®*, BIOQUIMICA 2da Edición, Mc Graw-Hill, 1998.
- [2] Lozano J.A, *Bioquímica para Ciencias de la salud*, Editorial Mc Graw-Hill. Segunda Edición España. 1996.
- [3] [http// www.Esp.Wikipedia. Com](http://www.Esp.Wikipedia.Com)
- [4] Universidad de la Habana, Facultad de Biología. *Regulación de la utilización y oxidación de la glucosa*
- [5] Iovine. E, Selva. A. *El Laboratorio en la clínica*. Editorial Médica Panamericana. Segunda Edición . Argentina 1979.
- [6] Skoog, D. *Química analítica*. Editorial Mc Graw-Hill. Septima edición Mexico 2001.
- [7] P. Held, L. Buehrer. *The Synergy™ HT A Unique Multi- Detection Microplate Reader for HTS and Drug Discovery*. Bio . Tek Instruments.
- [8] D. Filippini, S. Svenson, I.Lundstrom, *Microplate based biosensing with a computer screen aided technique* *Biosensors and Bioelectronics* 19, 35 - 41 (2003).
- [9] N.Maleki, A. Safavi, F. Sedaghatpour. *Single . step calibration, prediction and real samples data acquisition for artificial neural network using a CCD camera* *Talanta* 64, 830-835, (2004).
- [10] D. Filippini, G. Comina, I. Lundstron. *Computer screen photo . assisted reflectance fingerprinting* *Elsevier* 107, 580 . 586, (2005).
- [11] D. Filippini, P. Asberg, P. Nilsson, O. Inganas, I. Lundstron. *Sensors and Actuators B. Computer screen photo-assisted detection of complementary DNA strands using luminescent zwitterionic polythiophene derivate* 113, 410-418 (2006).
- [12] A. Alimelli, D. Filippini, R. Paolesse, S. Moretti, G. Ciolfi, A. D'Amico, I. Lundstrom, C. Di Natale. *Direct quantitative evaluation of complex substances using computer screen photo-assisted technology: the case of red wine* *Analytica Chimica Acta* 597, 103-112 (2007).

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

itta, M. Martínez, A. Fernández. %Development and
bance reader for clinical analysis using inexpensive
web cam+ Laboratorio de Espectroscopía Laser, Escuela de Química Facultad de
Ciencias. Caracas . Venezuela, 2007.

[14] M. Pérez, S. Rivas. Software para el cálculo de la concentración en soluciones
acuosas coloridas. Universidad Central de Venezuela. Escuela de computación.
2008.

[15] A.S. Keston. Abstr, 129th Meeting Amer. Chemistry. Soc. p.31, 1956.

[16] P. Trinder. Ann Clin. Biochemistry 6:24, 1969.

[17] M. Markwell, S.M: Hass, LL. Bieber and NE.Tolbert. Anal Biochem 1983;87:206.

[18] American Diabetes Association: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus.
Diabetes Care 28:S37-S42, 2005

[19] F. Gonzalez-Mujica, N. Motta. A:H: Márquez, J: Capote-zulueta. Effects of
Bauhinia megalandra aqueous leaf extract on intestinal glucose absorption and uptake
by enterocyte brush border membrane vesicles. Fitoterapia 74 (2003) 84-90

Analizador colorimétrico: instrumento óptico para medir la radiación electromagnética en la región visible del espectro.

Absorción molecular: absorción de la radiación ultravioleta, visible e infrarroja que llevan a cabo transiciones cuánticas de moléculas.

Algoritmo de Canny: método para la detección de bordes, localizándolos y dando una respuesta correspondiente a un único borde.

Algoritmo de Hough: técnica que permite descubrir formas en una imagen. Se basa en transformar puntos de la imagen en un espacio de parámetros.

Absorción intestinal: proceso en el cual los nutrientes se incorporan al intestino delgado pasando luego a la sangre como energía requerida por el cuerpo.

Curva de calibración: curva de referencia construida a partir de la absorbancia y las cantidades conocidas de una sustancia para determinar la cantidad de otra especie desconocida.

Diodos de emisión de luz (Leds): es un dispositivo semiconductor que emite luz incoherente de espectro reducido cuando se polariza de forma directa la unión PN del mismo y circula por él una corriente eléctrica.

Espectrómetro: instrumento equipado con un monocromador o un policromador, un foto detector y una lectura electrónica para mostrar un número que es proporcional a la intensidad de la banda espectral aislada.

ELISA: ensayos con enzimas unidas a inmunoabsorbentes. Son métodos cinéticos que utilizan la especificidad química de las enzimas.

Fotómetro: instrumento para medir absorbancia que está equipado con un filtro para seleccionar la longitud de onda y un detector de fotones.

Glucogenolisis: Proceso de transformación del glucógeno del hígado y de los músculos en glucosa cuando el organismo necesita energía.

Glúcidos: son los tipos de azúcares como la glucosa, sacarosa, fructosa,

Glucemia: nivel normal de azúcar en la sangre.

Lector de absorbancia: equipos de laboratorio diseñados para detectar eventos biológicos, químicos y físicos en un gran número de muestras

Método glucosa oxidasa: método utilizado en la determinación de Glucosa.

Método de Lowry: método utilizado en la determinación de proteínas.

para identificar la radiación policromática en las
en.

Monosacárido: forma simple de la azúcar y la unidad básica de la mayoría de los hidratos de carbono.

Neoglucogenesis: proceso que almacena glucógeno en el hígado y músculos esqueléticos, o aminoácidos, lípidos y la glucosa se convierten a través de varias cadenas metabólicas. El exceso de glucosa se convierte en glucógeno o triglicéridos para el almacenamiento de energía.

Proteína: son compuestos orgánicos constituidos por aminoácidos.

Química clínica: es el área de estudio y diagnóstico de enfermedades, mediante análisis de fluidos corporales.

Software SCC: software para el cálculo de concentraciones desconocidas y el procesamiento digital de imágenes.

Sprague- Dawley: rata de laboratorio de la especie *Rattus norvegicus*, criados y mantenidos para la investigación científica. Sirven como un importante modelo animal para la investigación en la psicología, la medicina y otros campos.

Técnica CSPT: técnica foto asistida por pantalla de computadoras