

Tesis de Posgrado

Comparación de métodos para la investigación de levulosa en líquidos biológicos

De Buono, Amadeo Francisco

1956

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

De Buono, Amadeo Francisco. (1956). Comparación de métodos para la investigación de levulosa en líquidos biológicos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0891_DeBuono.pdf

Cita tipo Chicago:

De Buono, Amadeo Francisco. "Comparación de métodos para la investigación de levulosa en líquidos biológicos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1956. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0891_DeBuono.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

FCEN-BA.

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

-----o-----

COMPARACIÓN DE METODOS PARA LA INVESTIGACION DE LEVULOSA
EN LIQUIDOS BIOLOGICOS

por

AMADEO FRANCISCO DE BUONO

T E S I S

para optar al título de

DOCTOR EN QUIMICA

(orientación Química Analítica)

----o----

Buenos Aires

1 9 5 6

Fein: 891

FOOTNOTES

Comparación de métodos para la investigación de levulosa en líquidos biológicos

por

Amadeo Francisco De Buene

Tesis para optar al título de Doctor en Química (orientación Química Analítica).

Padrino de Tesis: Dr. Ventura Morena

Rev. de Tesis: 891

Introducción

En el presente trabajo se indican varias teorías expuestas por diversos autores sobre el metabolismo de la levulosa en condiciones normales y patológicas. Se consignan las propiedades físicas y químicas, así como su obtención en el laboratorio. Se describen los métodos propuestos por diversos autores para la investigación y valoración de levulosa en soluciones acuosas de levulosa pura, en algunos polisacáridos, especialmente inulina, y en líquidos biológicos.

Resultados experimentales

Se han estudiado varias técnicas propuestas por diversos autores para la investigación y valoración de levulosa en soluciones acuosas así como en sangre y orina. Los ensayos efectuados demostraron que algunas de ellas no son aplicables a la investigación de dicho glúcido en orina. Sólo obtuvimos resultados aceptables con las reacciones de Selivanoff, Borchardt y la reacción basada en el empleo de difenilamina. Los ensayos efectuados con la reacción de Selivanoff revelan que, si bien resulta útil para investigar la presencia de levulosa en orina, presenta el inconveniente de ser poco sensible pues sólo acusa resultados positivos cuando la concentración de levulosa en orina es superior a 3 gramos por litro. No obtuvimos interferencias debidas a la presencia de glucosa, aún en cantidades de 100 gramos por litro. Comprobamos que la reacción de Borchardt es más sensible que la de Selivanoff, pues revela la presencia de levulosa en orina cuando se encuentra presente en cantidades mayores de 0,5 gramos por litro. Los ensayos efectuados revelan que sólo resulta aplicable cuando no existe glucosa en la muestra, o bien si ésta se encuentra presente en cantidades menores de 20 gramos por litro. Esta reacción presenta el inconveniente de que ciertas orinas muy coloreadas, que no contienen glúcidos reductores, dan reacciones positivas falsas. También observamos

2

Es necesario ajustar el pH de la solución entre 6 y 7 antes de efectuar la extracción éterea, para lograr un pasaje completo de la materia coloreada al éter.

En las experiencias efectuadas a fin de aplicar las reacciones de Sullivanoff y Berchardt a la investigación de levulosa en sangre, no hemos obtenido resultados satisfactorios, tal vez por concentrarse las cantidades de levulosa presentes en la misma, por debajo del límite de sensibilidad de estas reacciones.

Respecto de la reacción basada en el empleo de difenilamina, observamos que las técnicas descritas por los autores que trabajaron con este reactivo no resultan aplicables a la investigación de levulosa en orina cuando ésta se encuentra acompañada de cantidades apreciables de glucosa, pero el estudio de los factores que influyen en esta reacción, nos ha permitido determinar las condiciones óptimas para que la misma pueda ser empleada en la investigación de levulosa aún en presencia de apreciables cantidades de glucosa.

La técnica seguida consistió en calentar a 100 °C durante 1 minuto, 0,1 ml de un filtrado libre de proteínas (obtenido tratando la orina de acuerdo al método de desproteinización propuesto por Somogyi, pero efectuando una dilución de 1:5 en lugar de la dilución 1:10 aconsejada por el mismo), con 1 ml de un reactivo constituido por 110 ml de ClH concentrado, 90 ml de etanol de 96° y 2,4 gr. de difenilamina. El límite de sensibilidad de esta reacción en tales condiciones es de 0,1 gramo de levulosa por litro, pero puede ser aumentado prolongando el tiempo de calentamiento. Este tiempo de calentamiento (y por lo tanto el límite de sensibilidad) no puede ser aumentado indefinidamente pues está limitado por la cantidad de glucosa presente. Efectuando el calentamiento durante 1 minuto exactamente, es posible investigar la presencia de levulosa en orina, aún en presencia de 100 gramos de glucosa por litro.

Esta reacción resulta aplicable a la investigación de levulosa en sangre, efectuando el calentamiento durante 5 minutos en lugar de 1 minuto como se realiza para la investigación de levulosa en orina.

Presenta posibilidades de ser empleado como método cuantitativo para la valoración de levulosa en orina y sangre. El limitado ensayo efectuado con ese objeto no nos permite asegurar categóricamente tal posibilidad, dado el escaso número de experiencias realizadas como apéndice del presente trabajo, pero los resultados obtenidos en las mismas, parecen dig-

...de ...
...de las experiencias ...
...de ...

1964

Dr. Ventura

Dr. Ventura

FCEN-BA

Expreso mi reconocimiento amplio y sincero al Dr. Ventura Morera, Profesor Titular de Análisis Biológicos, por haber tomado bajo su dirección el presente trabajo, orientándolo constantemente con sus valiosas indicaciones.

Me es grato asimismo, dejar constancia de mi agradecimiento a la Dra. Rosa M. Ferro por su amabilidad de colaborar en la corrección de los originales de esta tesis.

FOFBA

I N D I C E

Pág.

<u>CAPITULO I.-</u> Teorías sobre el metabolismo de la levulosa	1
<u>CAPITULO II.-</u> Propiedades físicas y químicas y obtención de la levulosa	21
<u>CAPITULO III.-</u> Técnicas de investigación y valoración de levulosa en soluciones puras y en polisa- cáridos.....	24
<u>CAPITULO IV.-</u> Determinación de levulosa en líquidos bio- lógicos.....	31
<u>CAPITULO V.-</u> Resultados experimentales.....	55
<u>CONCLUSIONES.-</u>	85

FOYBA

CAPITULO - I -

TEORIAS SOBRE EL
METABOLISMO DE LA LEVULOSA

En el año 1922 Folín y Berglund (1) publicaron un método para la valoración de glúcidos en orinas normales y posteriormente un trabajo sobre absorción, retención y eliminación de hidratos de carbono en el organismo. En este último observaron que aún aumentando el nivel de levulosa en sangre, no llegaba a producirse levulosuria ya que, según ellos, el hidrato de carbono reductor que aparecía en orina, no era levulosa, sino productos de descomposición o bien impurezas de la misma, presentes antes de ser ingerida o bien producidos dentro del organismo por procesos metabólicos. Se basaron para afirmar esto, en el hecho de que luego de la ingestión de levulosa se observaba en la orina la presencia de un hidrato de carbono reductor que no daba la reacción de Seliwanoff. Por ello dedujeron que debía existir un umbral renal determinado que no era sobrepasado normalmente por la levulosa sino por sus impurezas o productos de descomposición.

En cambio cuando existe una afección hepática la levulosa presente en la sangre es poco utilizada por dicho órgano, produciéndose así una hiperlevulosemia que sobrepasa el mencionado umbral renal, con la consiguiente aparición de levulosa en orina.

Observaron también que parecía no existir un umbral renal análogo para la lactosa y la galactosa.

En su trabajo hicieron mención de las propiedades sumamente laxantes de soluciones de levulosa que fueron calentadas en autoclave y consideraron que las diarreas que ocurrían frecuentemente luego de la ingestión de levulosa, eran probablemente debidas a productos de descomposición de la misma presentes en las levulosas comerciales, aún en las más puras, ya que la levulosa es fácilmente descomponible.

En cuanto a la fácil eliminación de la levulosa sanguínea por los organismos normales y aún los diabéticos, supusieron que se debía a que los tejidos se hallan saturados de glucosa pero son capaces de absorber y utilizar rápidamente otros glúcidos con respecto a los cuales no se encuentran saturados. Previeron la posibilidad de su empleo para reemplazar a la glucosa, salvo el inconveniente de los trastornos gastrointestinales producidos por sus impurezas.

Llegaron a la conclusión de que la levulosa y la galactosa eran menos capaces de provocar hiperglucemia que la glucosa, debido a un mayor aprovechamiento de las primeras por parte de los tejidos.

En cambio Foster (2) llegó a resultados totalmente distintos pues según él, la levulosa y la galactosa no eran capaces de provocar hiperglucemia, debido a una mayor capacidad por parte del hígado de formar glucógeno a partir de éstos hidratos de carbono.

Comprobó que existían diferencias entre la cantidad de glúcidos en sangre capilar y venosa y que la relación entre ambas cantidades variaba luego de la absorción de levulosa o glucosa.

Según Foster, el aumento de esta relación luego de la ingestión de levulosa era menor que en el caso de ingestión de glucosa, debido probablemente a una mayor retención de la primera por parte del hígado.

También pudo constatar que la levulosa se encontraba bajo la forma de holósido y que la lactosa era capaz de producir hiperglucemia, lo cual estaba de acuerdo con su condición de glúcido poco formador de glucógeno.

En el mismo año Bodansky (3) realizó un estudio sobre la hiperglucemia en perros, provocada por la ingestión de varios glúcidos y comparó los aumentos producidos por cada uno.

Comentó el trabajo de Folín y Berglund, y estuvo de acuerdo con ellos en cuanto a que el glúcido que aparecía en orina luego de la ingestión de levulosa no era ésta, sino productos derivados de la misma.

Comprobó también lo afirmado por Foster en cuanto a que la galactosa era capaz de producir hiperglucemias aún mayores que las que podía producir la glucosa. Empleó para sus determinaciones el método de Folin y Wu.

Según Bodansky, la galactosa se elimina por la orina en una tercera parte de la cantidad ingerida, durante las 24 horas subsiguientes a la ingestión, y sin embargo muy difícilmente puede ser reconocida por sus reacciones características (formación de ácido múcico, etc.).

Poco más tarde Bodansky (4) efectuó experiencias no ya sobre perros normales como lo hiciera en su primer trabajo, sino sobre perros intoxicados con cloroformo, fósforo y otras sustancias hepatotóxicas.

Llegó a la conclusión de que la prueba de tolerancia a la levulosa era la más indicada para determinar la función hepática. Comprobó que la de glucosa no resultaba conveniente por hallarse influenciada por factores extrahepáticos, mientras que la de la galactosa acusaba variaciones individuales que hacían que sus resultados fueran inaceptables.

También observó que una vez normalizada la función hepática se

normalizaba la curva de tolerancia a la levulosa.

Todas las valoraciones fueron efectuadas en sangre, ya que en orina no obtuvo resultados reproducibles.

Hiller (5) en 1925 comprobó por fermentación y reducción según los métodos de Hagedorn - Jensen (6) y Folin Wu (7), que no toda la sustancia reductora presente en la sangre era glucosa, sino que existía una fracción de sustancia reductora no-glucosa equivalente a 0.01-0.03% de glucosa. También verificó que produciendo shock insulínico podía llegar a reducirse a cero la glucosa sanguínea, mientras que la fracción reductora no-glucosa permanecía constante.

Observó que en casos de glomerulonefritis con retención grande de nitrógeno esta fracción aumentaba, comportándose en este caso como la glucosa en cuanto a la fermentación.

Folin y Svedberg en 1926 (8) encontraron que en la orina existía otro glúcido reductor no-glucosa que era fermentescible, que no era maltosa ni ningún otro polisacárido y que ellos supusieron se trataba de una etapa intermedia del metabolismo de los hidratos de carbono. Disintieron con Benedict en cuanto a la corrección del término glúcuressis propuesto por este último para significar una pequeña eliminación normal de azúcar por orina.

Eagle (9) opinó igual que Foglin y Berglund en cuanto a que esos glúcidos eliminados por la orina, que eran considerados normales por Benedict, no debían ser glucosa sino otros glúcidos ingeridos, o bien los productos de su descomposición.

Por su parte Wierzechoski (10) experimentó sobre perros normales inyectándoles soluciones de diversos hidratos de carbono

en forma continuada, de manera de transfundir a razón de 2 gr. de los mismos por kilogramo de peso y por hora hasta llegar a mantener un regimen contante de eliminación por la orina de cada uno de los glúcidos inyectados.

Cuando inyectaba soluciones de levulosa o glucosa por vía intravenosa en presencia de un contenido normal de insulina en el organismo, alrededor de un 90% del hidrato de carbono inyectado era transformado por los tejidos y el 10% restante eliminado por la orina (aproximadamente un 9,7 % para la levulosa y 12, 1 % para la glucosa).

Ambas aparecían respectivamente en la orina cuando eran inyectadas, es decir que, cuando se inyectaba glucosa, ésta aparecía en la orina y no la levulosa; a su vez, cuando se inyectaba levulosa, era ésta la que aparecía, y no la glucosa. Administré insulina durante la inyección a régimen constante, y observé una disminución en la glucosa excretada, desde el 10% que se eliminaba en un principio a un 1 % de la inyectada, mientras que la excreción de levulosa en iguales condiciones no fué modificada por la insulina. En la curva de glucosa en sangre, la insulina produjo un marcado descenso con una curva característica de la acción enzimática mientras que la curva de la levulosa en sangre no se vió afectada por la insulina. La rotación específica de cada uno de los glúcidos en la orina excretada se mantuvo constante con o sin inyección de insulina.

De sus experiencias, llegó a la conclusión que la levulosa no se depositaba en el organismo como un cuerpo extraño al mismo, sino como glucógeno normal; que parecía tener su propio

metabolismo independiente de la glucosa, siendo la insulina una hormona específica para el metabolismo de esta última.

En 1927 Reinhold y Karr (11) obtuvieron conclusiones opuestas a las de Folin y Berglund, pues según ellos, la levulosa no era rápidamente utilizada por los tejidos como tal, sino que se transformaba en una sustancia intermedia entre la levulosa y la glucosa para llegar finalmente a transformarse en esta última, que obtenida de acuerdo a ese mecanismo, sería más rápidamente utilizada por los tejidos para la formación de glucógeno, que la glucosa introducida al organismo como tal.

Cori y Cori (12) comprobaron en 1927 que la insulina administrada por vía intravenosa no modificaba la curva de tolerancia a la levulosa respecto de las curvas obtenida con pacientes no insulinizados.

Emplearon para sus determinaciones la técnica de Bertrand, el método de Hagedorn Jensen y la reacción de Seliwanoff.

Más tarde, en el mismo año, dichos autores comunicaron los resultados obtenidos por determinación de la oxidación de azúcares y formación de glucógeno en el organismo.

Determinaron el metabolismo de ratas en distintos grados de ayuno. Las ratas luego de un ayuno de 48 horas absorbían y oxidaban menos levulosa que luego de un ayuno de 24 horas. Comprobaron que, después de la administración conjunta de levulosa e insulina, ocurría un menor depósito de glucógeno hepático y aumentaba la oxidación de levulosa en los tejidos con relación a lo que se observaba en ratas no insulinizadas.

Estos autores manifestaron que si bien era cierto que la

levulosa tenía su umbral renal característico, este debía ser muy bajo, sobre todo cuando era inyectada intravenosamente, pues en este caso pasaba por los riñones directamente sin pasar antes por el hígado, el cual según ellos, es un factor muy importante en la fijación de la levulosa presente en la sangre.

Supusieron que la tolerancia a un determinado glúcido es una medida de la capacidad máxima de los tejidos para eliminar dicho glúcido de la sangre.

En el caso de la levulosa, cuando se inyectaba conjuntamente con insulina, disminuía la capacidad de formación de glucógeno en el hígado pero al mismo tiempo aumentaba la formación de glucógeno muscular y la oxidación en los tejidos evitándose así la levulosuria. (13).-

Por eso, la insulina no tenía efecto apreciable en la eliminación más o menos rápida del glúcido presente en la sangre, como en el caso de la glucosa, pues lo único que hacía variar era la relación de eliminación de la levulosa sanguínea por parte del hígado y el tejido muscular, pero sin variar la cantidad total de levulosa eliminada de la sangre en un cierto intervalo de tiempo. En cambio en el caso de la glucosa, la curva de tolerancia aumenta con la administración de insulina pues en el hígado también se acelera la formación de glucógeno, cosa que no ocurre con la levulosa.

En resumen, la diferencia entre el aprovechamiento de glucosa y levulosa con administración de insulina por inyección intravenosa consiste en que en el caso de la glucosa aumenta el depósito de glucógeno tanto en el hígado como en el tejido muscular, con relación al normal, mientras que en el caso de la levulosa aumenta la oxidación en el músculo a expensas de una disminución del

depósito de glucógeno en el hígado, pero sin aumentar la cantidad total de levulosa separada de la sangre.

En cambio cuando la insulina es segregada por el organismo de acuerdo a las necesidades del mismo, estos mecanismos actúan en forma ordenada y equilibrada no existiendo en ese caso un mayor utilización del glucógeno en los tejidos a expensas del glucógeno hepático.

Por su parte Benedict en 1928 (14) manifestó que normalmente no existía en la sangre ningún otro hidrato de carbono que no fuera glucosa.

En el año 1929 Corley (15) experimentó sobre conejos y comprobó que la levulosa aparecía en pequeñas cantidades en la sangre de los mismos luego de la administración de levulosa por vía entérica.

Administrando 2 gr. de levulosa por Kg. de peso por vía intravenosa observó que esta desaparecía totalmente a los 90 minutos de la inyección de la misma.

Una leve disfunción hepática, provocada mediante sustancias hepatotóxicas, no modificó mayormente los resultados. En afecciones más acentuadas, provocadas con los mismos agentes hepatotóxicos, se observó un ligero efecto en algunos casos. Sólo observaron un efecto apreciable empleando dosis masivas de estos tóxicos.

La levulosa inyectada simultáneamente con insulina protegía al conejo del shock insulínico, sin demostrar la insulina ningún efecto sobre la distribución y eliminación de la levulosa. Si la insulina se administraba intravenosa o subcutáneamente 1 o 2 horas antes del suministro de levulosa se observaba frecuente-

mente shock y la levulosa desaparecía de la sangre más rápidamente que en condiciones normales.

Tashiro y Tietz en el año 1930 (16) comprobaron que la levulosa se encontraba normalmente en la orina postprandial, siempre que en la comida se hubieran ingerido sustancias ricas en dicho glúcido.

En el año 1931 Harding y Selby (17) establecieron que, dentro de los límites de los métodos analíticos comunes, no se encontraban hidratos de carbono fermentescibles en orina de sujetos en ayunas. De existir algún glúcido presente, su concentración debía ser menor que 5 mg. por ciento y más seguramente encontrarse por debajo de 2-3 mg. por ciento. (excluyendo glucosurias).

Como después de la ingestión de glucosa por la mañana y con sujetos en ayunas no se observó aumento de azúcares fermentescibles en la orina, supusieron que algunos de los pacientes podrían presentar alguna glucuresis no reconocible por los métodos comunes y que podría deberse a un umbral renal bajo.

El 50% de los pacientes examinados mostraron pequeñas cantidades de azúcar fermentescible en la orina después del almuerzo. Dos de los pacientes, que no eliminaron azúcares fermentescibles en ayunas ni posteriormente a la ingestión de glucosa por la mañana, o de comidas mixtas ordinarias, los eliminaron después de la ingestión de gran cantidad de frutas; asimismo otros sujetos lo hicieron luego de la ingestión de jugo de naranja, miel y azúcar invertido, después de haber estado en ayunas.

Determinando curvas de tolerancia a la levulosa por ingestión de 25-30 gr. de levulosa se observó la presencia de levu-

losa en orina.

También comprobaron la presencia de glúcidos durante la tarde, en individuos que no los eliminaban por la mañana. Esto fué atribuído a que en condiciones de alimentación normal, los máximos de las curvas de tolerancia a la glucosa son mayores que en ayunas pudiendo llegar a sobropasar el umbral renal.

Observaron también que la elevación de dichos máximos era mayor como resultado de la ingestión de comidas muy ricas en proteínas o grasas, que en el caso de comidas muy ricas en hidratos de carbono. Todos estos aumentos de los máximos de las curvas de tolerancia no ocurrían en el caso de la levulosa.

De todos estos fenómenos dedujeron que la levulosa tenía un metabolismo propio y diferente del de la glucosa.

La levulosa se absorbe, como tal a través de la mucosa intestinal, a una velocidad proporcional a su concentración dentro del intestino. (18). La absorción es menos rápida que la de la glucosa. Asignando a ésta última una velocidad de absorción de 100, la velocidad que le correspondería a la levulosa sería de 67 en el hombre según Groen (19) y de 51 según Cori y Cori (loc.cit.).

Sachs (20) y Mann y Magath (21) afirmaron que el hígado era el único órgano en el cual se producía la formación de glucógeno a partir de levulosa, para su posterior utilización como glucosa. En cambio, Rollman y Mann (22) sostuvieron que en el intestino también se produce una transformación de levulosa en glucosa. Esto al opante a la utilización de la levulosa mediante el mecanismo previo de transformación en glucosa. Por su parte, Steinberg (23), Griesbach (24) y Mc Guigan (25) observaron que la levulosa

podía ser utilizada por otros tejidos como por ejemplo el renal y el muscular, sin transformación previa en glucosa.

Wierzuchowski (26) llegó a los mismos resultados obtenidos por Brezina y Durig (27) y Burger (28), con respecto a que la levulosa poseía una acción dinámica ospecífica superior a la de la glucosa cuando ingresaba al organismo.

Con respecto a la disminución de la reserva alcalina comprobada por Cathcarl y Markawitz (29), Johanson, Billstrom y Eijl (30) y Deuel (31), que ocurre paralelamente con un aumento del cociente respiratorio y de la lactacidemia según lo comprobado por Steinitz (32) y Campbell y colaboradores (33, 34), estos últimos interpretaron todos estos hechos, formulando la hipótesis de que debido al aumento de ácido láctico en la sangre, éste actuaba sobre el bicarbonato de sodio sanguíneo, produciendo una cantidad equivalente de anhídrido carbónico, que traía como consecuencia el aumento del cociente respiratorio debido a una mayor eliminación de CO₂, con un consumo de oxígeno constante.

Según Wierzuchovsky y Sokuracki (35) el hígado transforma en ácido láctico aproximadamente la quinta parte de la levulosa ingerida, pasando dicho ácido láctico a la circulación con el consiguiente aumento de la lactacidemia, el cual persiste hasta dos o tres horas después de ingerida la levulosa. Sterkin y Wengorowa (36) afirmaron que el ácido láctico era eliminado de la sangre por oxidación o por formación de glucógeno a partir del mismo.

Según Steinitz (37), cuando la función hepática se encuentra afectada no se resiente la función glucogenética respecto

de la levulosa sino cuando el proceso se encuentra muy avanzado; en cambio la capacidad de desdoblar la levulosa en ácido láctico es la primera que se ve afectada, con el resultado de que el resto de la quinta parte de la levulosa ingerida, que no es transformada en ácido láctico, pasa a la sangre como tal aumentando así la levulosemia. Asimismo, como el umbral renal para la levulosa es muy bajo, toda vez que se produce una hiperlevulosemia, ocurre la levulosuria.

Dlathorwick, Bradshaw, Ewin y Sawyer (38) opinaron en 1940 que si bien era cierto que se habían publicado hasta esa fecha numerosos trabajos y se habían propuesto gran cantidad de teorías sobre el metabolismo de la glucosa y la levulosa no existía todavía ninguna teoría completamente satisfactoria. Dichos autores observaron que en personas con levulosuria funcional no habían encontrado aumento de ácido láctico en sangre con respecto al que se encuentra normalmente.

Sustentaron la hipótesis de que el hígado enfermo sería incapaz de efectuar las etapas del metabolismo de la levulosa como podría hacerlo el hígado normal. Por lo tanto atribuyeron esa falta de aumento de la lactacidemia a esa incapacidad por parte del hígado enfermo de efectuar el metabolismo de la levulosa. Comprobaron además que la administración de levulosa por vía enteral en ratas normales tenía el efecto de producir un aumento del ácido láctico hepático y muscular 50% mayor que el producido por la glucosa. La producción intermedia de ácido láctico en el metabolismo de la levulosa justifica los cocientes respiratorios mayores observados luego de la administración de levulosa, respecto de los ob-

servados luego de la ingestión de glucosa.

Por su parte Storokin y Vongerowa (39) comprobaron que en sujetos con afecciones hepáticas provocadas mediante la administración de agentes hepatotóxicos, se observaba una disminución en la eliminación de la levulosa sanguínea, que permanecía sin metabolizarse, con la consiguiente merma en la hiperlactacidemia que debería producirse normalmente.

Nutter y Murtin (40) encontraron que cuando se introducía en el estómago de ratas fatigadas obligándolas a nadar, soluciones de glucosa y levulosa, esta última era absorbida más lentamente. Comprobaron también que la glucosa era superior a la levulosa para formar glucógeno hepático durante la primer hora de recuperación. La levulosa se aproximaba a la efectividad de la glucosa en la segunda hora y en la tercer hora se hacía más efectiva.

En el músculo, durante la primera y segunda hora se observó una mayor efectividad de la glucosa para formar el glucógeno muscular, pero sin una gran diferencia con respecto a la levulosa.

Linnewek (41) afirmó en 1941, que si bien en general se daba, por aceptado el hecho de que el glucógeno formado a partir de glucosa, era más fácilmente movilizable que el formado a partir de levulosa, el fenómeno era discutible. También hizo notar que la causa de una levulosuria no podía ser debida solamente a trastornos hepáticos, sino que probablemente se debía a un defecto de algún proceso enzimático.

Por su parte Sachs, Sternfel y Krauss (42) encontraron

dos casos de levulosuria esencial con pruebas de funcionamiento hepático y renal normales. Observaron poco aumento en la lactacidemia, luego de la ingestión de levulosa.

Suzuki (43) comprobó como Tashiro y Tietz (loc.cit.) la aparición de levulosa en orina luego de las comidas y particularmente luego de la cena. La inyección de glucosa provocó un aumento en la levulosa excretada por orina tanto en el hombre como en el conejo. Supuso que la glucosa debía ser parcialmente transformada en levulosa por el organismo.

Grabfield y Swanson (44) comprobaron, experimentando sobre perros, que las inyecciones intravenosas de soluciones hipertónicas de sacarosa, levulosa, glicerol y especialmente sorbitol, producían diuresis con eliminación de ácido úrico y alantoina, mientras que la glucosa, xilosa, maltosa, galactosa y otras, no la producían.

Por otra parte, la disfunción hepática que trae como consecuencia una curva anormal de tolerancia a la levulosa podría tener origen, entre otras causas en un disturbio adrenal. (45) Esta hipótesis fué sugerida por Kohler debido a haber conseguido llevar a la normalidad curvas patológicas mediante el tratamiento con acetato de desoxicorticosterona, eliminando así las dificultades que parecería existir en el mecanismo de fosforilación.

Según Deuel (loc.cit.) fué Strauss (46) el primero en comprobar el funcionamiento hepático mediante curvas de levulosa en orina por administración de 100 gramos de levulosa.

Habiéndose demostrado más tarde que la cantidad de levulosa eliminada por orina no era representativa de la variación de

la levulosa en la sangre, Mc Lean y Weslow (47), trataron de mejorar los resultados efectuando determinaciones de la variación de los glúcidos totales en la sangre, luego de la administración de levulosa.

Por otra parte, Green, Snell y Walter (48) llegaron a la conclusión de que esta forma de realizar la determinación de la curva de levulosa en sangre era defectuosa debido a que, cuando a un organismo se le administra levulosa, por un mecanismo no determinado con seguridad, se altera el metabolismo de la glucosa, produciéndose en un principio un aumento de la glucemia para luego pasar a una hipoglucemia.

Steinitz (49) efectuó pruebas sobre personas normales, hepáticas y diabéticas, suministrando 60 gramos de levulosa disuelta en 250 ml. de té. Consideró como curvas normales aquellas en las cuales la levulosemia en ayunas era nula, alcanzaba a los 30 a 60 minutos de la ingestión de levulosa, un máximo no superior a 12 mg. por ciento y antes de las tres horas a partir de la ingestión, la levulosemia era nuevamente igual a cero o bien no llegaba a los 4 miligramos por ciento. Por su parte la levulosuria normal no era superior a 0,3 gramos por ciento.

En las insuficiencias hepáticas encontró curvas con levulosemias máximas altas, especialmente en las afecciones agudas e ictericias simples, y levulosemias persistentes especialmente en las afecciones crónicas.

Rivoir, Gayet, Bernard y Moreau (50) y Stewart, Scarborough y Davidson (51) efectuaron pruebas con técnicas similares arribando aproximadamente a las mismas conclusiones. Sin embargo

difieren en cuanto a la levulosemia máxima que puede considerarse normal.

Para Steinitz la curva de tolerancia es patológica cuando el máximo es superior a 12 mg. por ciento; para Rivoir y sus colaboradores cuando es mayor de 15 mg. por ciento y para Stewart y colaboradores cuando supera los 18 mg. por ciento.

Castellano y Grinstein (52), considerando la dificultad de conseguir levulosa pura, basados en el hecho de que la sacarosa se hidroliza en el intestino y se comporta igual al azúcar previamente invertido con respecto a la curva de ácido láctico en sangre que son capaces de producir (53) y teniendo en cuenta las experiencias de Sterkin y Wengerowa (54) sobre perros normales y sus conclusiones referentes a que la curva levulosémica obtenida mediante el suministro de levulosa es la misma que se obtiene suministrando una cantidad equivalente de azúcar invertido, decidieron realizar experiencias empleando sacarosa en lugar de levulosa para determinar las curvas de esta última en sangre de individuos normales y hepáticos.

Procedieron mediante la administración de 100 gramos de sacarosa disuelta en 250 ml. de té aromatizado con limón y extrayendo muestras de sangre, en ayunas y cada media hora luego de la ingestión de la sacarosa, hasta las dos horas de efectuada la misma. Extrajeron también una muestra a las 3 horas, totalizando por lo tanto seis extracciones. Emplearon para sus determinaciones el método de Herbert por considerarlo superior al de Roe.

Encontraron que la levulosemia máxima alcanzada entre los 30 y 120 minutos de la ingestión de sacarosa oscilaba entre 6

y 9 mg. por ciento, siendo por lo general más persistente que lo observado por los otros autores. A las tres horas encontraron valores comprendidos entre 0 y 6 mg. por ciento.

En los casos de insuficiencia hepática, encontraron levulosemias máximas de hasta 28 mg. por ciento, siendo en general siempre superiores a 9 mg. por ciento. También observaron que las curvas obtenidas por ingestión de 100 gramos de sacarosa tenían las mismas características que las que resultaban de la ingestión de 60 gramos de levulosa.

Constataron también que la levulosuria es un índice de la capacidad funcional del hígado menos sensible y específico que la levulosemia.

Hornes (55) comprobó que la prueba de tolerancia a la levulosa fallaba al tratar de demostrar disminución hepática en casos de individuos con síndromes de intolerancia a la terapia anti-sifilítica en base a arsénico y bismuto, aún en casos de enfermos con disfunción hepática clínicamente evidente.

BIBLIOGRAFIA

- (1) FOLIN O. y BERGLUND H., J. Biol. Chem., 51, 213 (1922).-
- (2) FOSTER G.L., J. Biol. Chem., 55, 291 (1923).-
- (3) BODANSKY M., J. Biol. Chem., 56, 387 (1923).-
- (4) BODANSKY M., J. Biol. Chem., 58, 515 (1923-24).-
- (5) HILLER A., LINDER G.C. y van SLYKE D.D., J. Biol. Chem., 64, 625 (1925)
- (6) HAGEDORN H.C. y JENSEN B.N., Biochem. Z., 135, 46 (1923).-
- (7) FOLIN O. y WU B., J. Biol. Chem., 38, 81 (1919).-
- (8) FOLIN O. y SVEDBERG A., J. Biol. Chem., 70, 405 (1926).-
- (9) EAGLE S., J. Biol. Chem., 71, 481 (1926-27).-
- (10) WIERZUCHOSKI M., J. Biol. Chem., 68, 631 (1926).-
- (11) REINHOLD J.C. y KARR W.G., J. Biol. Chem., 72, 345 (1927).-
- (12) CORI C.F. y CORI G.T., J. Biol. Chem., 72, 597 y 555 (1927).-
- (13) CORI C.F. y CORI G.T., J. Biol. Chem., 76, 755 (1928).-
- (14) BENEDICT S.R., J. Biol. Chem., 76, 457 (1928).-
- (15) CORLEY R.C., J. Biol. Chem., 81, 81 (1929).-
- (16) TASHIRO S. y TIETZ E.B., J. Biol. Chem., 87, 307 (1930).-
- (17) HARDING W.G. y SELBY D.L., Biochem. J., 25, 1815 (1931).-
- (18) VERZAR y MC DAUGALL, Adsorption from the intestine, pag.132 (1936 cit. por (52)).-
- (19) GROEN J., J. Clin. Invest., 16, 2-3 (1937).-
- (20) SACHS N., Klin. Med. Z., 33, 87 (1899); cit. por Finkelstein y Dannenberg, J. Lab. Clin. Med., 10, 522 (1925).-
- (21) MANN y MAGATH, Arch. Int. Med., 30, 73 (1922); cit. por (52).-
- (22) BOLLMAN J.L. y MANN F.C., Am. J. Physiol., 96, 683 (1931).-
- (23) STEINBERG S.J., Arch. ges. Physiol. (Pflügers) 217, 686 (1927); c.p. (52)

- (24) GRIESBACH W., Z. ges. Exptl. Med., 65, 172 (1929).-
- (25) MC GUIGAN A., Am. J. Physiol., 21, 334 (1908).-
- (26) WIERZUCHOSKI M., Biochem. Z., 230, 146, 173 y 187 (1931).-
- (27) BREZINA E. y DURIG N., Biochem. Z., 50, 296 (1913).-
- (28) BURGER O., Bioch. Z., 124, 1 (1921).-
- (29) CATHCART E.P. y MARKOWITZ J., J. Physiol., 63, 309 (1927).-
- (30) JOHANSON R., BILLSTROM C. y EIJL J., Skand. Arch. Phys., 16, 263 (1904)
cit. por (31)
- (31) DEUEL H.J., J. Physiol Rev., 16, 173 (1936).-
- (32) STEINITZ K., Acta Med. Scand., 93, 122 (1937).-
- (33) CAMPBELL W.R. y SOSKIN S., J. Clin. Invest., 6, 291 (1928).-
- (34) CAMPBELL W.R. y MALTBY E.J., J. Clin. Invest., 6, 303 (1928).-
- (35) WIERZUCHOWSKI M. y SEKURACKI F., C.R. Soc. Biol., 117, 919 (1934).-
- (36) STERKIN E.Y. y WENGEROWA F.M., Bioch. Z., 272, 246 (1934).-
- (37) STEINITZ K., J. Biol. Chem., 126, 589 (1938).-
- (38) BLATHERWICK N.R., BRADSHAW P.J., EWING M.E., LARSON H.W. y SAWYER S., J. Biol. Chem., 111, 357 (1935).-
- (39) STERKIN E.Y. y WENGEROWA F.M., Med. exptl., (Ukraine), 2, 7-15 (1940)
cit. por C.A. (1941).-
- (40) NUTTER P.E. y MURTIN J.R., J. Nutrition, 21, 489 (1941).-
- (41) LINNEWEK J., Klin. Wochschr., 20, 1020 (1941); cit. por C.A. (1942).-
- (42) SACHS B., STERNFELD L., y KRAUSS G., Am. J. Children Dis., 62, 252 (1942)
- (43) SUZUKI K., Japan J. Med. Sci. II Biochem., 4, 112 (1941); cit. por C.A. (1942)
- (44) GRABFIELD G.F. y SWANSON D., J. Pharmacol., 74, 106 (1942).-
- (45) KOHLER V., Klin. Wochschr., 20, 716 (1941).-
- (46) STRAUSS R., D. Med. Woch., 44, 757 (1901) y 45, 786 (1901); cit. por (31)
- (47) MC LEAN J.E. y WESLOW R.S., Quart. J. Med., 14, 103 (1921).-

- (48) GREEN C.H., SNELL A.M. y WALTERS W., Arch.Int.Med., 36, 248 (1925).
- (49) STEINITZ K., Acta Med.Scand., 93, 98 (1937).-
- (50) RIVOIRE, GAYET, BERMOND y MOREAU, La Prensa Médica, 72, 1331 (1938).
- (51) STEWART C.P., SCARBOROUGH H. y DAVIDSON C., Edinburg.Med.J., 44, 105 (1937); cit. por C.A. (1937).-
- (52) CASTELLANO T. y GRINSTEIN M., La Prensa Med.Arg., 34, 1729 (1940).
- (53) STERKIN, WENGEROWA y SHEDEROWITSH, Wratsch.Dejeo, 701 (1934); cit. por (49).-
- (54) STERKIN y WENGEROWA, Fizial Z., 241, 1122, 1132; cit. por (52).-
- (55) HORNES G.O., Edinburg.Med.J., 47, 481 (1940).-

C A P I T U L O - I I -

PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS
Y
OBTENCION DE LA LEVULOSA

La levulosa, llamada también fructosa o azúcar de frutas es una octohexosa levógira que se clasifica como d (-) fructosa por sus relaciones con la d(+) glucosa. Es el constituyente único del polisacárido denominado inulina y se encuentra también combinada con la glucosa constituyendo el azúcar de caña o sacarosa.

Se encuentra al estado libre acompañando a la glucosa en la miel y otros productos naturales.

Con el agua de cal recientemente preparada da un levulosato de calcio insoluble en agua que se utiliza para poder separarla de la glucosa, cuando se obtiene por inversión de la sacarosa.

De este levulosato puede recuperarse la levulosa al estado libre por pasaje de CO₂ a través de una suspensión del mismo en agua, o bien tratando a esta última con ácido oxálico.

Industrialmente se fabrica hidrolizando con ácidos diluidos la inulina, que se encuentra en los tubérculos de dalia, achicoria y diversas alcachofas, la cual se desdobla en d-levulosa

Es difícil de cristalizar, sus cristales son rómbicos, duros, anhidros, de punto de fusión 95°C y más difíciles de disolver en agua que los de glucosa. Es más dulce que ésta y que la sacarosa. Asignando a la glucosa un poder edulcorante igual a 100, la sacarosa tiene un poder edulcorante igual a 60 y la levulosa uno igual a 170.

Presenta el fenómeno de la mutarrotación; el valor final su poder rotatorio específico es de -92,34.

En solución existe en equilibrio como alfa-d-fructopiranososa (alfap: -21°) y beta-d-fructopiranososa (alfap: - 133,5).

En combinación formando polisacáridos como la inulina y disacáridos como la sacarosa, se encuentra el estado de fructofuranosa; pero al quedar en libertad adopta la forma de fructopiranososa cuya estructura es más estable.

Reduce el licor de Fehling porque en presencia de álcalis se transforma por enolización en glucosa y manosa.

Por reducción se transforma en manita y sorbita y por oxidación se degrada en ácidos glicólico y tártrico. Es muy resistente a la oxidación por el agua de iodo o los hipoyoditos. Es sintetizable en el laboratorio obteniéndose bajo la forma de dl-levulosa o levulosa racémica que recibe el nombre de metilonitan, formosa o acrosa. También existe una l-levulosa que es muy parecida a la l-levulosa común pero que no es fermentescible por levadura.

Un método práctico para preparar levulosa en el laboratorio, se encuentra descripto por Rojahn (1) y es el siguiente:

100 gramos de miel bien cristalizada se tratan en un mortero con 100 mililitros de metanol mezclando bien ambas sustancias. Se continúa la extracción durante tres horas, con agitación periódica. Se filtra por Buchner y se lava con una porción pequeña de metanol. El filtrado se calienta suavemente en una cápsula de porcelana tarada. Una vez evaporado el metanol, se enfría la cápsula con hielo y se disuelve el residuo en diez veces su peso de agua. A esta solución se agrega hidróxido de calcio recientemente preparado en cantidad tal que sea un 7% en peso del peso de la solución. La mezcla se enfría con hielo con lo cual se va separando poco a poco un precipitado cristalino de fórmula $C_6H_{12}O_6 \text{ Ca (OH)}_2$. El precipitado se separa por filtración, se lava

va con agua, se filtra nuevamente y se suspende en 200 mililitros de agua. A través de esta suspensión se pasa CO₂ y se filtra el precipitado de CO₃ Ca que se forma. El filtrado se concentra hasta obtener una consistencia siruposa. Se ceba la solución siruposa con algunos cristales de levulosa pura y se deja cristalizar en un desecador de vacío sobre ácido sulfúrico. En caso de que la levulosa obtenida se encontrara ligeramente coloreada, puede disolverse en 3-4 partes de alcohol absoluto hirviendo, tratar con carbón activo, filtrar y recrystalizar.

También puede emplearse etanol de 50% en vez de alcohol absoluto y recrystalizar la levulosa de solución por el agregado de algunos cristales de levulosa pura.

B I B L I O G R A F I A

Zappi E. V., Tratado de Química Orgánica, Ed. El Ateneo, segunda Edición.

1) Rojahn C.A., Preparación de productos químicos y químico-farmacéuticos - Vol. 1, pag. 423-426, Editorial Atlante S.A., México, 1942.

C A P I T U L O - I I I

TECNICAS DE INVESTIGACION Y VALORACION DE LEVULOSA EN
SOLUCIONES PURAS Y EN POLISACARIDOS

I - INVESTIGACION DE LEVULOSA EN SOLUCIONES PURAS

En el tratado de Feigl (1) se encuentran detalladas varias reacciones para determinación de azúcares reductores por medio de reactivos tales como el clorhidrato de trifeniltetrazolium, hipiodito de magnesio, solución alcalina de azul de metileno, solución alcalina de dinitroacetanilida, clorhidrato de m-fenilendiamina, y reactivos como el de Nylander y el de Tollens, aplicables a pequeñas cantidades de azúcar. Sin embargo ninguno de ellas es específico de la levulosa.

Menciona, entre otros, dos métodos que pueden servir para la identificación de levulosa ya que dan con la misma coloraciones características.

Dichos métodos son los que se describen a continuación:

A) Reacción con el ácido cromotrópico (1-8-dihidroxinaftalen-3-6-disulfónico)

Si bien está indicada principalmente para la investigación del formaldehído, es aplicable al reconocimiento de levulosa. Cuando el formaldehído se calienta con ácido cromotrópico en un medio sulfúrico fuerte, se desarrolla un color violeta rosado. Se desconoce el mecanismo de la reacción.

Reactivos: Acido cromotrópico (sólido)

Acido sulfúrico al 72% (100 ml de agua más 150 ml de SO_4H_2 concentrado).

Reacción. A 2 ml. de SO_4H_2 72% se agrega una gota de la muestra y una pequeña cantidad de ácido cromotrópico. Se coloca el tubo durante diez minutos en un baño de agua a 60°C. Se deja enfriar y se observa.

El aldehído glicérico, la arabinosa, la levulosa, la sacarosa y pequeñas cantidades de furfural dan color amarillo. Los derivados halogenados de los ácidos aromáticos como el benzoico y el fenilacético, dan color rojo vinoso.

B) Reacción con el ácido pirogalolcarbónico

El ácido glioxálico y el mesoxálico producen un precipitado azul. El formaldehído y la acroleína dan color anaranjado, la levulosa da color verde oliva.

Reactivos: Acido pirogalolcarbónico (12)

Acido sulfúrico concentrado

Técnica: A una gota de la muestra colocada en un microtubo se se le agrega un poco de ácido pirogalolcarbónico y 1 ó 2 gotas de SO_4H_2 concentrado. La mezcla se enfría colocando el tubo en agua. A continuación se agregan 0,2 a 0,7 ml de SO_4H_2 concentrado. Se coloca el tubo en agua a 40°C durante 30 minutos y se observa el color desarrollado.

II - DETERMINACION DE LEVULOSA EN SOLUCIONES PURAS

Glick (2) describe las siguientes reacciones para la determinación de levulosa.

1) Reacción con difenilamina

Esta modificación a la reacción original con difenilamina fue propuesta por Rothenfusser (3) en 1909, siendo más tarde mejorada por Diche (4) en 1929 y 1951 (5).

A 1.5 ml de la solución de cetohexosa conteniendo 10 a 50 microgramos de la misma, se agregan 3 ml de un reactivo preparado mezclando 1 mililitro de solución de difenilamina al 10% en

etanol (previamente recristalizada dos veces de etanol al 70%), con 90 mililitros de ácido acético glacial (p.a.) y 100 mililitros de ácido clorhídrico concentrado (p.a.). La solución se calienta a 100°C durante 10 minutos. Se desarrolla un color azul. Todas las cetohechosas producen este color, siendo la intensidad del mismo 30 a 60 veces menor para las aldohexosas que para las cetohechosas. Si el calentamiento se prolonga durante 60 minutos, el color desarrollado por las aldohexosas se aproxima al desarrollado por las cetohechosas. Las cetopentosas, cetotriosas y cetotetrosas dan colores amarillos y verdes que escasamente interfieren en la determinación de las cetohechosas. Los ácidos hexurónicos y las heptulosas producen colores pardo rojizo y violeta, que pueden llegar a interferir si estas últimas se hallan en cantidades considerables. El color de las cetohechosas tiene un espectro de absorción característico alto, con un máximo en 635 milimicrones y otro entre 520 y 525 milimicrones y con un mínimo en 560 milimicrones. El color pardo rojizo de los ácidos hexurónicos tiene un máximo en 520 milimicrones y un segundo máximo en la zona azul del espectro, mientras que las heptulosas muestran un sólo máximo en 560 milimicrones.

2) Reacción con resorcina y ácido clorhídrico de acuerdo a la técnica de Poe (6,7).

Esta reacción, descrita originariamente por Seliwanoff (13), fué modificada por Poe a fin de aumentar su especificidad y sensibilidad.

A un mililitro de solución conteniendo 10 a 50 microgramos de cetohechosas, se agregan 4 ml. de un reactivo preparado mezclando 7 partes de CLH al 30% (5 volúmenes de CLH conc. y 1 vól.

men de agua), con 1 parte de un reactivo preparado disolviendo 0.1 gramos de resorcina y 0,25 gramos de tiourea en 100 ml de ácido acético glacial. La solución se calienta durante 10 minutos en un baño de agua a 80°C, agitando frecuentemente. Se enfría luego con agua corriente. Se desarrolla un color púrpura.

El color púrpura es de especificidad relativa. El aldehído glicólico, el adenosin 5-fosfato y las heptulosas también lo producen. Por su parte, las cetopentosas producen colores que van desde el amarillo al verde y que pueden ser de considerable intensidad. Las aldohexosas reaccionan en igual forma pero con mucha menor intensidad; la relación entre los coeficientes de extinción de la levulosa y la glucosa es de 70, aproximadamente.

Las cetohexosas muestran un máximo de absorción en los 515 milimicrones.

Existe una diferencia significativa en las formas de las curvas de absorción de la fructosa, sorbosa y tagatosa, sobre todo en la parte azul del espectro. La intensidad es mucho mayor para la tagatosa que para la levulosa y mayor para esta que para la sorbosa, mientras que los coeficientes de extinción en 515 milimicrones no difieren entre sí más de un diez por ciento.

3) Reacción con cisteína, carbazol y ácido sulfúrico. (8)

A 1 ml. de solución conteniendo 1 a 10 microgramos de cetohexosas, se agregan 0.2 ml de clorhidrato de cisteína al 1.2%, 5 ml de SO_2H_2 al 75% en volumen y 0.2 ml de carbazol al 0.1% en etanol. (El carbazol debe haber sido recristalizado dos veces de benceno). Después de agitar la mezcla, se deja estar a temperatura ambiente. Se desarrolla un color violeta que alcanza su máxima intensidad para las cetohexosas, luego de 16 horas.

Esta reacción debe considerarse como general de los ce-
toazúcares, pues tanto las cetohehexas como las cetopentosas reac-
cionan con la misma intensidad. El desarrollo del color es muy dis-
tinto en el caso de la ribulosa que el dado por las cetohehexas,
dado que el máximo de intensidad se obtiene a los 15 minutos, per-
manece constante durante algunas horas y luego decrece. La sorbosa
y la tagatosa reaccionan como la levulosa. Las aldohexosas produ-
cen el mismo cromógeno. El coeficiente de extinción de la glucosa
luego de 1 hora es 1/400 del de la levulosa y luego de 18 horas
de sólo 1/100.

Las cetohehexas muestran un sólo máximo de absorción en
560 milimicrones. Las cetopentosas muestran un color más rojizo
con un máximo de absorción en 540 milimicrones y un coeficiente
de extinción, a las 18 horas, menor que la mitad del de la levulo-
sa. Las aldopentosas reaccionan como las cetopentosas pero más
débilmente. El máximo de absorción para las heptulosas varía para
cada una desde 565 a 580 milimicrones y cada miembro difiere con-
siderablemente de los otros en sus coeficientes de extinción y de
máxima absorción. (9)

III - DETERMINACION CUANTITATIVA DE CETOHEXOSAS EN POLISACARIDOS

La inulina y los levulanos son los únicos polisacári-
dos conteniendo cetohehexas, que han sido determinados. (10).

No es necesario efectuar una hidrólisis previa para de-
terminarlos por cualquiera de las tres reacciones descriptas an-
teriormente.

Comparación de las reacciones descriptas en II

En cualquiera de las tres reacciones descriptas la densidad óptica de la solución y el máximo de absorción son proporcionales a la concentración del hidrato de carbono. En el caso de la reacción de la difenilamina, ésta se aplica tanto al máximo de 635 milimicrones como al de 520 milimicrones.

La reacción con cisteína y carbazol es la más sensible de las tres y la de Roe la menos sensible (11). La relación de los coeficientes de extinción de las ceto y aldohexosas es también más favorable en el caso de la primera. Esta reacción parece también ser menos influenciada por la presencia de proteínas que las otras dos. En cambio la reacción con cisteína y carbazol tiene como interferentes los hidratos de carbono de cadena corta, y algunos cetozúcaros y cetoaldehidos no ocurriendo los mismo con la reacción de la difenilamina. En el caso de polisacáridos, esta diferencia es insignificante.

El ácido hexurónico interfiere en la reacción de la difenilamina mucho más que con las otras dos reacciones y puede llegar a hacer dudosa la aplicación de la primera.

BIBLIOGRAFIA

- (1) FEIGL F., Spot tests, vol. II, pag. 241 y 253, Elsevier Publishing Co Inc., New York (1954).-
- (2) GLICK D., Methods of biological analysis, vol. II, pag. 313, Interscience Inc., New York (1955).-
- (3) ROTHENFUSSER S., Chem. Zentr., 80, II, 934 (1909).-
- (4) DISCHE Z., Mikrochemie, 7, 33 (1929).-
- (5) DISCHE Z., en Mc Elroy and Glass, Phosphorus metabolism, vol. I, pag. 171, John Hopkins Press, Baltimore (1951).-
- (6) ROE J. H., J. Biol. Chem., 107, 15 (1934).-
- (7) ROE J. H., EPSTEIN J. H. y GOLDSTEIN N. P., J. Biol. Chem., 178, 839 (1949)
- (8) DISCHE Z. y BORENFREUND E., J. Biol. Chem., 192, 583 (1951).-
- (9) LAMPEN O., J. Biol. Chem., 204, 499 (1953).-
- (10) ASHWELL G., Methods of Enzyme Chemistry, Academic Press, N. York (1954)
- (11) HENRY E. J. y MC NEILL J., J. Exptl. Med., 83, 147 (1946).-
- (12) VON RICHTER V., The chemistry of the carbon compounds, vol. III, pag. 371, Elsevier Publishing Co., Inc., New York (1946).-
- (13) SERIWANOFF Th., Serbian-German Chemist (1887), cit. por Morse, Applied biochemistry, pag. 170, Ed. W. B. Saunders Co., Philadelphia (1927).-

C A P I T U L O - I V -

DETERMINACION DE LEVULOSA EN LIQUIDOS BIOLOGICOS

METODOS EMPLEADOS POR LOS DISTINTOS AUTORES MENCIONADOS

EN EL PRESENTE TRABAJO

Reacciones con resorcina

Seliwannof
Folin y Berglund
Kronenberg y Radt
Roe
Steinitz

Reacciones con iodo en
medio alcalino

Romjin
Cajari
Alles y Winegarden

Reacciones con enzimas
o levaduras

Castellani y Taylor
Harding, Nicholson y Armstrong
Campbell y Hanna
Raymond y Blanco

Reacciones con sales
biliares

Tashiro y Tietz
Scott
Jordan y Pryde
Reinecke

Reacciones con
difenilamina

Ihl y Pechmann
van Greveld
Radt
Corley
Oppel
Steinitz y von Riesen
Patterson
Herbert
Alving, Rubin y Miller
Harrison

El primero en encarar en forma efectiva el problema de la investigación de levulosa fué Seliwanoff, (1) quien en el año 1887 propuso la reacción que lleva su nombre.

Esta reacción consiste en tratar la levulosa en solución acuosa, con ácido clorhídrico 12 por ciento y resorcina. Efectuando un breve calentamiento por un espacio de tiempo no mayor de 30 segundos, se desarrolla un color rosado, y se produce un precipitado rojo soluble en alcohol en caso de ser positiva la reacción.

La glucosa también es capaz de producir esta coloración, pero es necesario calentar durante un tiempo mayor.

La resorcina puede ser reemplazada por otras sustancias tales como el alfa-naftol, la floroglucina, la vainillina y la naf-to-resorcina, siempre que se trabaje en medio clorhídrico. Son factores importantes la concentración del ácido clorhídrico y el tiempo de calentamiento.

En el año 1922, Folin y Berglund (2) adaptaron a la determinación de hidratos de carbono en orina, el método de Folin y Wu para glúcidos en sangre. Eliminaron los cuerpos reductores y sustancias coloreadas de la orina por medio del reactivo de Lloyd, basado en una tierra de Fuller concentrada. Para el reconocimiento de la levulosa utilizaron la reacción de Seliwanoff.

En el año 1927, Kronenberg y Radt (3) emplearon la reacción de Seliwanoff para determinar levulosa en filtrados de sangre desproteinizada con ácido tricloroacético. Comprobaron que las sangres normales daban color pardo con este método, por lo cual cuando trataban de dosar levulosa, tenían dificultades para igualar el tinte del desconocido con el del testigo.

Mayores dificultades tuvieron cuando trataron de determinar levulosa en orina debido a la gran cantidad de sustancias interferentes presentes en la misma. Posteriormente abandonaron este método para adoptar la técnica de van Crevel (4) publicada ese mismo año.

Roe (5) comprobó en 1934 que la sensibilidad de la reacción de Seliwanoff se hace 13 veces mayor si se emplea ácido clorhídrico 18 por ciento en lugar del de 12 por ciento empleado por Seliwanoff en su reacción. Observó además que no era conveniente usar un ácido clorhídrico más concentrado que el arriba mencionado.

Comprobó también que podían aumentarse las condiciones deshidratantes del medio por agregado de etanol de 95°, pues según él, la reacción se debe a una deshidratación de la levulosa por parte del ácido clorhídrico, en presencia de resorcina. También comprobó que el alcohol etílico actúa como disolvente del producto coloreado produciéndose un color más estable que el obtenido en medio acuoso.

Habiendo observado que en estas condiciones también se producía una pequeña coloración con soluciones de glucosa, cuando trabajaba a 100°C, suprimió este inconveniente efectuando el calentamiento a 80°C. Según Roe, trabajando a esta temperatura la glucosa no interfiere, siempre que se encuentre en una concentración inferior a los 3 gramos por litro, pudiéndose determinar por lo tanto levulosa en presencia de glucosa en sangres y orinas normales.

Cuando aplicó su método a filtrados obtenidos con ácido tungstíco observó que se obtenía un color pardo que atribuyó

a una sobredesidratación de la levulosa. Por ello adoptó el método de desproteínización de Somogyi.

En cuanto a su aplicación a la orina, se presentaban grandes dificultades debido a la presencia de pigmentos y elementos celulares. Probó sin mayor éxito agentes clarificantes tales como las sales de plomo, mercurio, plata y uranio y agentes absorbentes como algunos silicatos. Esta dificultad se salvó finalmente mediante el empleo de carbón activo lavado con ácido acético para eliminar los constituyentes básicos del mismo y reactivado mediante calentamiento hasta la proximidad del rojo. Para poder obtener en su mezcla con la orina un pH de 3.1 a fin de evitar la adsorción de levulosa que se produciría a un pH mayor, agregó ácido acético en la proporción que se indica más adelante.

Los reactivos empleados por Roo son los siguientes:

Solución de resorcina al 0.1% en etanol; Se prepara disolviendo 0,5 gramos de resorcina en 500 ml de etanol de 95°.

Debe renovarse cada dos meses.

Acido clorhídrico al 30%: Se obtiene agregando 5 partes de ClH conc(d:1.19) a 1 parte de agua destilada.

Solución madre de levulosa: Se prepara disolviendo 1 gramo de levulosa en 100 ml de solución saturada de ácido benzoico en agua destilada.

Soluciones testigo de levulosa: se obtienen diluyendo convenientemente la solución madre de forma tal de obtener soluciones con concentraciones de levulosa 0.1, 0.05 y 0.025 mg por ml. La solución madre debe diluirse con agua destilada saturada de ácido benzoico.

Reactivos de desproteínización de somogyi:

Solución I: SO_4Zn . $7\text{H}_2\text{O}$ al 10% en agua destilada.

Solución II: NaOH 0.5 N.

Ambas soluciones deben ser hechas de forma que 10 ml de la solución I, diluida a 50-75 ml con agua destilada requieran el agregado de 10,8 a 11,2 ml de la solución II para obtener un color rosado permanente con fenolftaleína.

Carbón activado lavado con ácido: se colocan 100 gramos de carbón activado en un embudo provisto de papel de filtro y se cubren con 500 ml de ácido acético al 10%. Se deja filtrar y se lavan con 1000 ml de agua destilada. Se transfiere el carbón a una cápsula de porcelana y se calienta progresivamente hasta que el agua se haya evaporado, luego de lo cual se aumenta la temperatura hasta llevar el carbón al rojo incipiente manteniéndolo así durante 15 minutos.

Método para sangre:

A 1 ml de sangre se agregan 7 ml de agua destilada, esperando algunos minutos hasta que se produzca la hemólisis. Se agregan entonces 1 ml. de solución I y 1 ml de solución II. Se agita vigorosamente y se filtra. Se coloca en tubos de ensayo 2 ml del filtrado y 2ml. de las soluciones testigo respectivamente. A cada uno de los tubos se agregan 2 ml de la solución alcohólica de resorcina y 6 ml de la solución de ácido clorhídrico. Se mezcla el contenido de cada tubo y se colocan los mismos en un baño de agua a 80°C durante 8 minutos, transcurridos los cuales se enfrían los tubos con agua corriente. El desconocido se compara al colorímetro con el testigo cuyo color sea más parecido.

Los testigos permiten determinar con exactitud la cantidad de levulosa presente siempre que se encuentre en una concentración comprendida entre 25 a 100 mg por 100 ml de sangre. También permiten la determinación de cantidades de levulosa comprendidas entre 10 a 25 y 100 a 200 mg por 100 ml de sangre, pero con los pequeños errores inherentes a la ley de Beer.

Para cantidades de levulosa próximas a 10 mg por cien ml de sangre resulta conveniente efectuar la desproteínización en una dilución de 1:5 en lugar de la dilución 1:10 efectuada. Si la sangre contiene más de 200 mg de levulosa por cada 100 ml de la misma, es conveniente diluir en forma apropiada el filtrado efectuado en la proporción 1:10.

Cálculos: $\frac{m}{D} = C \times \frac{100}{V}$ mg de levulosa por 100 ml de sangre

T: lectura en el testigo

D: lectura en la incógnita

C: concentración del testigo utilizado

Método para orina:

Se colocan 2 ml de orina en un erlenmeyer pequeño y se agregan 18 ml de ácido acético al 1 por ciento y 0.2 gr de carbón lavado con ácido y reactivado. Se agita vigorosamente y se deja la mezcla durante cinco minutos, agitando de tanto en tanto. Se filtra por papel filtro de poros finos. Se colocan 2 ml del filtrado en un tubo de ensayo y en otros tantos tubos, igual volumen de las soluciones testigos de las mismas concentraciones que para sangre pero obtenidas en esta oportunidad por dilución de la solución madre con los correspondientes volúmenes de ácido acético al 1 por ciento en lugar de utilizar para ello la solución saturada de ácido benzoico, a fin de poder tener la misma concentración de ácido

acético tanto en los testigos como en la incógnita. También pueden utilizarse para este fin los testigos empleados para la determinación en sangre, pero en este caso se comete, según el autor, un error de alrededor del 3%.

Se agregan a cada tubo 2 ml de la solución alcohólica de resorcina y 6 ml de la solución de ácido clorhídrico. Se colocan los tubos en un baño de agua a 80°C. durante 8 minutos. Se continúa igual que para sangre. Si la orina contiene proteínas, debe desproteinizarse igual que la sangre. A 10 ml del filtrado desproteinado se agregan 0.1 ml de ácido acético glacial y 0.1 gramos de carbón, procediendo luego como con la orina normal.

Según Roe, es importante medir exactamente las cantidades de los reactivos y la intensidad del color depende de las concentraciones de etanol y ClH presentes. Es muy importante que las mismas cantidades de ambas sustancias sean agregadas tanto al desconocido como a los testigos. En cambio observa que un exceso de resorcina por encima de la cantidad dada en su método no tiene mayor importancia. Las condiciones de calentamiento y enfriamiento deben ser idénticas para todos los tubos.

El color cereza obtenido responde a la ley de Beer y es proporcional a la cantidad de levulosa presente.

El ácido acético fue empleado por Roe para poder obtener un pH de alrededor de 2.9, a fin de evitar la posible adsorción de levulosa por parte del carbón activo si se trabaja a pH. 3.1.

En la aplicación de su método a la orina de personas normales encontró que si estas se encontraban en ayunas el ensayo era negativo, pero que era posible encontrar y dosar levulosa en la orina de personas normales recogida posteriormente a la ingestión

de comidas ricas en dicho hidrato de carbono.

También observó que su método puede ser interferido por cantidades de glucosa, galactosa y xilosa superiores a 3,5 y 10 gramos por litro respectivamente, y por el furfural.

En 1938, Steinitz (6), aplicó el método de Roe a la determinación de inulina en plasma y orina. Constató la exactitud del método de Roe, siempre que se trabaje dentro de límites precisos de tiempo, concentración de CuH , etanol, azúcar y temperatura.

Comprobó que es imposible la determinación exacta de inulina por los métodos de reducción. También observó que la sangre de individuos en ayunas, es capaz de desarrollar un color correspondiente a 1 ó 2 mg de levulosa por ciento. Observó que el método utilizado era capaz de apreciar bajas concentraciones de inulina en orina y que por lo tanto, para la determinación de la filtración glomerular era suficiente dar solamente 10 gramos de inulina a un individuo de 70 kg de peso, con lo cual se obtenían valores de 20 a 40 mg de inulina por ciento en plasma, cantidad suficiente como para obtener reacción positiva en la orina.

Romjin (7), en el año 1897, ideó un método de reconocimiento de ceto hexosas en presencia de aldohexosas, por destrucción de estas últimas mediante una oxidación con iodo en medio alcalino, de forma que solamente las primeras quedaban en solución y podían reconocerse por su poder reductor.

En el año 1922, Gajda (8) modificó la reacción de Romjin utilizando un medio alcalino dado por carbonato de sodio en lugar de hidróxido de sodio y la aplicó a la diferenciación de aldo y ceto hexosas en plasma. Trabajó sobre 10 ml de plasma conteniendo diversos glúcidos agregando 2 ml de solución de car-

bonato de sodio al 15 por ciento y 15 ml de solución 0.1 N de iodo.

En el año 1923, Alles y Winegardan (9) emplearon un método basado en el de Cajari y observaron que en el término de 160 minutos la glucosa era oxidada totalmente, mientras que en el mismo intervalo de tiempo solamente resultaba oxidado un seis por ciento de la levulosa originariamente presente. El reactivo empleado por estos autores consiste en una solución de iodo 0.025 molal en 0.06 molal de ioduro de potasio.

A 10 ml de esta solución agregaban 15 ml de solución de CO_3HNa 1 molal, o bien en reemplazo de esta última una solución 0.5 molal de PO_4HNa_2 y agregado todo esto de 15 ml de agua y 10 ml de una solución del glúcido al 1 por mil.

Dejaban estar a temperatura ambiente (22-23°C) con lo cual iba desarrollándose la reacción. Cuando deseaban detenerla agregaban 5 ml de ácido sulfúrico.

Para poder dosar la levulosa efectuaban la determinación de los azúcares reductores antes y después de la oxidación con iodo. El método resultó poco sensible.

Castellani y Taylor (10) emplearon en el año 1922 una fermentación diferencial mediante el empleo de levaduras y Harding Nicholson y Armstrong en 1933 (11) emplearon suspensiones de *Proteus vulgaris* para fermentar selectivamente la glucosa.

En el año 1930, Tashiro y Metz (12) propusieron una reacción basada en el empleo de las sales de los ácidos biliares contenidas en la bilis de buey, disueltas en etanol para poder conservarlas.

Para efectuar la reacción, evaporaban un volumen apropiado de la solución alcohólica a fin de tener una determinada canti

dad de sales biliares, que era disuelta en agua para su aplicación como reactivo. Mezclaban partes iguales de la solución acuosa de sales biliares y de ácido sulfúrico concentrado, con lo cual se elevaba la temperatura. Al agregar una gota de la muestra, la temperatura descendía hasta alrededor de 85°C; dicha temperatura era considerada como óptima por los autores. Consegúan desarrollar en esta forma una coloración violácea, que comparaban colorimétricamente con la producida por los testigos, preparados simultáneamente.

Según los autores el método resultó bueno para determinar levulosa en plasma, pero en su aplicación a la orina falló debido a que siempre se obtenía una reacción positiva debida a alguna sustancia interferente presente en ella y que aparentemente no se encuentra presente en el plasma. Comprobaron que la glucosa también daba esta reacción cuando se encontraba presente en concentraciones superiores al 10 por ciento.

En 1926, Campbell y Hanna (13) adaptaron una técnica propia que habían empleado para la determinación de dihidroxiacetona. Dicho método se basa en la reducción en caliente del ácido fosfomolibdico y posterior titulación de molibdeno reducido, por permanganimetría. Estos autores afirmaron poder diferenciar la levulosa de la glucosa, pero el método no tuvo éxito por no ser específico de la levulosa.

Raymond y Bianco (14) en 1928 tomaron en cuenta las observaciones de Somogyi sobre la adsorción de la glucosa por parte de la levadura de panadería y la no adsorción de la levulosa y otros azúcares por parte de la misma. Trabajaron sobre 0.3 ml de sangre, de los cuales emplearon 0.2 para la adsorción y 0.1 para

la determinación de azúcares totales por el método de Hagedorn y Jensen. Mediante este método se recuperaron cuantitativamente de su solución, sustancias tales como la dihidroxiacetona, xilosa, ribosa, arabinosa, lactosa, galactosa y maltosa, que pasaron al filtrado sin ser retenidas por la levadura de panadería.

En cambio la levulosa, manosa y sacarosa se absorbían parcialmente, aumentando dicha adsorción con el tiempo que se dejaba estar en contacto la solución con la levadura. Debido a ello emplearon un tiempo de 2 minutos, considerado como óptimo por los autores.

En el caso de la levulosa, la adsorción variaba también con la concentración de dicho azúcar y el estado de la levadura. Por su parte, la glucosa se adsorbía cuantitativamente, hasta en concentraciones de 500 mg de glucosa por cien mililitros de sangre.

La misma adsorción parcial para los otros azúcares se cumplía en la sangre, salvo en el caso de la maltosa que cuando se encuentra disuelta en ésta, resultaba más adsorbida.

Scott (15), en el año 1934, efectuó una reacción en presencia de levulosa que luego aplicó en 1935 (16-17) a la determinación de ésta. Empleó el método de Somogyi para desproteínizar y concentró el filtrado obtenido en presencia de una pequeña cantidad de ácido acético llevando 20 ml de filtrado hasta un volumen de 1.5 ml. El filtrado lo obtenía empleando 5 ml de sangre y trabajando con los reactivos de Somogyi en la misma proporción pero quintuplicando el volumen de cada uno de los mismos. Utilizó un testigo de levulosa al 0.01 por ciento en solución saturada de ácido benzoico, tratado en forma idéntica que las sangres y llevada

a cabo simultáneamente.

A 1.5 ml de concentrado, agregó 3 ml del reactivo constituido por una solución de tauroglicocolato de sodio al 2,25 por ciento en etanol, y evaporó a sequedad. Luego agregó 10 ml de ClH concentrado y calentó a 40°C durante 30 minutos, obteniendo una coloración rojo púrpura. Una vez enfriados los tubos efectuó la comparación colorimétrica.

Describió también una técnica aplicable a pequeñas cantidades de sangre obtenibles por punción del pulpejo del dedo.

La aproximación de este método, según el autor, es de más o menos 1 mg para 5 a 20 mg de levulosa presente. Sin embargo el método no da resultados constantes.

En el año 1938, Jordan y Pryde (13) ensayaron varios compuestos de núcleo indólico y algunos aminoácidos como reactivos para determinar levulosa. De todos ellos el que dió mejor resultado fué el escatol pues desarrolló un color rojo púrpura semejante al del permanganato de potasio. Comprobaron que también reaccionaban el ácido glioxílico dando color azulado y las pentosas color marrón anaranjado. Emplearon este método para hidratos de carbono puros en estado sólido y anticiparon la posible aplicación de su método a la determinación de levulosa en líquidos biológicos. La única experiencia que efectuaron al respecto fué la determinación de hasta 40 mg de levulosa agregada a plasma, en presencia de 120 mg de glucosa.

Trabajaron sobre 5 a 10 mg de sustancia, a los que agregaron 10 mg de escatol recristalizado y 10 ml de ácido clorhídrico concentrado. Calentaron durante 30 minutos a una temperatura de 38-40°C. La levulosa, durante ese tiempo y a esa temperatura

desarrollaba color violeta, no ocurriendo lo mismo con la glucosa. Para comprobar si era esta última, colocaban el tubo en un baño de agua a 80°C durante 15 minutos, en cuyo caso se desarrollaba la coloración.

Calentaban primero a la temperatura menor, porque solamente la levulosa desarrollaba el color a esa temperatura, mientras que la glucosa sólo lo hacía a 80°C. Como ambos glúcidos daban coloración a los 80°C no era posible discriminarlos si se calentaba directamente a dicha temperatura.

Luego del calentamiento agregaban alcohol etílico para intensificar la coloración, ya que este disolvía el exceso de escatol, que absorbía parte del producto coloreado cuando se encontraba en solución acuosa ácida.

Reinecke (19) en 1942 aplicó la reacción de Jordan y Pryde a líquidos biológicos. Comprobó que la gran sensibilidad de la misma se ve muy disminuída cuando se aplica a los medios acuosos resultantes de la desproteínización. Es por eso que este autor recomienda cambiar el ácido clorhídrico empleado por Jordan y Pryde en la reacción original, por etanol saturado de Cl_2H gaseoso, con lo cual la reacción recobra su gran sensibilidad, pero con el inconveniente de desarrollar un color interferente cuando se calienta en presencia del reactivo de escatol. Reinecke obvió esta dificultad, agregando el escatol sólo después de haber efectuado el calentamiento con el etanol- Cl_2H y enfriado, con lo cual los productos de descomposición de la levulosa reaccionaban rápidamente con el escatol y la reacción interferente se hacía muy débil. El inconveniente de esta reacción es que la glucosa interfiere mucho.

Efectuó la desproteínización de 0,1 ml de sangre por medio del ácido tungstico diluido. (También propuso una microtécnica para 0.05 ml de sangre. Calentó el filtrado con una solución de ClH en etanol de una normalidad de 10-10.1 N. El calentamiento lo efectuó a una temperatura de 60° durante 30 minutos. Enfrió y trató durante 5 minutos con el reactivo de escatol en etanol y ácido clorhídrico. Diluyó luego con alcohol, dejando estar 10 a 15 minutos antes de comparar al fotocolorímetro, equipado con un filtro de transmisión máxima en 520 milimicrones, efectuando simultáneamente la comparación con un ensayo en blanco. También puede efectuarse la determinación con un colorímetro empleando testigos.

Habiendo efectuado diversas experiencias a fin de determinar las condiciones óptimas para su reacción comprobó que éstas ocurrían cuando calentaba a 60°C durante 30 minutos 1 parte del filtrado libre de proteínas, adicionado de 2 partes de la solución de ClH gaseoso en etanol.

En 1955, Karvonen y Malm (31) describieron un método basado en el empleo de indol para dosaje de levulosa en sangre, que según los autores es 200 veces más sensible para la levulosa que para la glucosa. Se requirieron filtrados de muestras libres de proteínas con, por lo menos 0,5 mg % de levulosa.

Para desproteínizar se utiliza la técnica de Somogyi.

Procedimiento: en un tubo de ensayo colocar 0.5 ml de la muestra y 0.5 ml del reactivo con indol (25 mg de indol disueltos en 100 ml de solución acuosa de ácido benzoico al 0.2 % ; filtrar antes de usarlo). Agregar 5 ml de HCl concentrado inmediatamente. colocar el tubo en un baño de agua a 50°C durante 20 minutos. Enfriar el tubo en agua corriente y leer el color a 470 milimicro-

nes, usando cubetas de 10 mm con el fotómetro de Coleman. Si la concentración de levulosa es menor de 0.5 mg % usar volúmenes 5 veces mayores y una cubeta con un camino óptico de 50 mm. Además como el tiempo de calentamiento varía con los volúmenes y el tipo de material de vidrio usado (20 min. resultan prácticos para 6 ml en un tubo de ensayo común), con un volumen total de 30 c.c. en un tubo correspondientemente más grande, el tiempo de calentamiento en la otapa (2) debe ser 30 minutos. Calcular los resultados por comparación con testigos preparados simultáneamente.

Separadamente, determinar la concentración de la glucosa u otras aldohexosas presentes (importante solamente cuando la concentración de la glucosa es superior a 100 veces la concentración de la levulosa). Solamente las cetoheptosas, tales como la sorbosa, dan reacciones de coloración con el indol. Para comprobar su contribución a la lectura de la extinción total, eliminar primero la glucosa y la levulosa por incubación de la muestra con levadura de cerveza lavada, durante 4 horas a la temperatura ambiente y luego efectuar el método del indol indicado arriba.

Además de las determinaciones de levulosa, este método del indol puede también ser usado para determinar glucosa por calentamiento en la otapa (2) a mayor temperatura y hasta que el desarrollo del color sea completo.

En el año 1835, Iml y Pechmann (20) idearon un método de dosificación de levulosa basado en el color azul que desarrollan las soluciones de la misma con ácido clorhídrico y difenilamina. Esta reacción es casi específica de la levulosa pero también la dan la inulina, los levulosenos y la glucosa, esta última más

lontamento.

Esta reacción fué aplicada a la determinación de levulosa en sangre por van Creveld (21) en el año 1928. Este autor efectuó la desproteínización de la sangre por el método de Schenk con bicloruro de mercurio en medio clorhídrico, calentando luego el filtrado durante 15 minutos con ácido clorhídrico al 25 por ciento y una solución alcohólica de difenilamina. Luego de enfriar, extrajo el producto coloreado con alcohol amílico, ya que dicho producto es poco soluble en agua, y efectuó la comparación colorimétrica de la solución obtenida con testigos preparados disolviendo levulosa en filtrados de bicloruro de mercurio y ácido clorhídrico. En 1928, Reid (22) introdujo leves modificaciones al método de van Creveld.

Corley (23) modificó en el año 1929 la técnica seguida por estos autores, empleando un filtrado obtenido según el método de Folin y Wu. A 1 volumen de dicho filtrado agregó 0.5 volúmenes de ácido clorhídrico concentrado y 0.1 volúmenes de solución al 20 por ciento de difenilamina en etanol. Calentó los tubos correspondientes al desconocido y a los testigos (preparados en forma similar al desconocido), en un baño de agua hirviente durante 15 minutos, enfriando luego. Según Corley es conveniente tapar el extremo de los tubos con lana de vidrio a fin de disminuir la evaporación de los reactivos durante el calentamiento.

El producto coloreado lo extrajo agitando con un tercio del volumen (del líquido presente en los tubos) de fenol fundido, agregando luego 0.5 volúmenes de etanol de 95%. Efectuó luego la comparación al colorímetro.

Corley observó que el color se hace más intenso a medida que transcurre el tiempo. El método resultó satisfactorio para recuperar levulosa agregada a sangre pero no resultó en su aplicación a la orina.

La técnica de Corley, fué ligeramente modificada por Oppel (24) en 1930 y adaptada a fin de poder llevarla a cabo como una microtécnica por Steinitz y von Riesen* (25) 1932, sin que se obtuvieran mejores resultados.

Se observó que, en general, todos estos métodos no eran suficientemente exactos debido a la dificultad de comparar las coloraciones del desconocido y de los testigos.

Patterson (26) en 1935, criticó la técnica de Radt por el hecho de era necesario emplear un volumen mayor de alcohol amílico para extraer el producto coloreado del desconocido, que el necesario para extraer el correspondiente a los testigos, variando por lo tanto la relación de volumen. Propuso por lo tanto, una modificación consistente en disolver el producto coloreado, con butanol; facilitando la disolución mediante el agregado de sulfato de amonio. En estas condiciones pudo efectuar la extracción del producto coloreado correspondiente al desconocido y al testigo con volúmenes iguales de butanol.

Efectuó un desproteinizado sobre 2 ml de sangre, según la técnica de Somogyi, pero duplicando todos los volúmenes de los reactivos, a fin de poder obtener un filtrado de más de 10 ml.

Tomó 10 ml de filtrado y los acidificó con ácido acético, concentrando a continuación la solución hasta un volumen de 4 ml. reconocible por tener el tubo en el cual efectuó la concentración,

marcado previamente a dicho volumen. Agregó luego 4 ml de ácido clorhídrico, preparado mezclando cinco partes de ClH concentrado con 3 partes de agua destilada, y 0,4 ml de solución de difenilamina al 20 por ciento en etanol, agitando. Calentó durante quince minutos en un baño de agua hirviendo. Después de enfriar los tubos, agregó 10 ml de butanol y 2 gramos de $SO_4 (NH_4)_2$ sólido, agitando para extraer el producto coloreado. Luego efectuó la comparación colorimétrica del desconocido con testigos preparados simultáneamente. El testigo empleado contenía 0.1 mg de levulosa en 4 ml de solución.

Empleó el método de Somogyi para efectuar los filtrados debido a haber comprobado que el filtrado obtenido con ácido clorhídrico y bicloruro de mercurio según el método de Schenk, producía coloraciones más intensas de lo que correspondía a la cantidad de levulosa presente. Comprobó también que las determinaciones efectuadas sobre sangre de individuos en ayunas, daban con respecto a ensayos en blanco efectuados paralelamente, coloraciones correspondientes aproximadamente a 1 mg de levulosa por cien mililitros de sangre y debidas probablemente a la glucosa.

Método de Herbert

Herbert (27) en 1938, propuso una modificación a la técnica de Patterson para evitar el empleo de butanol como agente disolvente de la sustancia coloreada, utilizando etanol en lugar de éste.

Comprobó que el método de Patterson era defectuoso y efectuó modificaciones al mismo, a fin de poder efectuar la determinación de levulosa con mayor exactitud y rapidez, pues si bien accep-

tó el hecho de que los errores que podía dar el método de Patterson no alcanzaban generalmente a incidir en su importancia clínica, encontró que muchas veces fallaba aún con soluciones de levulosa pura.

Herbert advirtió que en su método aparecía una coloración verdosa suave en la aplicación del mismo a sangre de individuos en ayunas, cosa que atribuyó a la superposición de un leve color azul producido por la glucosa, con un color amarillo de origen desconocido. Este inconveniente fué eliminado más tarde mediante el empleo de fotolorímetros calibrados con soluciones tipo de levulosa en sangre de individuos en ayunas.

La interferencia de la glucosa en la reacción ocurría en una proporción tal que 100 mg de glucosa por ciento equivalían a 25 mg de levulosa por ciento.

Verificó también la importancia del tiempo de calentamiento y comprobó que el máximo de coloración para soluciones de levulosa pura sólo se alcanzaba luego de 25 minutos de calentamiento. Sin embargo indicó que convenía calentar solamente 15 minutos, debido a que la levulosa desarrollaba el color más rápidamente en los primeros minutos (85 % del color a los 15 minutos y 94 % del mismo a los 20 minutos), mientras que con la glucosa ocurría a la inversa.

Con su método obtuvo un color más intenso que con el de Patterson, y comprobó que, así como el color se intensificaba desproporcionalmente cuando se empleaba el método de Schenk para efectuar los desproteinizados, tampoco convenía desproteinizar con $Zn(OH)_2$ debido a que se diluía demasiado la sangre, ni con ácido

túngstico porque producía una ligera turbidez al calentar. Por ello adoptó el método de Somogyi, que no presentaba inconvenientes.

Con referencia al posible empleo del ácido tricloroacético, comprobó que éste aumentaba el color con referencia al que debería obtenerse de acuerdo a la cantidad de levulosa presente, haciendo la salvedad de que este inconveniente podría evitarse si se agregara también al testigo. Sin embargo no lo comprobó, limitándose solamente a consignar la posibilidad de su empleo.

Los reactivos empleados por Herbert son los siguientes:

Reactivos para la degradación según el método de Somogyi:

La preparación ya se encuentra detallada en la página 35.

Solución de difenilamina: Se mezclan 50 partes de ClH conc. con 70 partes de etanol de 95° y 6 partes de solución de difenilamina al 20 por ciento en etanol de 95°.

Solución madre de levulosa: Se disuelve 1 gramo de levulosa en solución concentrada de ácido benzoico en agua, llevando a 100 ml con ésta última.

Soluciones testigo: Se efectúan las diluciones de la solución madre correspondientes, a fin de obtener dos testigos con las siguientes concentraciones.

- a) 0.025 mg de levulosa en 2 ml (Equivalente a 5 mg de levulosa por 100 ml de plasma).
- b) 0.1 mg de levulosa en 2 ml (Equivalente a 20 mg de levulosa por 100 ml de plasma).

Las diluciones de la solución madre se efectúan con solución saturada de ácido benzoico en agua destilada.

A pesar de que Herbert acostumbraba tener una solución

de difonilamina al 20 por ciento en etanol, que conservaba guardada en un frasco color caramelo, efectuando la mezcla con el etanol y el ácido clorhídrico en el momento de utilizar el reactivo, comprobó que éste se conservaba bien por lo menos durante un mes, no pudiendo asegurar su conservación por un intervalo mayor de tiempo, por no haberlo ensayado.

Procedimiento:

Se colocan 2 ml de plasma en un tubo de 15 ml de capacidad y se agrega 2 ml de agua y 2 ml del reactivo de Somogyi nº 1. Se agita bien y se agregan 2 ml del reactivo de Somogyi nº 2, agitando nuevamente.

Se filtra por papel Whatman nº 42 a 5.5 cm de diámetro, obteniéndose alrededor de 4 ml de filtrado. En tres tubos de ensayo con sendas marcas a los 10 ml., se colocan 2 ml del filtrado y de las soluciones testigo, respectivamente. A cada tubo se agregan 6 ml de la solución de difenilamina. Se colocan los tubos en agua hirviente durante 15 minutos, transcurridos los cuales se retiran y se enfrían. Se agrega etanol a cada uno de los tubos hasta alcanzar la marca correspondiente a 10 ml y se compara el desconocido en el colorímetro con el testigo más cercano.

Método de Alving, Rubin y Miller

En 1939, Alving, Rubin y Miller (28) describieron una técnica basada en los principios de la de Horbert y la aplicaron a la determinación de inulina en plasma, suero y orina.

Reemplazaron el sulfato de cinc del método de Somogyi, por el sulfato de cadmio. Efectuaron una fermentación previa para eliminar los azúcares fermentoscibles que pudieran existir.

Los reactivos empleados por Alving, Rubin y Miller son los siguientes:

Reactivo de difenilamina:

a) Disolver 10 gramos de difenilamina p.a. en etanol absoluto redestilado, llevando a 100 ml. Conservar la solución en un frasco color caramelo de tapón esmerilado.

b) Mezclar 80 ml de ClH concentrado p.a. en 112 ml de etanol absoluto redestilado. Agregar a esta solución 12 ml de la solución de difenilamina. Conservar en frasco color caramelo de tapón esmerilado. Debe ser renovado semanalmente.

Solución de sulfato de cadmio: Disolver 13 gramos de $3SO4Cd \cdot 8H2O$ en agua. Agregar 63.5 ml de $SO4H2$ 1N y llevar a un litro con agua.

Hidróxido de sodio 1,1 N: Disolver 40.4 gramos de sodio en agua llevando a 1 litro.

Solución madre de inulina: Secar inulina p.a. a 80-100°C durante una hora y enfriar en desecador. Disolver 1 gramo de inulina en agua y llevar a 1 litro.

Testigo nº 1: Colocar 5 ml de la solución madre en un matraz aforado de 1 litro y llevar a volumen.

Testigo Nº 2: Colocar 10 ml de la solución madre y llevar a un litro.

Suspensión de levadura: Suspender alrededor de 50 gramos de levadura, libre de almidón en 100 ml de agua. Centrifugar a baja velocidad y decantar el líquido sobrenadante. Repetir cinco veces la misma operación. Las células de levadura así lavadas pueden conservarse en un recipiente con tapa esmerilada colocado en heladera, durante 2 semanas. Antes de utilizarla debe hacerse un lavado,

determinando luego por centrifugación en un tubo de hematocrito el volumen de agua que contiene la suspensión que va a utilizarse.

Procedimiento:

Eliminación de la glucosa: 5 ó 10 ml de suero, plasma u orina se colocan en un tubo de centrifuga de 15 ml de capacidad. Se agregan 0.5 ó 1 ml de la suspensión de levadura, respectivamente. Agitar el tubo o incubar a 38°C durante 30 minutos. Centrifugar a gran velocidad durante 15 minutos. Retirar el líquido sobrenadante.

Desarrollo del color: A 1 ml del líquido sobrenadante, agregar 8 ml de la solución de sulfato de cadmio y agregar 1 ml de la solución de hidróxido de sodio 1.1 N, agitando enérgicamente. Se deja en reposo durante 15 minutos y se filtra. El filtrado debe diluirse de forma que contenga menos de 0.040 mg de inulina por mililitro de filtrado.

En un tubo de vidrio resistente se colocan 5 ml del filtrado, diluido si es necesario, y se agregan 10 ml del reactivo de difenilamina. Se colocan el desconocido y los testigos preparados en forma similar y simultáneamente, en agua hirviendo durante 60 minutos. Durante el calentamiento conviene tener tapados los tubos para prevenir la evaporación del reactivo. Una vez transcurrido el tiempo de calentamiento, se colocan inmediatamente los tubos en agua fría, dejándolos hasta que adquieran la temperatura ambiente. Se dejan estar durante 10 minutos a temperatura ambiente y se comparan al colorímetro. En el cálculo final es necesario considerar todas las diluciones efectuadas, incluyendo la debida al agua de la suspensión de levadura.

Corcoran y Pago (29) utilizaron un método similar, pero en

tubos abiertos, completando al final de la reacción con etanol hasta un volumen fijo.

Harrison, (30) en 1942, cambió el alcohol usado como disolvente por el ácido acético, que presentaba la ventaja de ser menos volátil. El método presentaba la ventaja de poderse llevar a cabo en tubos abiertos, disminuyendo la evaporación de la solución sin disminuir la sensibilidad. Los reactivos empleados por Harrison fueron los siguientes:

Reactivo de difenilamina: Se disuelven 3 gramos de difenilamina en 100 ml de ácido acético y se agregan 60 ml de CPH conc.

Solución ácida de sulfato de Cadmio: Igual que la empleada por Alving, Rubin y Miller.

Solución de hidróxido de sodio 1.1 N: La preparación del filtrado la efectúa en forma similar a las ya vistas. Diluye si es necesario a fin de tener una concentración de inulina entre 2 a 12 microgramos/mililitro. Generalmente se diluye 1:40.

A 2 mililitros del filtrado se le agregan 4 ml del reactivo de difenilamina. Se agita y coloca en agua hirviendo durante 30 minutos, efectuando paralelamente un ensayo en blanco. Retirar los tubos, enfriar y comparar al colorímetro.

BIBLIOGRAFIA

- (1) SELIVANOFF T., Serbian-German Chemist(1887);cit.por Morse, Applied biochemistry, pag.170, Ed. W.B. Saunders Co., Philadelphia (1927).-
- (2) FOLIN O. y BERGLUND H., J. Biol.Chem., 51, 209 (1922).-
- (3) KRONENBERG F. y RADT P., Biochem. Z., 190, 161 (1927).-
- (4) van CREVELD S., Klin. Woch., 6, 697 (1927); cit.por (27).-
- (5) ROE J.H., J. Biol. Chem., 107, 15 (1934).-
- (6) STEINITZ H., J. Biol. Chem., 126, 589 (1938).-
- (7) ROMJIN C., Z. anal. Chem., 36, 349 (1897); cit.por (32).-
- (8) CAJARI F.A., J. Biol. Chem., 54, 617 (1922).-
- (9) ALLES G.A. y WINWGARDEN H.M., J. Biol. Chem., 58, 225 (1923).-
- (10) CASTELLANI A. y TAYLOR F.E., Ann. de l'Inst. Pasteur, 36, 789 (1922)
- (11) HARDING W.G., NICHOLSON T.F. y ARMSTRONG A.R., Biochem. J., 27, 203 (1933).-
- (12) TASHIRO S. y TIETZ E.B., J. Biol. Chem., 87, 307 (1930).-
- (13) CAMPBELL W.R. y HANNA M.S., J. Biol. Chem., 69, 703 (1926).-
- (14) RAYMOND A.L. y BLANCO J.C., J. Biol. Chem., 79, 649 (1928).-
- (15) SCOTT L.D., J. Lab. Clin. Med., 19, 523 (1934).-
- (16) SCOTT L.D., Brith. J. Exptl. Path., 16, 489 (1935).-
- (17) SCOTT L.D., Biochem. J., 29, 1912 (1935).-
- (18) JORDAN R.C. y FRYDE J., Metabolism, 32, 279 (1938).-
- (19) REINECKE R.M., J. Biol. Chem., 142, 487 (1942).-
- (20) IHG y PECHMANN, Chemikerktag, 25, 451 (1885); cit.por (32).-
- (21) van CREVELD S., Arch. neerl. Physiol., 13, 521 (1928); cit.por C.A. (1929).--
- (22) RADT P., Biochem. Z., 198, 195 (1928).-

- (23) CORLEY R. C., J. Biol. Chem., **81**, 81 (1929).-
- (24) OPPEL W. W., Biochem. Z., **229**, 8 (1930).-
- (25) STEINITZ H. y von RIESEN J., Biochem. Z., **252**, 201 (1932).-
- (26) PATTERSON J., Biochem. Z., **29**, 1398 (1935).-
- (27) HERBERT F. K., Biochem. J., **32**, 815 (1938).-
- (28) ALVING A. S., RUBIN J. y MILLER B. F., J. Biol. Chem., **127**, 609 (1939)
- (29) CORCORAN A. C. y PAGE I. H., J. Biol. Chem., **127**, 601 (1939).-
- (30) HARRISON H. E., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **49**, 111 (1942).-
- (31) KARVONEN M. J. y MALM M., Scand. J. of Clin. Inv., **7** (4), 305 (1955);
cit. por A. B. T. vol. IV, Nº 2 (1956).-
- (32) MARENZI A., CARDINI C., BANFI R. y VILLALONGA F., Bioquímica Analítica Cuantitativa, Ed. El Ateneo, Buenos Aires (1947).-

C A P I T U L O - V -

RESULTADOS EXPERIMENTALES

Los métodos mencionados en el capítulo anterior se refieren en general a la determinación de levulosa en líquidos biológicos, pero presentan el inconveniente de que la glucosa interfiere en mayor o menor proporción en los mismos y sólo resultan efectivos cuando se utilizan para la valoración de levulosa en sangre, la cual contiene pequeñas cantidades de glucosa con respecto a las cantidades que suelen aparecer en orina.-

Por otra parte, cuando se efectúan determinaciones en presencia de glucosa, se opta por eliminar a ésta por fermentación previa, especialmente en los métodos basados en el empleo de la difenilamina. Según Ranney y Mc Cunne (1), es indispensable una fermentación previa cuando se utiliza este reactivo.-

Por ello, estos métodos no resultan prácticos en su aplicación a la investigación corriente de levulosa, como por ejemplo en los análisis de rutina de orina, dado que este glúcido se encuentra generalmente acompañado de cantidades variables de glucosa. Según Hawk (2), esto último ocurre siempre salvo en los casos de levulosurias puras.-

Estas levulosurias pueden ser debidas a insuficiencias hepáticas, a trastornos del organismo que impiden un correcto metabolismo de la levulosa ingerida, a un umbral renal bajo para dicho glúcido o a la ingestión de grandes cantidades del mismo, lo que hace indispensable disponer de una reacción sencilla que no presente el inconveniente de las arriba mencionadas y permita determinar cualitativamente si el hidrato de carbono presente en una orina (reconocible mediante la reacción de Fehling o la de Benedict), es glucosa o levulosa.-

Las dos técnicas empleadas corrientemente para tal fin son las de Seliwanoff y Borchardt, pero dados los resultados dispares obtenidos con estas reacciones, pensamos que sería conveniente investigar

dentro de qué límites de concentraciones de levulosa y glucosa eran efectivas dichas reacciones y observar si realmente se producían falsas reacciones positivas.-

Consideramos también la posibilidad de adaptar alguna reacción de las descritas anteriormente, a la investigación de levulosa en líquidos biológicos, sobre todo en orina.-

Para ello comenzamos por el estudio de la reacción del ácido cromotrópico, observando que si bien esta reacción es aplicable a la investigación de levulosa en soluciones puras, no lo es en orina, dado que produce coloraciones poco específicas debido al empleo de ácido sulfúrico; hecho que comprobamos tratando varias orinas con dicho ácido en la concentración fijada por el método, pero sin agregar ácido cromotrópico y obteniendo coloraciones semejantes a las descritas como índices de un resultado positivo.-

Con el objeto de evitar este inconveniente, diluímos el ácido sulfúrico utilizado, con lo cual se consiguió evitar en la mayor parte de los casos esas coloraciones inespecíficas, pero con el resultado de que cuando tratamos de efectuar la investigación de levulosa en solución pura con ácido cromotrópico y ácido sulfúrico diluido, no obtuvimos resultados positivos. Por esta causa no intentamos realizar experiencias con la reacción basada en el empleo de cisteína y carbazol, ya que también se efectúa en medio sulfúrico. Probablemente las dificultades ya mencionadas experimentadas por Tashiro y Tietz (loc.cit.), cuando intentaron aplicar su método a la determinación de levulosa en orina se debieron al hecho de trabajar en medio sulfúrico.-

Respecto de la reacción basada en el empleo del ácido pirogalol-carbónico, no nos fué posible llevarla a cabo por carecer de dicho reactivo y no haber podido obtener buenos resultados cuando intentamos

prepararlo de acuerdo al método descrito en el tratado de von Richter (3), cuyo estudio pensamos continuar más adelante.-

Debido a que el método de Roe no resulta práctico para una investigación corriente; que cantidades de glucosa superiores a 3 gramos por litro interfieren en el método y al hecho de que como ejemplos de técnicas basadas en el empleo de resorcina teníamos las ya mencionadas de Seliwanoff y Borchardt, nos abocamos al estudio de estas últimas.-

En cuando al método de la difenilamina, pensamos que dadas las características del mismo, sería posible fijar las condiciones de máxima sensibilidad que nos permitieran aplicarla como reacción cualitativa para la investigación de levulosa en líquidos biológicos.-

Comenzamos por el estudio de las técnicas de Seliwanoff y Borchardt y más tarde el de la reacción de la difenilamina. A continuación pasaremos a transcribir los resultados obtenidos.-

REACCION DE SELIWANOFF.-

En la obra de Morse (4) se menciona el hecho de que si bien se suele hacer referencia a la reacción de Seliwanoff como técnica de investigación de levulosa, es mas bien una prueba para cetosas en general e indica que es necesario realizar la prueba ateniéndose estrictamente a las instrucciones, pues las aldosas pueden dar reacciones débilmente positivas.-

Respecto al mecanismo de la reacción de Seliwanoff, cree posible que ocurra lo siguiente: el efecto de un ácido sobre cualquier hexosa, especialmente sobre las cetosas, difiere del de las pentosas y da lugar a la formación de dos tipos de sustancias características, que en el caso de la levulosa serían el ácido levulínico y un derivado del furfural conocido con el nombre de hidroximetilfurfural. Este último se condensaría con la resorcina dando la sustancia coloreada de la reacción de

Seliwanoff.-

Por otra parte, el ácido levulínico podría adoptar una estructura del tipo de la del tiofeno y condensarse con el hidroximetilfurfural, dando un compuesto que sería uno de los factores de la producción del color.-

En el libro citado, se detalla un reactivo de Seliwanoff constituido por 0,05 gramos de resorcina disueltos en 200 ml. de ClH al 50 %.

El procedimiento allí indicado es el siguiente: Colocar 5 ml. del reactivo y agregar algunas gotas del líquido en el cual se quiere investigar levulosa. Calentar el contenido del tubo hasta ebullición. Si existe levulosa se produce un color rojo y un precipitado parduzco. El precipitado puede ser filtrado y redisuelto en etanol concentrado. Si se observa dicha solución por medio de un espectroscopio, aparece una banda o serie de bandas características en la región del amarillo o del verde-~~amarillo~~.-

En el tratado de Hawk (loc.cit.) la reacción de Seliwanoff, se encuentra descripta en la forma siguiente:

Reactivo: 0,05 gr. de resorcina se disuelven en 100 ml. de ácido clorhídrico diluido (1 volumen de ClH más 2 volúmenes de H₂O).

Procedimiento: A 5 ml. del reactivo se agregan algunas gotas de orina y se calienta a ebullición durante un tiempo no mayor de 30 segundos. En presencia de levulosa se obtiene un color rojo y la formación de un precipitado del mismo color que debe ser soluble en etanol, comunicando a éste un color rojo brillante.-

Con respecto a las precauciones que deben tenerse en cuenta cuando se efectúa la reacción, hace las siguientes consideraciones:

a) La concentración del ácido clorhídrico no debe ser mayor del 12 %.

- b) No se debe prolongar el calentamiento más de 30 segundos, debido a que en el caso de encontrarse presente glucosa se obtienen reacciones positivas falsas.-
- c) El precipitado debe ser soluble en etanol de 96° con producción de un color rojo brillante.-

Con respecto a la coloración que desarrolla la glucosa, Hawk supone que se debe posiblemente a una transformación de la misma en levulosa por acción del ácido clorhídrico.-

El reactivo utilizado para nuestras experiencias fué preparado según Levinson y Mac Fate (5) ya que concuerda con el indicado por Hawk.

Reactivos:

- 1) Reactivo de Seliwanoff: Se disuelven 0,15 gramos de resorcina p.a. en una mezcla de 100 ml. de ClH. p.a. y 200 ml. de agua destilada.-
- 2) Alcohol etílico de 96° p.a.

Procedimiento: A 5 ml. del reactivo de Seliwanoff, colocados en un tubo de ensayo, agregar 6 a 8 gotas de orina y calentar hasta ebullición. Hervir durante no más de 20 a 30 segundos. Observar el color del líquido y si se produce o no precipitado. Si se forma precipitado separar el líquido sobrenadante y agregar 4 ó 5 ml. de etanol. Mezclar y observar el color del etanol.-

Interpretación: Un resultado positivo está indicado por la producción de un color rojo y la separación de un precipitado del mismo color, después de no más de 30 segundos de ebullición.

El precipitado debe disolverse en etanol confiriéndole un color rojo brillante.

No debe hervirse más de 30 segundos, pues en caso de hacerlo, pequeñas cantidades de glucosa pueden dar resultados positivos.-

Concentraciones de glucosa superiores al 20o/oo dan reacciones positivas.-

A fin de determinar el límite de sensibilidad de esta reacción, preparamos una solución de levulosa al 10 o/oo en agua destilada saturada de ácido benzoico. Efectuamos diluciones de la misma, de manera de obtener soluciones con las concentraciones que se detallan en el CUADRO No. 1, y en el cual se consignan los promedios de los resultados conseguidos en varias series de determinaciones.-

CUADRO No. 1

LIMITE DE SENSIBILIDAD DE LA REACCION DE SELIWANOFF

Solución de levulosa	Formación de precipitado.	Desarrollo de color.	Resultado.
gr/litro			
10	Positivo	Positivo	Positivo
9	Positivo	Positivo	Positivo
8	Positivo	Positivo	Positivo
7	Positivo	Positivo	Positivo
6	Positivo	Positivo	Positivo
5	Positivo	Positivo	Positivo
4	Positivo	Positivo	Positivo
3	Positivo	Positivo	Positivo
2	Negativo(x)	Positivo	Negativo
1	Negativo	Positivo	Negativo
0,5	Negativo	Posit.débil	Negativo
0,1	Negativo	Negativo	Negativo

(x). Consignamos como negativo el resultado obtenido con la solución de levulosa al 2 o/oo debido a que si bien se formó en la mayoría de los casos un pequeño precipitado, al ser disuelto en alcohol no le

confirió color rojo brillante.-

Para determinar el máximo de glucosa que puede encontrarse presente sin que se produzca reacción positiva con el reactivo de Seliwanoff, se preparó una solución de glucosa al 100 o/oo en agua destilada saturada de ácido benzoico y se efectuaron las diluciones que se detallan en el CUADRO No. 2, en el cual se incluyen los promedios de los resultados obtenidos.-

CUADRO No. 2

CONCENTRACIONES MAXIMAS DE GLUCOSA ADMISIBLES
CUANDO SE EFECTUA LA REACCION DE SELIWANOFF

Solución de glucosa	Formación de precipitado	Desarrollo de color	Resultado
gr/litro.			
10	Negativo	Positivo	Negativo
20	Negativo	Positivo	Negativo
30	Negativo	Positivo	Negativo
40	Negativo	Positivo	Negativo
50	Negativo	Positivo	Negativo
60	Negativo	Positivo	Negativo
70	Negativo	Positivo	Negativo
80	Negativo	Positivo	Negativo
90	Negativo	Positivo	Negativo
100	Negativo	Positivo	Negativo

Observamos que en las experiencias realizadas sobre las soluciones de glucosa con concentraciones comprendidas entre 30 y 100 gramos por mil se desarrollaron coloraciones similares a las obtenidas con soluciones de levulosa de 1 a 2 gramos por mil.-

A fin de verificar si los resultados obtenidos con soluciones de levulosa en agua destilada coincidían con los de soluciones de levulosa en orina, preparamos soluciones de concentraciones similares a las descritas en los cuadros 1 y 2, pero utilizando diversas muestras de

orina en lugar de agua destilada.-

Los resultados coincidieron en muchos casos con los obtenidos en las experiencias con levulosa en solución pura, pero en otros casos pudo observarse que las coloraciones desarrolladas eran distintas de las que hubieran correspondido de acuerdo a la cantidad de azúcar agregado, siendo por lo general más intensas.-

Por otra parte muchas orinas a las cuales no se había agregado levulosa ni glucosa, si bien no produjeron precipitado, dieron coloraciones semejantes a las producidas por soluciones de levulosa de concentraciones comprendidas entre 0,5 y 1 gramo por mil.-

Para descartar la posibilidad de que la levulosa se encontrara presente en dichas orinas, se efectuaron sobre las mismas, investigaciones de azúcares reductores mediante los reactivos de Fehling y de Benedict, obteniéndose resultados negativos.-

De esto se desprende que existen orinas en las cuales se encuentran sustancias capaces de desarrollar color con el reactivo de Seliwanoff y que no son azúcares reductores.-

REACCION DE BORCHARDT.-

Según Hawk (loc. cit.) la reacción se efectúa de la siguiente manera:

Se colocan 5 ml. de orina en un tubo de ensayo y se agrega igual volumen de ácido clorhídrico al 25 % (2 volúmenes de ácido más 1 volumen de agua) y algunos cristales de resorcina.-

Se calienta a ebullición hasta aparición de color rojo y se enfría con agua corriente. Se transfiere el contenido a una cápsula y se alcaliza ligeramente con HCl sólido.-

Se coloca el contenido de la cápsula en un tubo de ensayo y se agregan 2 a 3 ml. de éter etílico,- Se agita fuertemente y se deja luego

que se separen las dos capas.-

Interpretación: En presencia de levulosa el éter toma color amarillo.

En este tratado se indica que los únicos componentes de la orina que interfieren en la reacción, son los nitritos y el indican, pero solamente cuando ambos se encuentran presentes simultáneamente; en cuyo caso aconseja acidificar la orina con ácido acético y calentar a ebullición durante 1 minuto para eliminar los nitritos.-

Si el indican se encuentra presente en gran cantidad puede comunicar color azul al éter, enmascarando el color amarillo desarrollado por la levulosa. Esto puede evitarse eliminando el indican por medio de la reacción de Obermeyer, separando la capa clorofórmica por decantación. La capa restante se diluye con un tercio de su volumen de agua destilada, efectuándose entonces la reacción de Borchardt.-

También interfieren en la reacción de Borchardt la santonina y el ruibarbo que pudieran haber sido ingeridos por el paciente.-

Hawk, da como límite de sensibilidad para esta reacción el de 1:2000. La reacción de Borchardt según lo descrito en las obras de Kolmer (6) y de Todd y Sandford (7), se efectúa en forma similar a la del tratado de Hawk pero haciendo la observación acerca de que no debe prolongarse el calentamiento por un tiempo mayor de 30 segundos.-

De acuerdo a nuestras experiencias con la reacción de Borchardt, podemos decir que la mejor forma de efectuar la misma, consiste en calentar hasta la aparición de color rojo, siempre que el tiempo necesario no sobrepase los 30 segundos. Es decir que en caso de que se obtenga el color rojo a los 10 segundos, por ejemplo, no conviene calentar hasta que transcurran los 20 segundos restantes para completar el período de calentamiento, pues hemos observado que, de continuar calentando durante esos 20 segundos más, no se obtiene mayor ventaja y en cambio al-

gunas veces trae inconvenientes como por ejemplo, la formación de un precipitado de aspecto bituminoso durante la neutralización con el HOK, que a menudo dificulta la posterior extracción con éter del producto coloreado.

En cambio, en caso de no obtener color en los primeros segundos, debe continuarse calentando hasta llegar a los 30 segundos de comenzada la ebullición, pero no sobrepasando ese tiempo en ningún caso.-

Observamos también que es muy importante para la correcta ejecución de este ensayo, ajustar el pH entre 6 y 7, pues en el caso de tratar de efectuar la extracción sobre medios más ácidos o más alcalinos, ello no se consigue, quedando el éter incoloro, o bien, en otros casos, el color se extrae en forma incompleta.-

Por otra parte, puede reconocerse cuando se alcanza el pH óptimo, de la siguiente manera:

A medida que se agrega el HOK, el color rojo de la solución va disminuyendo en intensidad, alcanzando un mínimo en el intervalo de pH mencionado, para luego adquirir un tono pardo-rojizo más oscuro. Es necesario interrumpir el agregado de HOK antes de la aparición de este color más oscuro pues es índice de alcalinidad, y en estas condiciones el producto coloreado no pasa a la capa etérea.-

A fin de determinar el límite de sensibilidad de esta reacción, se utilizaron las soluciones de levulosa descritas en el CUADRO No. 3, obtenidas por dilución de una solución de levulosa al 1 o/oo en agua destilada saturada de ácido benzoico.-

CUADRO No. 3LIMITE DE SENSIBILIDAD DE LA REACCION DE BORCHARDT

Solución de Levulosa	Resultado
gr/litro	
1,0	Positivo
0,9	Positivo
0,8	Positivo
0,7	Positivo
0,6	Positivo
0,4	Positivo
0,3	Positivo
0,2	Negativo
0,1	Negativo

Para determinar la máxima concentración de glucosa que puede hallarse presente sin que se produzca reacción positiva con la técnica de Borchardt, se procedió a efectuar dicha reacción sobre soluciones de glucosa con las concentraciones que se detallan en el CUADRO No. 4, obteniéndose los siguientes resultados.-

CUADRO No. 4

CONCENTRACIONES MAXIMAS DE GLUCOSA ADMISIBLES
CUANDO SE EFECTUA LA REACCION DE BORCHARDT

Solución de glucosa	Resultado
gr/litro	
1	Negativo
5	Negativo
10	Negativo
15	Negativo
20	Posit. débil
25	Positivo
30	Positivo
40	Positivo
50	Positivo

~~Habiéndose efectuado posteriormente ensayos sobre soluciones de levu-~~
losa y de glucosa en orina con concentraciones de dichos glúcidos igua-
les respectivamente a las detalladas en los CUADROS No. 3 y 4, obtu-
vimos resultados similares a los obtenidos con soluciones puras de di-
chos azúcares, los cuales se encuentran consignados en dichos cuadros.-

REACCION CON DIFENILAMINA.-

De acuerdo a lo observado por los autores que trabajaron con reactivos conteniendo difenilamina, quienes afirman que la levulosa desarrolla el color azul más rápidamente que la glucosa, pero con el inconveniente que esta última generalmente interfiere cuando se halla presente, pensamos que probablemente pudiera evitarse ese inconveniente disminuyendo el tiempo de calentamiento.-

Seguimos las técnicas mencionadas por dichos autores y detalladas en el capítulo anterior, y utilizamos los reactivos allí descritos habiendo comprobado que si bien la levulosa desarrolla perfectamente el color, también lo hace la glucosa aún cuando se encuentra presente en pequeñas cantidades.-

Si bien es cierto que las coloraciones desarrolladas por la glucosa son mucho más débiles que las desarrolladas por la levulosa, no dejan de ser un inconveniente para la aplicación de dicho método a la investigación de este último glúcido.-

Tratamos de obtener mejores resultados disminuyendo el tiempo de calentamiento, pero tropezamos con el inconveniente de que no se desarrollaba color cuando se trabajaba con soluciones poco concentradas de levulosa.-

Supusimos entonces que podría ser factible encontrar las condiciones óptimas para obtener desarrollo de color en un tiempo mínimo, variando las proporciones de los reactivos.-

De encontrar estas condiciones existiría la posibilidad de reconocer pequeñas cantidades de levulosa aún en presencia de apreciables cantidades de glucosa, evitando así el tener que efectuar una fermentación previa como indicaran Ranney y Mc Gunne (1).-

Dado que la difenilamina es muy poco soluble en agua pero muy soluble en etanol, la concentración de la misma estará condicionada por la proporción relativa de etanol y ácido clorhídrico que existe en el reactivo.-

Por otra parte hemos comprobado que dicha relación influye en el tiempo de calentamiento necesario para obtener desarrollo del color.

Para determinar las condiciones bajo las cuales es necesario emplear un tiempo menor de calentamiento para lograr la aparición del color mínimo que puede ser observable, se efectuaron diez determinaciones según se describe a continuación.-

Reactivos empleados:

- 1) Solución de levulosa (Merck) al 1 o/oo en agua destilada saturada de ácido benzoico.-
- 2) Solución saturada de difenilamina en alcohol etílico de 96°.
- 3) Acido clorhídrico concentrado p.a.

Procedimiento:

Se efectuaron mezclas de los reactivos 2 y 3 en las proporciones que se detallan en el CUADRO No. 5.-

CUADRO No. 5SOLUCIONES DE DIFENILAMINA EN DIVERSOS MEDIOS
DE ETANOL-ACIDO CLORHIDRICO.

Solución No.	Solución de difenilamina	ClH conc.
	ml.	ml.
1	0	20
2	1	19
3	2	18
4	3	17
5	4	16
6	5	15
7	6	14
8	7	13
9	8	12
10	9	11
11	10	10
12	11	9
13	12	8
14	13	7
15	14	6
16	15	5
17	16	4
18	17	3
19	18	2
20	19	1
21	20	0

Una vez efectuadas las mezclas se dejó estar en reposo durante 72 horas para permitir la precipitación de la difenilamina que se encontraba en exceso de acuerdo a su solubilidad en los medios hidroalcohólicos obtenidos por la mezcla de ambos reactivos. Separando el líquido sobrenadante, obtuvimos soluciones concentradas de difenilamina en diversos medios con distinta relación etanol-ácido clorhídrico.-

Preparamos las soluciones en esta forma de manera de poder tener

en cada una de ellas el máximo de difenilamina posible, dado que la concentración de difenilamina debe ser suficiente como para que en su reacción con la levulosa se obtengan coloraciones proporcionales a la concentración de esta última.-

Para efectuar la reacción propiamente dicha, se tomaron 21 tubos de ensayo, colocando en cada uno de ellos 1 ml. de la solución de difenilamina correspondiente. Se agregó a todos los tubos 0,1 ml. de la solución de levulosa, agitando suavemente para homogeneizar.-

Colocamos los tubos de a uno por vez en un vaso de precipitación conteniendo agua hirviente, observando en cada caso la solución contenida en el tubo mientras se efectuaba el calentamiento. A fin de mejorar la observación colocamos una cartulina blanca detrás del vaso de precipitación.-

Las experiencias se realizaron controlando el tiempo que tardaba en aparecer coloración apreciable a simple vista. Debido a los errores de apreciación provocados por una coloración tan débil, no es posible asegurar la exactitud de los tiempos observados. Sin embargo, estas experiencias fueron de gran utilidad ya que nos permitieron determinar aproximadamente cuál era el intervalo mínimo de tiempo necesario y en qué condiciones era posible obtener desarrollo de color en dicho tiempo. Como promedio de estas experiencias podemos afirmar que dicho tiempo está comprendido entre 40 a 50 segundos de comenzado el calentamiento para las proporciones establecidas en las soluciones No. 10, 11 y 12 (CUADRO No. 5).-

A fin de poder comprobar con mayor exactitud la veracidad de estos datos se efectuaron otras diez experiencias en las cuales se usaron las mismas soluciones antes mencionadas, empleando las mismas proporciones de reactivo y solución de levulosa pero calentando todos los tubos simultáneamente durante un tiempo un poco superior al mínimo,

es decir durante 1 minuto, a fin de obtener coloraciones más nítidas.-

Luego de un minuto de calentamiento se enfriaron los tubos y se colocaron 0,4 ml. del contenido de cada tubo en sendas cavidades de placas de toque de porcelana, pudiéndose comprobar que la máxima intensidad del color se observaba en la muestra correspondiente a la solución No. 10.-

En base a esto adoptamos para nuestra reacción un reactivo que reuniera las condiciones del de dicha muestra (11 ml. de ClH conc. adicionados de 9 ml. de solución alcohólica de difenilamina).-

A fin de evitar el inconveniente de una precipitación abundante de difenilamina debida al uso de la solución saturada de la misma en alcohol, se efectuaron mezclas de 11 ml. de ácido clorhídrico concentrado con soluciones alcohólicas con distintas concentraciones de difenilamina, eligiendo aquella que conservada durante 72 horas sólo produjo escasos cristales de difenilamina precipitada.-

Pudimos así llegar a obtener la composición que consideramos óptima para el reactivo constituido por difenilamina, etanol y ácido clorhídrico y que resultó ser:

Acido clorhídrico conc.	11 ml.
Etanol	9 ml.
Difenilamina	0,24 gr.

Para nuestras experiencias preparamos una solución constituida por 2,4 gramos de difenilamina (Merck) disueltos en 90 ml. de etanol de 96°, a los cuales se agregan 110 ml. de ClH concentrado.

Una vez fijadas las proporciones de los componentes del reactivo a utilizar, procedimos a determinar el límite de sensibilidad de este reactivo para la determinación de levulosa.-

Se prepararon soluciones de distintas concentraciones de levulosa, de las cuales se agregó 0,1 ml. a una serie de tubos de ensayo en los

cuales se colocara previamente 1 ml. del reactivo de difenilamina.-

Una vez homogeneizado el contenido de los tubos, se colocaron estos últimos simultáneamente durante 1 minuto en un baño de agua hirviendo.-

Pasado ese tiempo se retiraron del agua hirviendo, enfriando rápidamente por inmersión en agua fría, para interrumpir el desarrollo del color.-

Los resultados que hemos obtenido se encuentran descriptos en el cuadro No. 6 en el cual se encuentran consignados los promedios de las determinaciones efectuadas.-

CUADRO No. 6

LIMITE DE SENSIBILIDAD DE LA REACCION CON DIFENILAMINA

Solución de levulosa	Resultado
gr/litro	
5	Fuertemente positivo
4	Fuertemente positivo
3	Fuertemente positivo
2	Positivo neto
1	Positivo neto
0,9	Positivo
0,8	Positivo
0,7	Positivo
0,6	Positivo
0,5	Positivo
0,4	Positivo
0,3	Positivo débil.
0,2	Positivo débil
0,1	Positivo muy débil.

Consideramos por lo tanto como límite de sensibilidad de esta reacción una concentración de levulosa de 0,1 gr/litro.

Para determinar el máximo de glucosa que puede hallarse presente sin que se produzca reacción positiva con el reactivo de difenilamina se procedió a efectuar dicha reacción sobre las soluciones de glucosa que se detallan en el CUADRO No. 7, en el cual se encuentran consignados los promedios de los resultados obtenidos.-

CUADRO No. 7

CONCENTRACIONES MAXIMAS DE GLUCOSA ADMISIBLES
CUANDO SE EFECTUA LA REACCION CON DIFENILAMINA

Solución de levulosa ^{glucosa}	Resultado
gr/litro	
10	Negativo
20	Negativo
30	Negativo
35	Posit. débil
40	Positivo
50	Positivo
60	Positivo
70	Positivo
80	Positivo
90	Positivo
100	Positivo

Las conclusiones que pudimos extraer de estas experiencias podemos resumirlas así:

- a) Las soluciones cuyas concentraciones de glucosa se encuentran comprendidas entre 50 y 100 gramos por mil dan coloraciones similares a las obtenidas con solución de levulosa al 1 o/oo.-
- b) Las soluciones cuyas concentraciones de glucosa se encuentran comprendidas entre 30 y 50 gramos por mil dan coloraciones similares a las obtenidas con soluciones con concentraciones de levulosa comprendidas entre 0,1 y 0,5 gramos por mil.-

c) Las soluciones cuyas concentraciones de glucosa se encuentran por debajo de 30 gramos por mil, dan reacción negativa.-

En las experiencias que efectuamos en forma similar con soluciones de ambos azúcares en orina pudimos comprobar que debido a la interferencia del color de las mismas con el color azul desarrollado se obtenían coloraciones azul-verdosas que si bien guardaban entre sí una relación de intensidades similar a la observada en las experiencias con ambos azúcares en solución pura, no permitían una comparación exacta con los mismos.-

Por otra parte el color desarrollado por una dada concentración de azúcar dependía de la intensidad del color de la orina empleada para disolverlo.-

Por tal causa y a fin de obtener resultados uniformes, decidimos efectuar las reacciones con difenilamina sobre desproteinizados obtenidos de acuerdo al método de Somogyi.-

Como el límite de sensibilidad de la reacción corresponde a 0,1 gr. por mil, de efectuar el método de Somogyi tal cual como lo describiera el autor efectuando una dilución 1:10 de la orina, el límite de sensibilidad de esta reacción para determinar levulosa en orina hubiera sido de 1 gramo por litro.-

Por lo tanto efectuamos la desproteínización con los reactivos de Somogyi pero haciendo una dilución de 1:5 y llevando por lo tanto el límite de sensibilidad a 0,5 gramos por litro, perfectamente conveniente para las necesidades corrientes.-

Resumiendo, la reacción con difenilamina se efectuó de la manera siguiente.-

Reactivos:

- 1) Solución I de Somogyi: $\text{SO}_4\text{Zn} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ al 10 % en agua destilada.-

2) Solución II de Somogyi: NaOH 0,5 N.

Ambas soluciones deben ser preparadas de forma que 10 ml. de la solución I, diluidos a 50-75 ml. con agua destilada, requieran el agregado de 10,8 a 11,2 ml. de la solución II para obtener un color rosado permanente con fenolftaleína.-

3) Solución alcohólica de difenilamina: Disolver 2,4 gramos de difenilamina en 90 ml. de etanol de 96°.-

4) Acido clorhídrico concentrado:p.a.

5) Reactivo de difenilamina: Se mezclan 90 ml. de la solución alcohólica de difenilamina con 110 ml. de ácido clorhídrico concentrado. No debe conservarse más de treinta días, guardado en un frasco color caramelo bien tapado. Es preferible preparar cada vez la cantidad que se ha de necesitar en el momento de su uso.-

Procedimiento:

A 1 ml. de orina colocados en un tubo de ensayos se agregan 2 ml. de agua destilada y 1 ml. de la solución No. I de Somogyi, agitando para homogeneizar. Se agrega 1 ml. de la solución No. II agitando vigorosamente. Se filtra o centrifuga.-

Se coloca 1 ml. del reactivo de difenilamina en un tubo de ensayo. Se agrega 0,1 ml. de filtrado. Se coloca el tubo durante 1 minuto exactamente en un baño de agua hirviendo. Una vez transcurrido el minuto, se retira rápidamente el tubo del baño de agua hirviendo colocándolo inmediatamente en agua fría. Se observa el color del líquido contenido en el tubo.-

Paralelamente y en la misma forma conviene preparar un testigo, utilizando agua destilada en lugar de orina.-

Interpretación: En caso de existir levulosa se desarrolla un color azul

violáceo.-

En la aplicación de los métodos de Seliwanoff, Borchardt, y de la difenilamina a la investigación de levulosa en orinas normales que presentaban ensayo de Fehling y Benedict negativos, se obtuvieron los resultados consignados en el cuadro No. 8.-

CUADRO No. 8

Muestra No.	Ensayo de Seliwanoff	Ensayo de Borchardt	Ensayo con difenilamina
1	Negativa	Negativa	Negativa
2	Negativa	Negativa	Negativa
3	x Negativa	Negativa	Negativa
4	Negativa	Negativa	Negativa
5	Negativa	Dudosa	Negativa
6	x Negativa	Positiva	Negativa
7	Negativa	Negativa	Negativa
8	x Negativa	Negativa	Negativa
9	x Negativa	Positiva	Negativa
10	x Negativa	Negativa	Negativa
11	Negativa	Negativa	Negativa
12	x Negativa	Negativa	Negativa
13	Negativa	Positiva	Negativa
14	Negativa	Negativa	Dudosa
15	x Negativa	Dudosa	Negativa
16	Negativa	Negativa	Negativa
17	x Negativa	Negativa	Negativa
18	Negativa	Positiva	Negativa
19	Negativa	Negativa	Dudosa
20	x Negativa	Positiva	Negativa
21	x Negativa	Positiva	Negativa
22	x Negativa	Negativa	Negativa
23	Negativa	Dudosa	Negativa
24	Negativa	Positiva	Negativa
25	x Negativa	Positiva	Negativa

Muestra No.	Ensayo de Seliwanoff	Ensayo de Borchardt	Ensayo con difenilamina
26	Negativa	Negativa	Negativa
27	Negativa	Dudosa	Negativa
28	x Negativa	Positiva	Negativa
29	Negativa	Negativa	Negativa
30	x Negativa	Negativa	Negativa
31	Negativa	Negativa	Negativa
32	x Negativa	Negativa	Negativa
33	Negativa	Posit.débil	Negativa
34	x Negativa	Dudosa	Negativa
35	Negativa	Negativa	Dudosa
36	x Negativa	Negativa	Negativa
37	Negativa	Posit.débil	Negativa
38	x Negativa	Negativa	Negativa
39	Negativa	Posit.débil	Negativa
40	Negativa	Negativa	Negativa
41	x Negativa	Negativa	Negativa
42	x Negativa	Posit.débil	Negativa
43	Negativa	Negativa	Negativa
44	Negativa	Negativa	Negativa
45	Negativa	Dudosa	Negativa

Hemos observado que muchas orinas (marcadas con x) a pesar de dar reacción negativa con el reactivo de Seliwanoff, dado que no se obtuvieron precipitados, desarrollaron coloraciones equivalentes a las obtenidas con soluciones de levulosa con concentraciones de la misma comprendidas entre 0,5 y 1 gramo por mil.-

Muchas orinas dieron reacciones positivas con el reactivo de Borchardt, siendo por lo general orinas muy coloreadas.-

A continuación, procedimos a aplicar las reacciones de Seliwanoff, Borchardt y difenilamina a varias muestras de orina con cantidades variables de glúcidos, dosadas según el método de Fehling cuantitativo.-

Los resultados obtenidos se encuentran consignados en el CUADRO No. 9

CUADRO No. 9

APLICACION DE LAS REACCIONES ESTUDIADAS A LA
INVESTIGACION DE LEVULOSA EN ORINAS DIABETICAS

Muestra No.	Concentración de glúcidos gr/litro	R E A C C I O N		
		Seliwanoff	Borchardt	Difenilamina
1	Vestigios	Negativa	Negativa	Negativa
2	Vestigios	Negativa	Negativa	Posit.débil
3	Vestigios	Negativa	Negativa	Negativa
4	Vestigios	Negativa	Negativa	Posit.débil
5	Vestigios	Negativa	Negativa	Negativa
6	Vestigios	Negativa	Positiva	Dudosa
7	1,15	Negativa	Negativa	Negativa
8	1,25	Negativa	Negativa	Negativa
9	2,25	Negativa	Negativa	Negativa
10	6,00	Negativa	Negativa	Negativa
11	6,25	Negativa	Positiva	Negativa
12	10,00	Negativa	Negativa	Negativa
13	15,00	Negativa	Positiva	Negativa
14	20,00	Negativa	Positiva	Positiva
15	30,00	Negativa	Posit.débil	Negativa
16	31,00	Negativa	Posit.débil	Negativa
17	50,00	Negativa	Positiva	Positiva
18	50,00	Negativa	Positiva	Negativa
19	50,00	Negativa	Positiva	Negativa
20	70,00	Negativa	Positiva	Positiva

Durante las experiencias cuyos resultados se encuentran detallados en el CUADRO No. 9, pudimos observar varios detalles interesantes.-

Si bien es cierto que ajustándonos a las prescripciones de la reacción de Seliwanoff con respecto a que es necesaria la formación de un precipitado para que se considere positiva, consideramos como negativos los resultados obtenidos con dicha reacción, varias de las orinas produjeron desarrollo de un color equivalente al obtenido con

soluciones de levulosa de concentraciones comprendidas entre 0,5 y 1 gramo por litro; cosa que también ocurría con orinas que no contenían ningún glúcido, (CUADRO No. 8).-

Las muestras de orina correspondientes a los números 15,16,17,18, 19 y 20 desarrollaron color con el reactivo de Borchardt, cosa explicable dado que las concentraciones de glucosa en esas muestras sobrepasan las concentraciones máximas admisibles por esa reacción. El reactivo de Borchardt dió también reacción positiva con las orinas 6 y 13, hecho que atribuímos a que dichas orinas se encontraban fuertemente coloreadas, cosa que, como habíamos comprobado en las experiencias correspondientes al CUADRO No.8, resultaba un inconveniente, debido a que en esos casos la reacción de Borchardt daba resultados positivos aún en ausencia de levulosa.-

Con respecto a la reacción de la difenilamina, comprobamos que las muestras de números 14,17 y 20 desarrollaron una coloración semejante a la obtenida con solución de levulosa al 1 o/oo, hecho compatible con lo observado por diversos autores respecto a que en las orinas diabéticas la levulosa acompaña frecuentemente a la glucosa.-

Respecto de las orinas 2 y 4, surgió el fenómeno interesante de que dichas orinas que normalmente se informarían como orinas con vestigios de glucosa, desarrollaban color con el reactivo de difenilamina, inclinándose por lo tanto a pensar que el hidrato de carbono presente era levulosa.-

Aplicación de la reacción de la difenilamina a la investigación de levulosa en diversas muestras de sangre.

Para efectuar el desproteínizado de las muestras de sangre, seguimos la técnica de Somogyi efectuando una dilución de la sangre de 1:10, debido a que efectuando la dilución 1:5 empleada para las muestras de orina no conseguimos obtener el volumen de filtrado necesario.-

Dadas las pequeñas cantidades de levulosa que aparecen en la sangre luego de la ingestión de la misma, observadas por los autores que efectuaron curvas de tolerancia con dicho azúcar, y teniendo en cuenta que de esas mismas concentraciones efectuamos una dilución al décimo para efectuar la desproteínización, descartamos los métodos de Seliwanoff y Borchardt por no ser lo suficientemente sensibles.-

Respecto de la reacción con difenilamina tal como la efectuamos para la investigación de levulosa en orina, comprobamos que tampoco posee la sensibilidad necesaria.-

Habiendo observado que el límite de sensibilidad aumenta con el tiempo de calentamiento y no existiendo el inconveniente mencionado para su aplicación a la orina referente a las cantidades apreciables de glucosa que suelen encontrarse presentes en la misma, consideramos la posibilidad de aumentar dicho tiempo de calentamiento.-

Teniendo en cuenta lo comprobado por varios autores respecto que los valores normales alcanzados a los 30 minutos de la ingestión oscilan entre 10 y 25 miligramos por ciento, consideramos que era necesario y suficiente que nuestra reacción fuera capaz de apreciar cantidades de levulosa del orden de 10 mg. por ciento.-

Esto resultaría factible aumentando el tiempo de calentamiento, siempre que lo hiciéramos por debajo del tiempo necesario para que cantidades de glucosa del orden de 100 mg por ciento, presentes normalmente en la sangre, desarrollen color.-

Para determinar el tiempo de calentamiento que reuniera ambas condiciones preparamos una solución de levulosa conteniendo 10 mg. de dicho azúcar por ciento y otra de glucosa conteniendo 100 mg de la misma por cien mililitros de solución.-

Sobre ambas soluciones efectuamos la técnica de Somogyi a fin de trabajar en condiciones similares a las que emplearíamos más tarde para la aplicación de la reacción a la investigación de levulosa en muestras de sangre.-

Efectuando la reacción de la difenilamina paralelamente sobre ambos filtrados y aumentando progresivamente el tiempo de calentamiento, pudimos observar que la solución de levulosa desarrollaba color luego de 4 minutos de calentamiento, mientras que la de glucosa recién lo hacía luego de 7 a 8 minutos.-

Por lo tanto consideramos que resultaba conveniente calentar durante 5 minutos ya que la glucosa no desarrollaba color mientras que el color desarrollado por la levulosa era más visible.

Una vez fijadas las nuevas condiciones para la investigación de levulosa en sangre por el método de la difenilamina, procedimos a realizarla sobre varias muestras de sangre de pacientes en ayunas. Los resultados obtenidos se encuentran consignados en el cuadro No.10.

CUADRO No. 10

APLICACION DE LA REACCION CON DIFENILAMINA

A LA INVESTIGACION DE LEVULOSA EN SANGRE DE PACIENTES EN AYUNAS

<u>Muestra No.</u>	<u>Resultado</u>	<u>Muestra No.</u>	<u>Resultado</u>
1	Negativo	11	Negativo
2	Negativo	12	Negativo
3	Negativo	13	Negativo
4	Negativo	14	Negativo
5	Negativo	15	Negativo
6	Negativo	16	Negativo
7	Negativo	17	Negativo
8	Negativo	18	Negativo
9	Negativo	19	Negativo
10	Negativo	20	Negativo

A fin de descartar la posibilidad de que los resultados negativos obtenidos se debieran a poca sensibilidad del método, paralelamente a cada una de las determinaciones consignadas en el cuadro No. 10, se efectuaron otras tantas en las cuales en lugar de agregar 7 ml. de agua destilada para obtener el filtrado libre de proteínas, se agregaron 6 ml. de agua destilada y 1 ml. de una solución conteniendo 10 mg. de levulosa por ciento, agregando por consiguiente la cantidad de levulosa necesaria para estar en las mismas condiciones en que se hubiera estado si la sangre hubiera poseído dicha concentración de levulosa.-
En todos los casos la reacción dió resultado positivo.-

Aplicación de la reacción de la difenilamina a muestras de sangre y orina de personas a las cuales se administró previamente levulosa.-

A fin de comprobar si los resultados obtenidos con muestras de sangre y orina agregadas de levulosa se reproducían cuando la reacción de la difenilamina se practicaba sobre dichos líquidos biológicos pertenecientes a personas que hubieran ingerido levulosa, procedimos a efectuar

las siguientes experiencias.-

La levulosa se administró por medio de 250 ml. de té liviano conteniendo 100 gramos de miel de abejas.-

Se solicitó a diez personas cuyas sangres y orinas se habían examinado previamente a fin de comprobar que no contenían levulosa, que ingirieron las soluciones de miel antes mencionadas.-

A los 45 minutos de la ingestión se extrajeron muestras de sangre de dichas personas, solicitando a las mismas que recogieran la orina eliminada durante las cuatro horas subsiguientes, remitiéndolas enseguida al laboratorio.-

Nueve de las diez muestras de sangre examinadas dieron reacción positiva con el reactivo de difenilamina. La muestra restante dió una reacción dudosa.-

Respecto de las reacciones efectuadas sobre las muestras de orina, pudimos observar que ocho de las mismas dieron reacciones positivas mientras que las restantes dieron reacciones negativas. Las orinas que dieron reacción negativa no produjeron reducción de los reactivos de Fehling y Benedict.-

Posibilidad de utilizar la reacción de la difenilamina como reacción cuantitativa.-

Como apéndice al presente trabajo, efectuamos algunos ensayos previos de orientación, con el fin de observar sus posibilidades como reacción cuantitativa.-

Dado que dejando estar los tubos en los cuales se han obtenido resultados positivos con el reactivo de difenilamina, se observa que el color aumenta lentamente con el tiempo, y previendo que en el caso de preparar una serie de testigos efectuando la reacción sobre muestras con distintas concentraciones de levulosa, estos cambiarían progresi-

vamente de color, consideramos la posibilidad de efectuar la reacción sobre una solución de levulosa al 5 o/oo pero calentando durante 20 minutos a fin de que se desarrollara el máximo de color posible, diluyendo luego la solución coloreada obtenida en forma tal de tener soluciones con color de intensidad decreciente que más tarde pudieran ser calibrados por comparación con los colores desarrollados por soluciones con distinta concentración de levulosa.-

Al efectuar nuestras experiencias en este sentido pudimos comprobar que las coloraciones conseguidas por dilución progresiva de la solución fuertemente coloreada obtenida como se explicó más arriba, no resultaban perfectamente comparables con las desarrolladas soluciones de distintas concentraciones de levulosa.-

Intentamos luego aplicar la reacción de la difenilamina a la formación de anillos que permitieran establecer una escala comparativa.

Habiendo tratado de formar anillos por superposición del reactivo y de la solución de levulosa cuidando de que no se mezclaran ambas capas vimos que durante el calentamiento se producía una difusión de las mismas.-

Tratamos de evitar este inconveniente procediendo a mezclar por partes iguales la solución de levulosa con una de sulfato de magnesio, a fin de hacerla más densa y conseguir una mejor separación de ambas capas.-

Los resultados obtenidos fueron similares a los anteriormente citados, por lo tanto decidimos emplear una serie de soluciones testigos de levulosa con las cuales se efectuaban reacciones paralelamente a la llevada a cabo sobre el desconocido. El escaso número de ensayos realizados (diez) no nos autoriza a sentar conclusiones definitivas, pero permite plantear la posibilidad de efectuar en el futuro, un estudio

más amplio al respecto.-

BIBLIOGRAFIA

- 1) RANNEY H. y MC CUNNE D.J. J. Biol, Chem., 150, 311 (1943)
- 2) HAWK , Practical Physiological Chemistry, pag. 469 -470, 8a. ed. (1923).
- 3) VON RICHTER V., The chemistry of the carbon compounds, vol. III. pág. 371, Elsevier Publishing Co., Inc., N. York (1946).
- 4) MORSE W. Applied biochemistry, pág. 170, Ed. W.B. Saunders. Co., Philadelphia (1927).-
- 5) LEVINSON S.A. y MAC FATE R.P. Diagnóstico clínico de laboratorio p. 435, 1a. ed. en cast. de la 4a. ed. inglesa, Ed. El Ateneo (1956).
- 6) KOLMER, Approved Laboratory Technic., pág 151-152, 2a. ed. (1938).
- 7) TODD J.C. y SANDFORD A.H. Diagnóstico clínico de laboratorio, pág. 116, Ed. E Marín y G. Campo, S.L. Madrid (1943).-

CONCLUSIONES

- 1) Se han estudiado varias técnicas propuestas por diversos autores para la investigación y valoración de levulosa en soluciones acuosas así como en sangre y orina. Los ensayos efectuados demuestran que algunas de ellas no son aplicables a la investigación de dicho glúcido en orina. Sólo hemos obtenido resultados aceptables con las reacciones de Seliwanoff, Borchardt y la reacción con difenilamina.-
- 2) Reacción de Seliwanoff.- Los ensayos que hemos efectuado revelan que, si bien resulta útil para investigar la presencia de levulosa en orina, presenta el inconveniente de ser poco sensible pues sólo acusa resultados positivos cuando la concentración de levulosa en orina es superior a 3 gramos por litro. No hemos obtenido interferencias debidas a la presencia de glucosa, aún en cantidades de 100 gramos por litro.-
- 3) Reacción de Borchardt.- Hemos comprobado que la reacción de Borchardt es más sensible que la anterior, pues revela la presencia de levulosa en orina cuando ésta existe en cantidades mayores de 0,3 gramos por litro. Los ensayos efectuados revelan que sólo resulta aplicable cuando no existe glucosa en la muestra, o bien si ésta se encuentra presente en cantidades menores de 20 gramos por litro. Esta reacción presenta el inconveniente de que ciertas orinas muy coloreadas, que no contienen azúcares reductores, dan reacciones positivas falsas. Hemos observado también, que es necesario ajustar el pH de la solución entre 6 y 7 antes de efectuar la extracción etérea, para lograr un pasaje completo de la materia coloreada al éter.-
- 4) En las experiencias efectuadas a fin de aplicar las reacciones de Seliwanoff y Borchardt a la investigación de levulosa en sangre no hemos obtenido resultados satisfactorios, tal vez por encontrarse las cantidades de levulosa presentes en la misma, por debajo del límite de sensibilidad de estas reacciones.-

5) Reacción con difenilamina.- Las técnicas descriptas por los autores que han trabajado con este reactivo no resultan aplicables a la investigación de levulosa cuando ésta se encuentra acompañada de cantidades apreciables de glucosa, pero el estudio de los factores que influyen en esta reacción, nos ha permitido determinar las condiciones óptimas para que dicho reactivo pueda ser empleado en la investigación de levulosa aún en presencia de apreciables cantidades de glucosa.-

La técnica seguida consistió en calentar a 100°C durante 1 minuto, 0,1 ml. de un filtrado libre de proteínas (obtenido tratando la orina de acuerdo al método de desproteínización propuesto por Somogyi, pero efectuando una dilución de 1:5 en lugar de la dilución 1:10 aconsejada por el mismo), con 1 ml. de un reactivo constituido por 110 ml. de ClH concentrado p.a., 90 ml. de etanol de 96° y 2,4 gramos de difenilamina p.a.

- 6) El límite de sensibilidad de la reacción con difenilamina en tales condiciones es de 0,1 gramo de levulosa por litro, pero puede ser aumentado prolongando el tiempo de calentamiento. Este tiempo de calentamiento (y por lo tanto el límite de sensibilidad) no puede ser aumentado indefinidamente pues está limitado por la cantidad de glucosa presente. Efectuando el calentamiento durante 1 minuto exactamente, es posible investigar la presencia de levulosa en orina, aún en presencia de 100 gramos de glucosa por litro.-
- 7) Esta reacción resulta aplicable a la investigación de levulosa en sangre (siempre que se encuentre en cantidades mayores de 10 miligramos por ciento) efectuando el calentamiento durante 5 minutos en lugar de 1 minuto como se realiza para la investigación de levulosa en orina.-
- 8) Este método presenta posibilidades para ser empleado como método cuantitativo para la valoración de levulosa en orina y sangre. El limita-

do número de ensayos efectuados con ese objeto, no nos permite asegurar categóricamente tal posibilidad, pero los resultados obtenidos en dichos ensayos parecen ser dignos de justificar un estudio posterior más amplio en tal sentido.-

- 9) Como resultado de las experiencias que hemos realizado , se aconseja una técnica personal, empleando la reacción de la difenilamina, para la investigación de levulosa en orina y sangre.-

-----o-----