



FACULTADE DE CIENCIAS

GRAO EN BIOQUÍMICA

D.^a Icíá Abraira Castro

**VALIDACIÓN DUN DISPOSITIVO “POINT OF CARE” PARA
A MEDICIÓN DE Ca EN GRANXA**

Traballo Fin de Grao

Xuño 2024

ÍNDICE

RESUMO	2
RESUMEN	3
ABSTRACT	4
1-INTRODUCCIÓN	5
Hipocalcemia subclínica.....	5
Sistemas dispoñíbeis para a detección e medición de Ca.....	7
Métodos colorimétricos.....	8
A lei de Lambert-Beer.....	8
Métodos metalocrómicos de cuantificación de Ca.....	9
Método 1: Zincon.....	9
Método 2: Arsenazo III.....	10
2-OBXECTIVO	12
3-PARTE EXPERIMENTAL	13
Materiais e métodos.....	13
Reactivos.....	13
Mostras.....	13
Equipamento.....	14
Parámetros experimentais.....	14
Método 1: Zincon.....	15
Preparación de reactivos.....	15
Curvas de calibrado.....	18
Medidas das mostras de soro.....	20
Método 2: Arsenazo III.....	22
Preparación de reactivos.....	22
Curvas de calibrado.....	22
Medida das mostras de soro.....	24
Análise de datos.....	25
4-RESULTADOS E DISCUSIÓN	26
Método 1: Zincon.....	26
Curvas de calibrado.....	26
Medida das mostras de soro.....	31
Método 2: Arsenazo III.....	35
Curvas de calibrado.....	35
Medida das mostras de soro.....	42
Comparativa entre os dous métodos.....	44
5-CONCLUSIÓNS	47
6-BIBLIOGRAFÍA	48
7-ANEXOS	50

RESUMO

A hipocalcemia é a patoloxía máis prevalente e que máis perdas económicas provoca nas vacas de leite. Máis do 50% das vacas múltíparas presentan hipocalcemia subclínica (HCS) dentro dos primeiros catro días despois do parto.

A HCS aumenta o risco doutras patoloxías posparto e está asociada á redución da produción de leite durante a lactación, problemas reprodutivos e complicacións na saúde dos animais. Por iso, a suplementación profiláctica con Ca no posparto é unha práctica común, pero pode ser contraproducente nalgúns animais, polo que sería desexable tratar selectivamente ás vacas que o precisen. Neste sentido, un dos inconvenientes que xorden é non dispor dunha ferramenta precisa, rápida e económica que permita medir os niveis de Ca, e así detectar a HCS “in situ”. A día de hoxe, aínda non hai un equipo o suficiente sensible, económico e viable para a medición da HCS directamente na granxa.

O obxectivo do traballo é comparar dous métodos colorimétricos para a detección de Ca e comprobar a súa viabilidade para desenvolver un dispositivo “point of care” para a medición de Ca en soro de sangue de vacún en granxa.

O primeiro dos métodos usa zincon como indicador e o segundo arsenazo III. Con cada método fixéronse curvas de calibrado e medidas de mostras cuxa concentración de Ca era coñecida.

As medidas fixéronse en mostras de soro sanguíneo de vaca. A comparación faise fronte a métodos de referencia establecidos, aos que se tivo acceso no laboratorio clínico do Hospital Veterinario Universitario Rof-Codina.

Despois de facer as medidas e comparar ambos métodos, concluíuse que o indicador máis axeitado para o prototipo de dispositivo de medición de Ca é o arsenazo III.

Palabras chave: calcio, hipocalcemia, absorbancia, indicadores metalocrómicos, recta de calibrado.

RESUMEN

La hipocalcemia es la patología más prevalente y que causa mayores pérdidas económicas en vacas lecheras. Más del 50% de las vacas multíparas desarrollan hipocalcemia subclínica (HCS) dentro de los primeros cuatro días después del parto.

La HCS aumenta el riesgo de otras patologías posparto y se asocia con una reducción de la producción de leche durante la lactancia, problemas reproductivos y complicaciones en la salud animal. Por lo tanto, la suplementación profiláctica con Ca en el posparto es una práctica común, pero puede ser contraproducente en algunos animales, por lo que sería deseable tratar selectivamente a las vacas que lo necesiten. En este sentido, uno de los inconvenientes que se presentan es no disponer de una herramienta precisa, rápida y económica que permita medir los niveles de Ca, y así detectar HCS "in situ". Hasta la fecha, todavía no existe ningún equipo suficientemente sensible, económico y viable para la medición de HCS directamente en la explotación.

El objetivo del trabajo es comparar dos métodos colorimétricos para la detección de Ca y comprobar su viabilidad para desarrollar un dispositivo "point of care" para la medición de Ca en suero sanguíneo bovino en granja.

El primer método utiliza zincon como indicador y el segundo arsenazo III. Con cada método se realizaron curvas de calibrado y mediciones de muestras cuya concentración de Ca se conocía.

Las mediciones se realizaron en muestras de suero sanguíneo de vaca. La comparación se realiza con métodos de referencia establecidos, a los que se accedió en el laboratorio clínico del Hospital Veterinario Universitario Rof-Codina.

Después de realizar las mediciones y comparar ambos métodos, se concluyó que el indicador más adecuado para el prototipo de medidor de Ca es el arsenazo III.

Palabras clave: calcio, hipocalcemia, absorbancia, indicadores metalocrómicos, recta de calibrado.

ABSTRACT

Hypocalcemia is the most prevalent pathology and the one that causes the greatest economic losses in dairy cows. More than 50% of multiparous cows develop subclinical hypocalcemia (SHC) within the first four days after calving.

SHC increases the risk of other postpartum pathologies and is associated with reduced milk production during lactation, reproductive problems and animal health complications. Therefore, postpartum prophylactic calcium supplementation is a common practice, but it can be counterproductive in some animals, so it would be desirable to selectively treat cows that need it. In this sense, one of the drawbacks that arise is not having an accurate, fast and economical tool that allows measuring Ca levels, and thus detecting SHC "in situ". So far, there is still no sufficiently sensitive, economical and viable equipment for the measurement of SHC directly on the farm.

The aim of this study is to compare two colorimetric methods for the detection of calcium and to verify their feasibility to develop a "point of care" device for the measurement of Ca in bovine blood serum on farm.

The first method uses zincon as an indicator and the second arsenazo III. With each method, calibration curves and measurements of samples whose calcium concentration was known were made with each method.

The measurements were made on samples of cow blood serum. The comparison is made with established reference methods, which were accessed in the clinical laboratory of the Rov-Codina University Veterinary Hospital. After taking the measurements and comparing both methods, it was concluded that the most suitable indicator for the prototype calcium meter is arsenazo III.

Keywords: calcium, hypocalcemia, absorbance, metallochromic indicators, calibration line.

1-INTRODUCCIÓN

O período de transición (21 días antes e despois do parto) da vaca leiteira é un momento crítico debido aos grandes cambios metabólicos e nutricionais que se producen e que afectan á saúde e á inmunidade dos animais, sendo por tanto o momento máis delicado de saúde e cando requiren máis atención veterinaria (1,2). Dentro das posibles patoloxías, as principais son as metabólicas asociadas á alta produción leiteira.

A vaca ten unha alta demanda de Ca (Ca) e de glicosa ao inicio da lactación, polo que unha alta porcentaxe de animais entrarán en balance negativo de Ca e de enerxía favorecendo o desenvolvemento das patoloxías máis prevalentes: a hipocalcemia e a cetose.

Existe unha alta prevalencia a nivel mundial, tanto de hipocalcemia como de cetose subclínica. Estas enfermidades tamén se consideran unha "porta de entrada" para outras patoloxías infecciosas e dixestivas posparto, que provocan altas perdas económicas. Por iso, hoxe en día o diagnóstico precoz destas patoloxías supón un reto para implantar un tratamento adecuado e reducir a súa prevalencia.

Para un correcto diagnóstico é necesario medir os niveis de Ca en sangue (hipocalcemia) e metabolitos relacionados co metabolismo enerxético como a glicosa, betahidroxibutirato (BHB), ácidos graxos non esterificados (NEFA) e funcionalidade hepática (enzimas, colesterol e bilirrubina total) (3). Para poder actuar de forma práctica e rápida e axustar o tratamento ás necesidades, o ideal sería poder facer todas estas análises na explotación "a pé da vaca".

Hipocalcemia subclínica

A hipocalcemia subclínica (HCS) é unha condición en vacas leiteiras na cal os niveis de Ca en sangue están baixos pero non aparecen síntomas clínicos evidentes. A HCS maniféstase nas primeiras etapas do período postparto (4).

A HCS pode ter varios impactos negativos sobre as vacas de leite. En primeiro lugar, demostrouse que está asociada a un maior risco de enfermidades posparto, como a placenta retida, a metrite, o desprazamento do abomaso esquerdo, a cetose e a mamite. Estas enfermidades poden afectar á saúde e ao benestar das vacas, así como á súa produción de leite (1,2,5).

Ademais, esta patoloxía tamén pode ter un impacto negativo na reprodución das vacas de leite. Os estudos demostraron que a HCS nos 3 primeiros días de lactación pode estar asociada a un mal rendemento reprodutivo nas vacas, provocando problemas de fertilidade e concepción (2,4,6).

En canto á produción de leite, observouse que a HCS pode limitar a mesma. Isto débese a que o Ca é un mineral esencial para a contracción muscular, incluídos os músculos do ubre responsábeis de producir o leite. Os niveis baixos de Ca no sangue poden afectar a función destes músculos e, finalmente, reducir a produción (7).

O punto de corte para establecer o nivel de Ca en sangue varía segundo os estudos, pero sitúase entre 8,5 mg/dL e 8,6 mg/dL de Ca total (2,00-2,14 mmol/L) dependendo de cando e cantas mostas se tomen para o diagnóstico (1,2,4,5).

A hipocalcemia é a patoloxía máis prevalente e que máis perdas económicas xera na gandería de vacún de leite. Isto é debido aos custes adicionais en tratamentos veterinarios, a diminución na calidade e na cantidade de leite producido, así como a baixada na fertilidade do rabaño, o cal impacta directamente na rentabilidade da explotación leiteira. Máis do 50% das vacas multiparas presentan HCS nos primeiros 4 días despois do parto (2,5,7,8), polo que a suplementación profiláctica con Ca é unha práctica común, aínda que pode ser contraproducente (9).

Por todo isto, sería interesante dispoñer dunha ferramenta económica, rápida e precisa que permitise medir os niveis de Ca en sangue "in situ", na propia granxa, para así poder tratar aos animais selectivamente e facer un seguimento dos niveis de Ca en sangue nos días posteriores ao parto.

Este método debería cumprir tamén a condición de detectar o Ca total, xa que este pode atoparse no sangue de tres xeitos: forma iónica ou libre (50%), recoñecida como a forma bioloxicamente activa; unido a proteínas, no caso particular do

sangue de vaca a maioría estará unido á seroalbúmina bovina; e formando complexos con anións (10%) (10).

Sistemas dispoñíbeis para a detección e medición de Ca

O máis habitual é medir Ca total, xa que tanto os métodos como o manexo da mostra son máis sinxelos (máis estábeis), e significativamente máis económicos. Xeralmente mídese mediante técnicas colorimétricas e está facilmente dispoñíbel na maioría dos laboratorios.

A medida do Ca iónico, aínda que é a fracción metabólicamente activa, é menos común, tanto en ámbitos veterinarios como de medicina humana. A metodoloxía e o manexo da mostra é máis complicado, é máis inestable porque se verá afectado polos cambios de pH e é significativamente máis caro. Normalmente mídese mediante potenciometría directa, que non é unha técnica habitual nos laboratorios clínicos. A dificultade loxística de manipular mostras e envialas ao laboratorio en condicións adecuadas fai que sexa inviable.

No Ca total hai aproximadamente un 50% de Ca iónico, e hai unha boa correlación entre eles se o equilibrio ácido-base e o metabolismo das proteínas están a niveis fisiolóxicos, como ocorre habitualmente na hipocalcemia sen complicacións (10).

En 2010, validouse un analizador portátil para hipocalcemia en vacas que mide Ca en forma iónica por potenciometría directa (i-Stat®) (11), pero o alto custo dos cartuchos necesarios para o seu funcionamento (18-20 €) e o mantemento do software fan que o seu uso de xeito rutineiro en granxas sexa inviábel.

A Universidade de Cornell e HORIBA Advanced Techno probaron un equipo portátil que mide Ca iónico mediante un electrodo ión selectivo, considerándoo unha ferramenta rápida e de baixo custo para medir a fracción iónica do Ca a pé de vaca (7).

En 2021, a Universidade de Guelph validou un equipo portátil de medición de Ca total por colorimetría (TD-5220 Vet Ca²⁺), pero non resultou suficientemente preciso (4).

A Universidade de Sassari probou con éxito un test de medición de dureza da auga para valorar Ca total en soro, que resultou viábel para o uso directo en granxas. Máis recentemente, deseñouse e validouse un dispositivo con membrana selectiva de ións de Ca^{2+} impresa en 3D para medir Ca iónico en sangue bovino (12).

Ningún destes equipos é aínda viábel para o seu uso habitual en granxas, non obstante, todos estes estudos destacan a necesidade de desenvolver novas tecnoloxías que permitan medir a calcemia a pé de vaca de forma precisa e rápida.

No caso dos laboratorios de análise clínica, un dos equipos de bioquímica seca máis empregados no eido da veterinaria para a análise de mostras sanguíneas é o Catalyst One® (desenvolvido por IDEXX). Este equipo serve para facer diversas probas bioquímicas, entre elas, a medición de Ca en sangue. Para facelo baséase na reacción do Ca co arsenazo III, que dá un complexo coloreado. O equipo mide a intensidade da cor, que é proporcional á concentración de Ca (13).



Métodos colorimétricos

A lei de Lambert-Beer

Esta lei fundamental da espectroscopía permite relacionar a absorbancia dunha determinada mostra coa concentración do analito que queremos determinar, seguindo a seguinte ecuación:

$$Abs = \varepsilon \times l \times [A] \quad (1.1)$$

Cómpre destacar que a a proporcionalidade entre absorbancia e concentración mantense soamente ata certo punto. A concentracións altas do analito, a relación deixa de ser lineal debido a varios factores, como a saturación do detector ou a presenza de dímeros e agregados.

Os termos da expresión da lei de Lambert-Beer (ecuación 1.1) son:

- $[A]$, a concentración do analito, exprésase en unidades de molaridade (M).
- l , o camiño óptico, refírese á lonxitude do percorrido que fai a luz a través da mostra, medida en centímetros (cm). Esta lonxitude corresponde xeralmente á anchura da cubeta que contén a mostra.
- ϵ , o coeficiente de absortividade molar, tamén coñecido como coeficiente de extinción molar. É unha constante que depende da natureza química do analito e da lonxitude de onda da luz empregada na medición. As súas unidades máis típicas son $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e indican canto absorbe a mostra por unidade de concentración e lonxitude.

Métodos metalocrómicos de cuantificación de Ca

Os métodos utilizados para a medición de Ca sérico eran xeralmente insatisfactorios ata a introdución de indicadores metalocrómicos como murexida, calceína ou complexona de cresolftaleína. Estes indicadores revolucionaron a análise do Ca ao ofrecer unha maior precisión e sensibilidade en comparación cos métodos anteriores. A súa capacidade para formar complexos coloreados con ións de Ca permitiu a detección visual e espectrofotométrica de concentracións de Ca con maior exactitude (14).

Método 1: Zincon

O zincon (2-carboxi-2 0 -hidroxi-5 0 -sulfoformazilbenceno) é un coñecido quelante empregado desde hai tempo como reactivo colorimétrico para a detección de ións de zinc e de cobre en disolución acuosa (14).

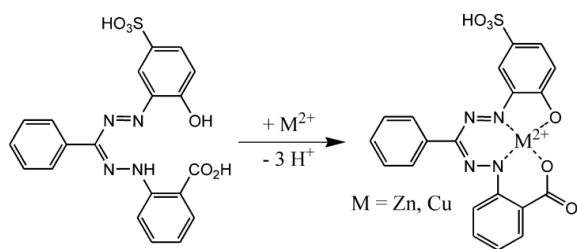


Fig 2.1: Estrutura química do zincon na súa forma libre e unido a un metal. Tomado de (14)

Neste método ten lugar unha reacción competitiva na cal o Ca da mostra despraza o zinc dun complexo zinc-EGTA dando lugar a un complexo Ca-EGTA e deixando libre ao zinc, que se une ao zincon provocando que este pase de cor azul a vermella. A intensidade da cor vermella formada é directamente proporcional á concentración de zinc libre, que á súa vez é proporcional á cantidade de Ca que desprazou ao zinc do complexo inicial. Este cambio de cor pode medirse por espectrofotometría.

A reacción competitiva descrita pode ser representada mediante as seguintes ecuacións químicas:

1. $\text{Zn-EGTA} + \text{Ca}^{2+} \rightleftharpoons \text{Ca-EGTA} + \text{Zn}^{2+}$
2. $\text{Zn}^{2+} + \text{Zincon} \rightleftharpoons \text{Zn-Zincon}$ (cambio de cor de azul a vermella)

Para evitar interferencias do zinc endóxeno é necesario realizar un branco de cada mostra que se mida, o cal tamén evita erros inducidos pola turbidez da mostra. Se a mostra ten unha hemólise excesiva obtéñense resultados máis baixos do esperado, é dicir, obtense un valor da concentración de Ca por debaixo da real (15).

Método 2: Arsenazo III

O método do arsenazo III (figura 1.1) para a detección de Ca baséase na capacidade deste composto para formar complexos coloreados ao unirse a ións de Ca^{2+} . Este cambio de cor pode ser cuantificado mediante espectrofotometría.

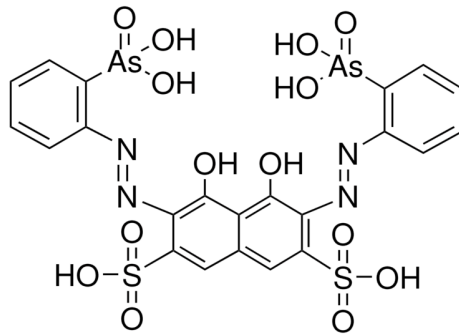


Fig 1.1: Estrutura química do Arsenazo III. Tomado de (16)

Como se ve na figura 1.2; en presenza de Ca a absorbancia do complexo mostra un máximo en torno a 654 nm, o cal indica a formación dun complexo estábel entre o Ca e o arsenazo III. Este cambio na absorbancia débese á formación dun complexo 1:1 entre o Ca e o indicador, o cal afecta á capacidade de absorción de luz do sistema. Este cambio na absorbancia pódese empregar para estimar a concentración de Ca nunha mostra (17).

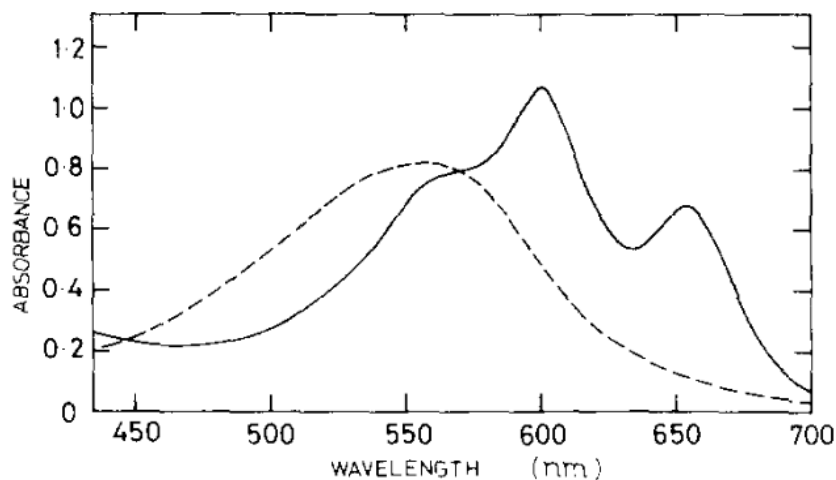


Fig 1.2: Espectro do Arsenazo III en ausencia (liña discontinua) e presenza (liña continua) de ións Ca. Tomado de (17)

O arsenazo III só se complexa coa forma iónica do Ca; pero a súa constante de asociación co Ca ($1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) (17) é moito maior que a constante de asociación do Ca coa seroalbúmina (entre 90 e 100 M^{-1}) (18), polo que será capaz de complexarse tamén co Ca que estea unido a esta proteína. Polo tanto, pódese asumir que o arsenazo III serve para detectar o Ca total en sangue.

2-OBXECTIVO

A finalidade deste traballo é validar os dous métodos colorimétricos mediante o uso de indicadores metalocrómicos para a cuantificación de Ca mencionados no apartado anterior. As medidas faranse en mostras de soro sanguíneo de vaca. Esta validación farase fronte a métodos de referencia establecidos (análise utilizando o equipo Catalyst One®, mencionado con anterioridade), aos que se ten acceso no laboratorio clínico do Hospital Veterinario Universitario Rof-Codina.

Este traballo enmárcase no proxecto “Desenvolvemento de dispositivo *point of care* para medición de Ca en granxa” dos grupos de investigación “Investigación en medicina animal” e “Química Biofísica, Fotofísica e Espectroscopia” da USC. O propósito deste proxecto é desenvolver un prototipo de dispositivo *point of care* de cuantificación de Ca total (tCa) baseado en metodoloxías colorimétrica ou fluorimétrica, que permita diagnosticar a HCS “a pé de vaca” de forma sinxela e barata, empregando pequenas cantidades de soro sanguíneo.

3-PARTE EXPERIMENTAL

Materiais e métodos

Para comprobar estes métodos fixéronse varias rectas de calibrado empregando para unhas unha disolución nai de Ca feita con CaCl_2 e para outras, mostras de soro sanguíneo de vaca cuxa concentración de Ca é coñecida. Despois medíronse con cada método varias mostras de soro sanguíneo de vaca cuxa concentración de Ca é coñecida, para así comparar os resultados obtidos.

Reactivos

- Cloruro de Ca (CaCl_2). Fabricante Sigma S8045, CAS 1310-73-2.
- Zincon. Fabricante ThermoScientific (Sharlab), CAS 62625-22-3.
- Zinc nitrato hexahidratado. Fabricante Scharlab, CAS 10196-18-6.
- Hidróxido de sodio (NaOH). Fabricante Sigma S8045, CAS 1310-73-2.
- Sodio teraborato. Fabricante Sigma-Aldrich (Scharlab), CAS 67-42-5.7.
- Cloruro de amonio. Fabricante Sigma-Aldrich (Scharlab), CAS 12125-02-9.
- EGTA. Fabricante Sigma-Aldrich (Scharlab), CAS 67-42-5.
- Arsenazo III. Fabricante Sigma Aldrich, CAS 1688-00-4.
- PIPES. Fabricante Sigma-Aldrich (Scharlab), CAS 76836-02-7.

Mostras

Obtidas do laboratorio clínico do Hospital Veterinario Universitario Rof-Codina. Consérvanse conxeladas.

- Mostra 1_1. $[\text{Ca}] = 7,10 \text{ mg/dL}$.
- Mostra 1_2. $[\text{Ca}] = 7,10 \text{ mg/dL}$.
- Mostra 2. $[\text{Ca}] = 8,00 \text{ mg/dL}$.

- Mostra 3.[Ca]= 9,8 mg/dL.

Hai que ter en conta que as mostras 1_1 e 1_2 foron tomadas do mesmo animal no mesmo día, polo que teñen a mesma concentración de Ca.

Equipamento

- Espectrofotómetro UV-Vis Varian Cary 100 Bio (equipo de dobre feixe que permite medir espectros de absorción Vis-UV no intervalo de 200 nm a 900 nm), empregouse cun termostato que mantiña a temperatura das mostras constante, a 25° C.
- Bloque calefactor Eppendorf Thermomixer, que se utilizou para manter as mostras de soro en axitación e a temperatura constante antes de facer as medidas.

Parámetros experimentais

Para ambos métodos faise unha *zero/baseline correction* no espectrofotómetro para corrixir as variacións entre as canles de mostra e referencia, así como o efecto da luz difusa. Para isto, antes de cada serie hai que medir o espectro dunha mostra equivalente ao 100% de transmitancia (é dicir, o disolvente só, neste caso auga MilliQ) e un espectro equivalente ao 0% de transmitancia (tapando o camiño óptico cun material opaco e de cor negra).

Os parámetros para ambos métodos están reflectidos na táboa 3.1 (arsenazo III) e na táboa 3.2 (zincon).

Táboa 3.1: *Parámetros do espectrofotómetro UV-Vis Varian Cary 100 Bio para as medidas con arsenazo III.*

Parámetros para o arsenazo III	
<i>Start (nm)</i>	750,00
<i>Stop (nm)</i>	350,00
<i>UV-Vis Scan Rate (nm/min)</i>	300,000
<i>UV-Vis Data Interval (nm)</i>	1,000
<i>UV-Vis Ave. Time (sec)</i>	0,200
<i>UV-Vis SBW (nm)</i>	2,0

Táboa 3.2: *Parámetros do espectrofotómetro UV-Vis Varian Cary 100 Bio para as medidas con zincon.*

Parámetros para o zincon	
<i>Start (nm)</i>	800,00
<i>Stop (nm)</i>	400,00
<i>UV-Vis Scan Rate (nm/min)</i>	600,000
<i>UV-Vis Data Interval (nm)</i>	1,000
<i>UV-Vis Ave. Time (sec)</i>	0,100
<i>UV-Vis SBW (nm)</i>	2,0

Método 1: Zincon

Preparación de reactivos

Prepáranse unha disolución nai de Ca para facer as curvas de calibrado.

Preparación da disolución nai de Ca:

- **Volume preparado:** 10 ml.
- **Concentración de Ca:** 10 mg/dl.
- **Reactivo utilizado:** CaCl₂.

Para este método é necesario preparar dous reactivos, un para facer as medidas propiamente ditas (de agora en diante, TEST) e outro para facer os brancos (de agora en diante, BLANK).

Tanto o TEST como o BLANK conteñen un tampón (de agora en diante, tampón Z) con zincon (o indicador), tetraborato de sodio, hidróxido de sodio e cloruro de amonio.

Ao TEST, ademais do tampón Z, hai que engadirlle unha disolución con zinc e EGTA. Deste xeito, contén o complexo zinc-EGTA, do cal o Ca despraza o zinc que se une ao zincon e dá o cambio de cor

1. Tampón Z.

Volume preparado: 30 mL.

Concentración de sodio tetraborato: 25 g/L.

Concentración de cloruro de amonio: 3,5 g/L.

Concentración de hidróxido de sodio: 5,7 g/L

Concentración de zincon: 3 mg/L

Déixase en axitación durante 12 horas xa que o sodio tetraborato é moi pouco soluble.

2. Disolución de EGTA.

Volume preparado: 10 mL.

Concentración de EGTA: 582 mg/mL.

Concentración de hidróxido de sodio: 0,04 g/mL.

3. Disolución de zinc.

Volume preparado: 10 mL.

Concentración de zinc: 1 mg/mL (empregase nitrato de zinc hexahidratado).

4. Disolución de zinc e EGTA.

Volume preparado: 10 mL.

Volume da disolución de zinc: 5 mL.

Volume da disolución de EGTA: 5 mL.

5. TEST

Volume preparado: 5,05 mL.

Volume de tampón Z: 5 mL.

Volume da disolución de zinc e EGTA: 0,05 mL.

6. BLANK

Volume preparado: 5,05 mL.

Volume de tampón z: 5 mL.

Volume da disolución de auga milliQ: 0,05 mL

Para facer os controis á hora de medir as mostras prepáranse tamén dous reactivos coa mesma composición que TEST e BLANK pero sen zincon.

Para facer estas disolucións prepárase un novo tampón coa mesma composición que o tampón Z pero sen zincon (de agora en diante, tampón C). Fanse 10 ml deste tampón C a partir do cal se preparan estes dous novos reactivos:

7. TEST_C.

Volume preparado: 1,02 mL.

Volume de tampón C: 1 mL.

Volume da disolución de zinc e EGTA: 0,02 mL.

8. BLANK_C.

Volume preparado: 1,02 mL.

Volume de tampón z: 1 mL.

Volume da disolución de auga milliQ: 0,02 mL

Os volumes corríxense por pesada, mediante a densidade.

É necesario ter en conta que o tampón z non é estábel, polo que transcurridos máis de 4 días despois da súa preparación xa non se pode empregar para facer medidas e habería que preparar un novo (ver Anexo 1).

Todas as disolucións foron preparadas en auga MilliQ. Gardáronse na neveira mentres non se estaban empregando.

Curvas de calibrado

Para avaliar como cambia a absorbancia do zincon ao ir engadindo Ca fixéronse varias curvas de calibrado preparando mostras con concentracións crecentes de Ca (como mostra a táboa 3.3) e medindo cadanseu espectro de absorción. Estas curvas de calibrado fixéronse empregando a disolución nai de Ca.

As mostras test, as que sirven para facer a medida propiamente dita (nomeadas coa letra T), levan o reactivo TEST. As mostras que se usan para facer o branco (nomeadas coa letra B), levan o reactivo BLANK.

Preparáronse 10 mostras test cos seus respectivos brancos (20 mostras en total). En cada mostra pipeteáronse 440 μ L de TEST ou de BLANK segundo correspondese, volumes crecentes de disolución nai de Ca e completouse con auga MilliQ ata chegar a un volume total de 600 μ L por mostra.

Como se explicou na introdución, hai que facer un branco para cada medida, polo que o número de medidas que hai que facer no espectrofotómetro é o dobre.

Táboa 3.3: Concentracións de Ca e zincon nas mostras utilizadas para facer a curva de calibrado.

Mostra	[Ca] (mg/dL)	[Zincon] (mg/mL)
T1	0,15	0,10
B1	0,14	0,10
T2	0,22	0,10
B2	0,24	0,10
T3	0,29	0,10
B3	0,33	0,10
T4	0,32	0,10
B4	0,36	0,10
T5	0,37	0,10
B5	0,42	0,10
T6	0,41	0,10
B6	0,47	0,10
T7	0,53	0,10
B7	0,51	0,10
T8	0,56	0,10
B8	0,52	0,10
T9	0,60	0,10
B9	0,67	0,10
T10	0,84	0,10
B10	0,88	0,10

Todos os volumes pipeteados foron corrixidos por pesada e recalculados pola densidade, para así coñecer a concentración exacta tanto de Ca como de zincon.

Para que a medida sexa correcta, hai que preparar as mostras (o test e o branco) xusto antes de medilas, xa que as mostras degradanse e cambian de cor con moita

rapidez. Polo tanto, prepáranse as mostras de dúas en dúas (unha mostra test e o seu correspondente branco) e inmediatamente despois de preaparalas mídense no espectrofotómetro.

Mídese en primeiro lugar o test e despois o branco. Entre medida e medida a cubeta lávase con abundante auga da billa, auga destilada e etanol ao 80%. Despois sécase con aire a presión e antes de pipetear a nova mostra lávase con 100 μ L da mesma. Para medir pipetéanse 450 μ L na cubeta.

Todas as mostras test mídense coa mesma cubeta e as mostras branco con outra (cubetas de cuarzo con 1,00 cm de paso de luz).

Os espectros obtidos corrixíronse pola concentración zincon. Para facer isto multiplicouse cada espectro pola media das concentracións de indicador de todas as mostras e dividiuse pola concentración que hai na mostra á cal se corresponde o espectro.

Tamén se corrixiron pola liña base. Para isto, seleccionouse un rango de lonxitudes de onda nos que non hai absorbancia, fíxose a media desas absorbancias e restouse ao espectro total.

Unha vez están os espectros corrixidos, a cada espectro de cada mostra test restáselle o espectro da mostra branco correspondente.

Medidas das mostras de soro

Con este método médense as mostras 1_1, 1_2 e 2. Para facer cada medida fixéronse tres repeticións da mesma, para as cales se fixeron tres dilucións da mostra, como amosa a táboa 3.4.

Unha vez desconxeladas as mostras estas foron axitadas nun Vortex e mantivéronse en axitación (300 rpm) e temperatura (25 ° C) constantes nun bloque calefactor Eppendorf Thermomixer.

Estas dilucións tamén se fixeron escollendo unha concentración na que se ve máis cambio na absorbancia coa concentración de Ca. As dilucións preparáronse seguindo o mesmo procedemento que para preparar as mostras para as curvas de calibrado.

Táboa 3.4: Concentracións de Ca e zincon nas dilucións utilizadas para facer as tres repeticións da medida da mostra 2.

Dilución da mostra 2 ([Ca]=8,00 mg/dL)	[Ca] (mg/dL)	[Zincon] (mg/mL)
DT1	0,34	0,09
DB1	0,32	0,09
DT2	0,31	0,09
DB2	0,32	0,09
DT3	0,32	0,09
DB3	0,33	0,09

Ademais das dilucións con BLANK e TEST, tamén se mediron dúas disolucións control sen zincon.

Estas disolucións contiñan a mesma concentración de mostra que as dilucións para facer a medida, pero en lugar de reactivo TEST ou BLANK levaban os reactivos TEST_C e BLANK_C (táboa 3.5). Deste xeito, pódese coñecer o espectro do soro sen zincon e en que medida afectará a nosa medida.

Táboa 3.5: Concentracións de Ca e zincon nas dilucións utilizadas para facer as medidas de control da mostra 2 (método zincon).

Dilución da mostra 2 ([Ca]=8,0 mg/dL)	[Ca] (mg/dL)	[Zincon] (mg/mL)
DTEST_C	0,33	0
DBLANK_C	0,33	0

Igual que para as medidas anteriores, os volumes pipeteados foron corrixidos por pesada e recalculados pola densidade para coñecer as concentracións exactas. Todas as dilucións foron preparadas en auga MilliQ.

Os espectros obtidos foron corrixidos pola concentración de zincon e a cada espectro test restóuselle o seu respectivo branco.

Método 2: Arsenazo III

Preparación de reactivos

Preparáronse dúas disolucións nai de arsenazo III. Estas disolucións conteñen o indicador (arsenazo III) e un buffer (PIPES).

Primeiro nai de arsenazo III (Az1):

- **Data de preparación:** 11 de marzo.
- **Volume preparado:** 50 ml.
- **Concentración de PIPES:** 50 mM.
- **Concentración de arsenazo III:** 252,46 μM .

Segundo nai de arsenazo III (Az2):

- **Data de preparación:** 18 de abril.
- **Volume preparado:** 50 ml.
- **Concentración de PIPES:** 50 mM.
- **Concentración de arsenazo III:** 184,74 μM .

Ademais destas disolucións, prepárase 1 ml de PIPES a concentración 50 mM (de agora en diante, Az_C). Esta disolución servirá para facer un control á hora de medir as mostrás.

Emprégase o mesma disolución nai de Ca que se utilizou para o método do zincon.

Todas as disolucións foron preparadas en auga MilliQ. Gardáronse na neveira mentres non se estaban empregando.

Curvas de calibrado

Para avaliar como cambia a absorbancia do arsenazo III ao ir engadindo Ca fixéronse varias curvas de calibrado preparando mostrás con concentración crecentes de Ca (como mostra a táboa 3.6) e medindo candanseu espectro de

absorción. Fixéronse dúas curvas de calibrado coa disolución nai de Ca e tres utilizando mostras de soro cuxa concentración de Ca era coñecida (coas mostras 1_2, 2 e 3).

Para facer cada curva de calibrado preparáronse 10 mostras con concentracións crecentes de Ca. En cada mostra pipetéanse 334 μL de nai de arsenazo III e volumes crecentes de disolución nai de Ca ou de mostra. Complétase con auga MilliQ ata chegar a 1 ml de volume por mostra.

Táboa 3.6: concentracións de Ca e arsenazo III empregadas para facer unha curva de calibrado con disolución nai de Ca.

Mostra	[Ca] (mg/dl)	[Arsenazo III] (μM)
m1	0,00	86,66
m2	0,05	92,00
m3	0,10	90,32
m4	0,16	88,48
m5	0,22	86,21
m6	0,32	93,12
m7	0,35	99,34
m8	0,44	91,31
m9	0,59	95,60
m10	0,70	99,69

Todos os volumes pipeteados foron corrixidos por pesada e recalculados pola densidade, para así coñecer a concentración exacta tanto de Ca como de arsenazo III.

Unha vez preparadas todas as mostras, mídense no espectrofotómetro. Entre medida e medida a cubeta lávase con abundante auga da billa, auga MilliQ e etanol ao 80 %. Despois sécase con aire a presión e antes de pipetear a nova mostra lávase con 300 μL da mesma. Para medir pipetéanse 500 μL na cubeta.

Todas as mostras son medidas coa mesma cubeta (de cuarzo e con 1,00 cm de paso de luz).

Os espectros obtidos corrixírinso pola concentración de indicador e pola liña base.

Medida das mostras de soro

Con este método medíronse as mostras 1_1, 1_2, 2 e 3. Para facer cada medida fixéronse tres repeticións da mesma, para as cales se fixeron tres dilucións da mostra, como amosa a táboa 3.7.

Unha vez desconxeladas as mostras estas foron axitadas nun Vortex e mantivéronse en axitación (300 rpm) e temperatura (25 ° C) constantes nun bloque calefactor Eppendorf Thermomixer.

Estas dilucións fixéronse escollendo unha concentración na que se ve máis cambio na absorbancia coa concentración de Ca, como se explicará nos resultados e discusión. As dilucións preparáronse seguindo o mesmo procedemento que para preparar as mostras para as curvas de calibrado.

Táboa 3.7: Concentracións de Ca e arsenazo III nas dilucións utilizadas para facer as tres repeticións da medida da mostra 1_1.

Dilución da mostra 1_1 ([Ca]=7,10 mg/dl)	[Ca] (mg/dl)	[Arsenazo III] (µM)
D1	0,07	83,78
D2	0,07	79,56
D3	0,08	83,23

Tamén se mediu o espectro do soro diluído (coa mesma dilución que se fixo nas tres repeticións da medida) co reactivo Az_C, sen presenza de arsenazo III, para observar a súa contribución (e posible interferencia) ao espectro de absorción.

Táboa 3.8: concentracións de Ca e arsenazo III na dilución utilizadas para facer a medida de control da mostra 1_1 (método arsenazo III).

Dilución da mostra 1_1 ([Ca]=7,1 mg/dl)	[Ca] (mg/dl)	[Arsenazo III] (μM)
DAz_C	0,06	0

Igual que para as medidas das curvas de calibrado, os volumes pipeteados foron corrixidos por pesada e recalculados pola densidade para coñecer as concentracións exactas. Todas as dilucións foron preparadas en auga MilliQ.

Os espectros obtidos foron corrixidos pola concentración de arsenazo III.

Análise de datos

Fixéronse as correccións antes mencionadas nos espectros (pola liña base e pola concentración de indicador) e posteriormente a representación gráfica dos mesmos. Nas curvas de calibrado, isto permite ver a relación entre a concentración de Ca e a absorbancia a unha lonxitude de onda concreta. Para estudar esa relación faise unha análise lineal.

A análise lineal permítenos coñecer cal é a relación entre a absorbancia e a concentración de Ca e en que intervalos de concentración e a que lonxitudes de onda esta é lineal, para así aplicar a lei de Lambert-Beer (ecuación 1.1).

Coas relacións entre absorbancia e concentración obtidas das análises lineais fixéronse as rectas de calibrado que permitiron calcular a concentración de Ca nas mostras medidas.

Ademais das análises a unha lonxitude de onda concreta tamén se fixeron análises empregando métodos ratiométricos (utilizando a relación de absorbancia a dúas lonxitudes de onda).

Para facer estas análises empregáronse os programas Excel e OriginPro.

4-RESULTADOS E DISCUSIÓN

Cando se indica [Ca], quere dicir concentración de Ca total.

Método 1: Zincon

Curvas de calibrado

Para facer a curva de calibrado medíronse os espectros de 20 mostras con diferentes concentracións de Ca. Destas mostras, 10 contiñan o reactivo TEST e outras 10 o BLANK. Debido ás limitacións asociadas á rápida degradación dos reactivos só se obtivo unha curva de calibrado cos resultados desexables.

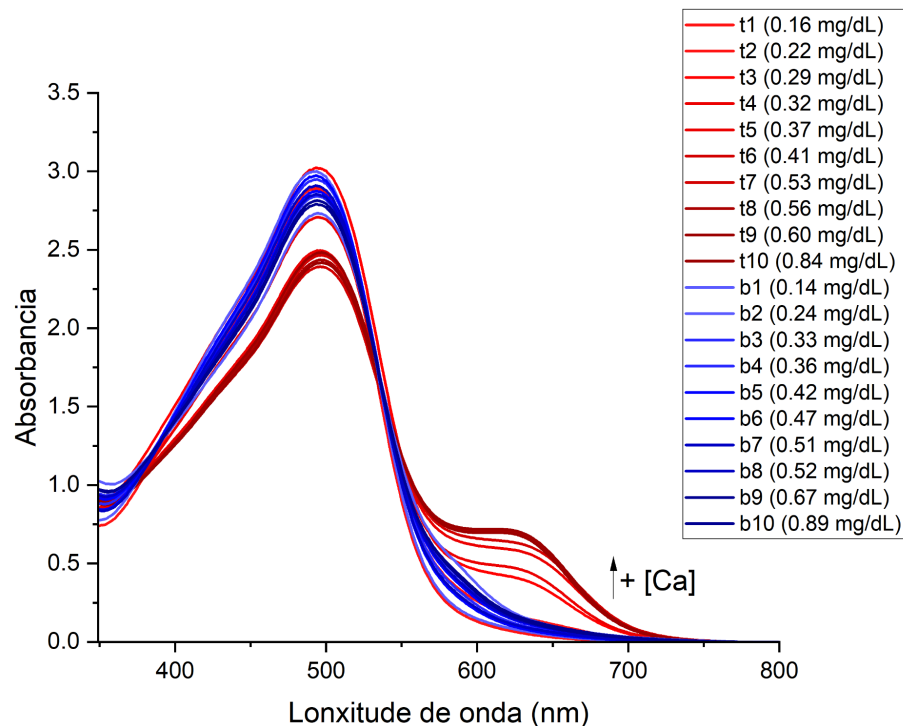


Fig 4.1: Espectros de absorción correspondentes á curva de calibrado do zincon. As mostras nomeadas coa letra t levan o reactivo TEST e as mostras nomeadas coa letra b levan o reactivo BLANK.

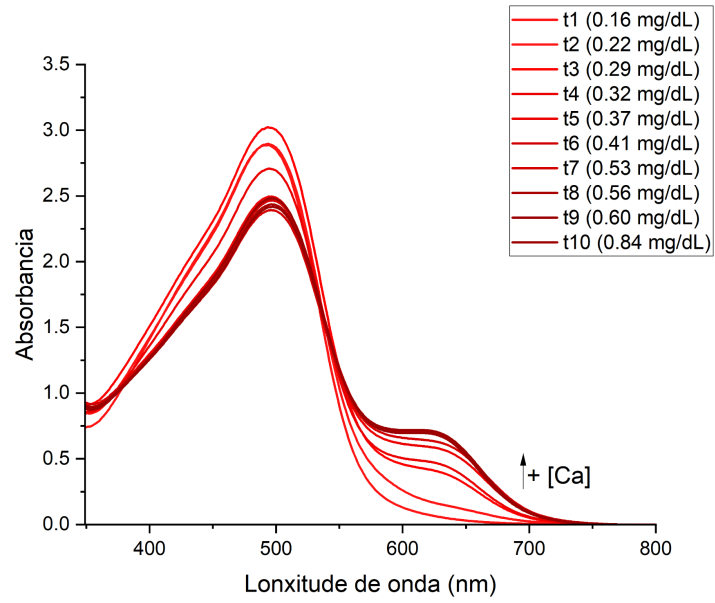


Fig 4.2: Espectros de absorción correspondentes á curva de calibrado do zincon que levan o reactivo TEST.



Fig 4.3: Espectros de absorción correspondentes á curva de calibrado do zincon que levan o reactivo BLANK.

Como se aprecia nas figuras 4.1 e 4.2, hai unha variación significativa na absorbancia das mostras que levan o reactivo TEST a medida que aumenta a concentración de Ca. Esta variación vese especialmente no intervalo de lonxitudes de onda que vai desde 580 nm a 700 nm, polo que será o intervalo que nos interese para facer as rectas de calibrado. Tamén se ve que hai variación coa concentración de Ca nos máximos dos espectros, en torno a 590 nm.

No tocante ás mostras que levan o reactivo BLANK, non se ve que haxa unha variación sistemática na absorbancia ao ir aumentando a concentración de Ca (figura 4.3).

A cada mostra co reactivo TEST restóuselle o seu respectivo branco, obtendo os espectros da figura 4.4, nos que tamén se ve unha variación significativa da absorbancia ao ir aumentando a concentración de Ca.

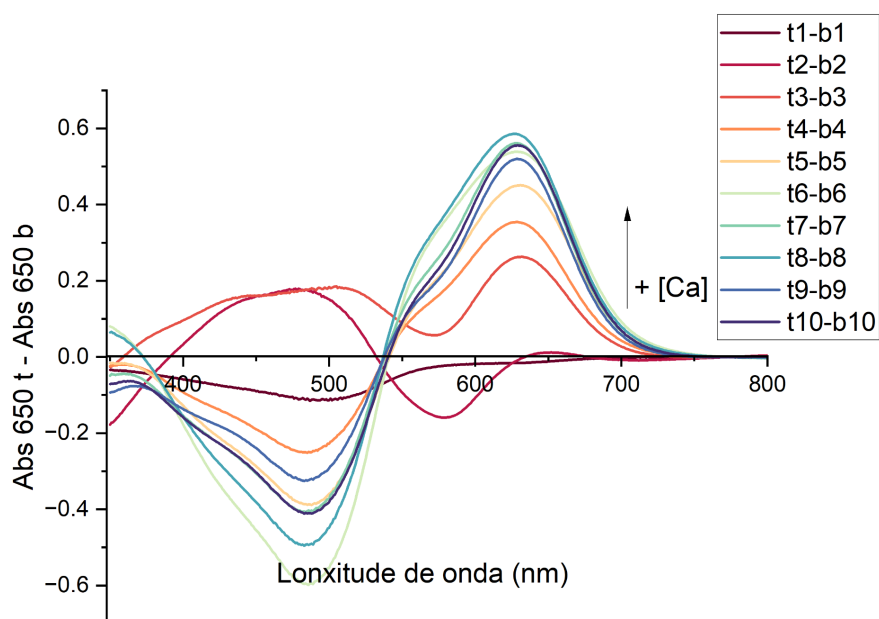


Fig 4.4: Espectros de absorción correspondentes ao resultado de restarlle a cada espectro t o seu respectivo b.

A continuación, escolleuse unha lonxitude de onda na que se ve variación da absorbancia ao ir aumentando a concentración de Ca, neste caso 650 nm. Fixéronse dúas representacións da variación da absorbancia fronte á concentración

de Ca, unha utilizando a variación nos espectros co reactivo TEST (figura 4.5) e outra utilizando a variación nos espectros obtidos ao restarlle a cada mostra test o seu branco (figura 4.6).

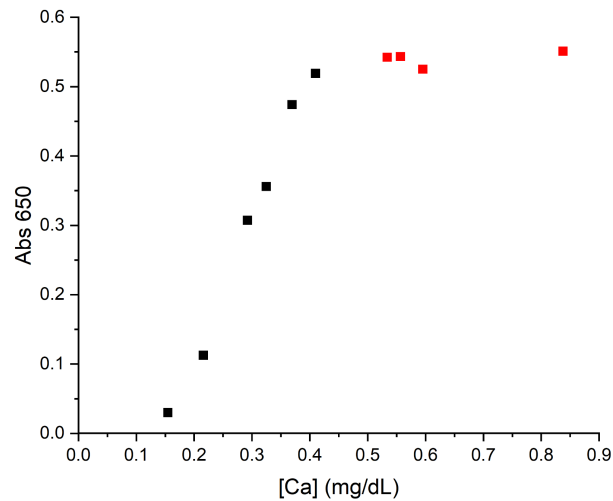


Figura 4.5: Variación da absorbancia a 650 nm coa concentración de Ca das mostras co reactivo TEST.

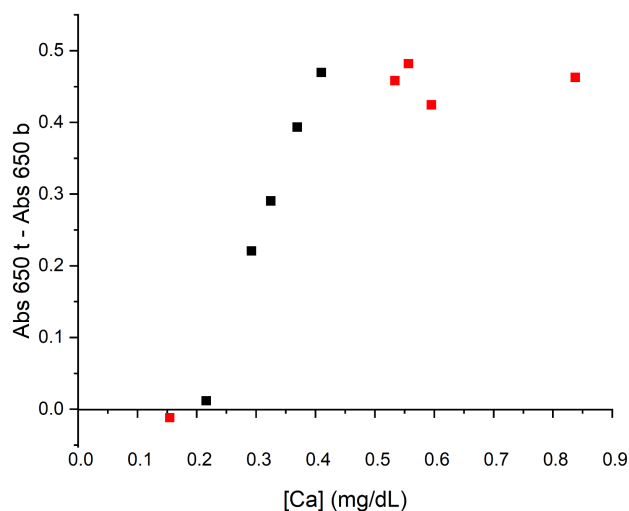


Figura 4.6: Variación da absorbancia a 650 nm coa concentración de Ca da diferenza de absorbancias das mostras t e b.

Como se pode apreciar nas figuras 4.5 e 4.6, a relación entre a absorbancia e a concentración de Ca é lineal no intervalo que vai desde 0,15 mg/dL-0,20 mg/dL a 0,4 mg/dL de Ca (puntos marcados en negro nas figuras 4.5 e 4.6). Isto quere dicir que nese intervalo pódese aplicar a lei de Lambert-Beer (ecuación 1.1).

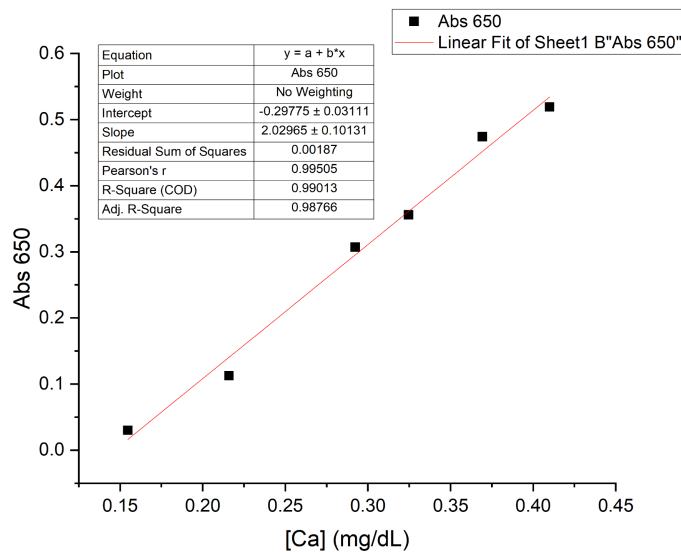


Fig 4.7: Axuste lineal da absorbancia a 650 nm fronte á concentración de Ca (espectros t).

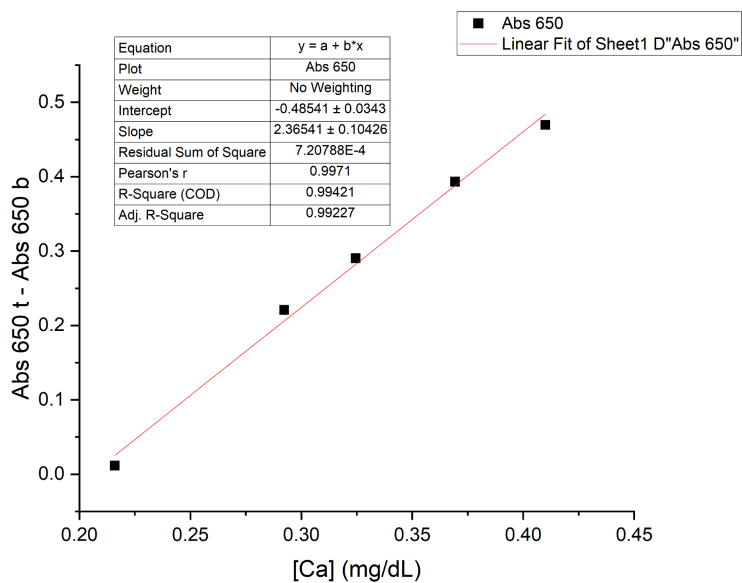


Fig 4.8: Axuste lineal da diferenza de absorbancias dos espectros t e b a 650 nm fronte á concentración de Ca.

As figuras 4.7 e 4.8 mostran as rectas de calibrado resultantes do axuste lineal aos datos experimentais de absorbancia a 650 nm (figura 4.7) e a diferenza de absorbancia a 650 nm entre as mostras t e b (figura 4.8) fronte á concentración de Ca.

A táboa 4.1 recolle as pendentes e ordenadas na orixe que se empregaron para medir a concentración de Ca nas mostras.

Táboa 4.1: pendentes e ordenadas na orixe das rectas de calibrado utilizadas para o zincon.

Recta de calibrado	Pendente	Ordenada na orixe
Espectros t	2,03	-0,30
Espectros t-b	2,37	-0,39

Medida das mostras de soro

Medíronse os espectros das mostras diluídas a 0,3 mg/dL de Ca, concentración dentro do intervalo no que son válidas as curvas de calibrado obtidas anteriormente.

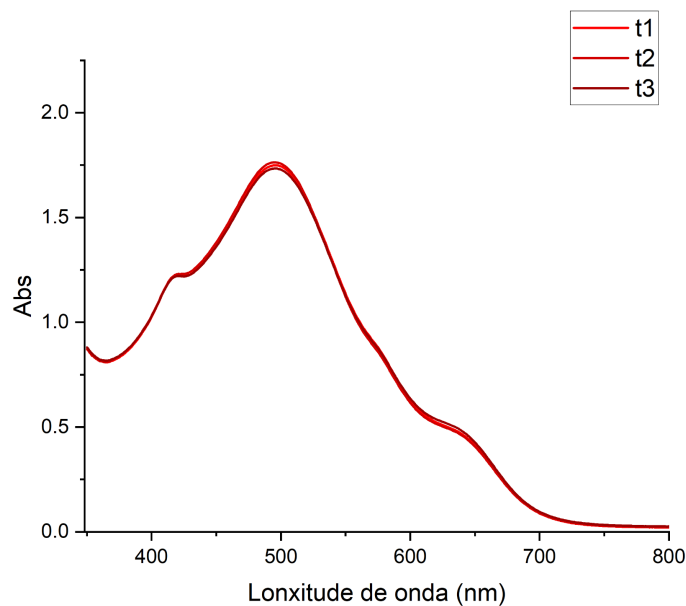


Fig 4.9: Espectros de absorción das tres dilucións da mostra 2 (táboa 2.3) que se mediron co reactivo TEST.

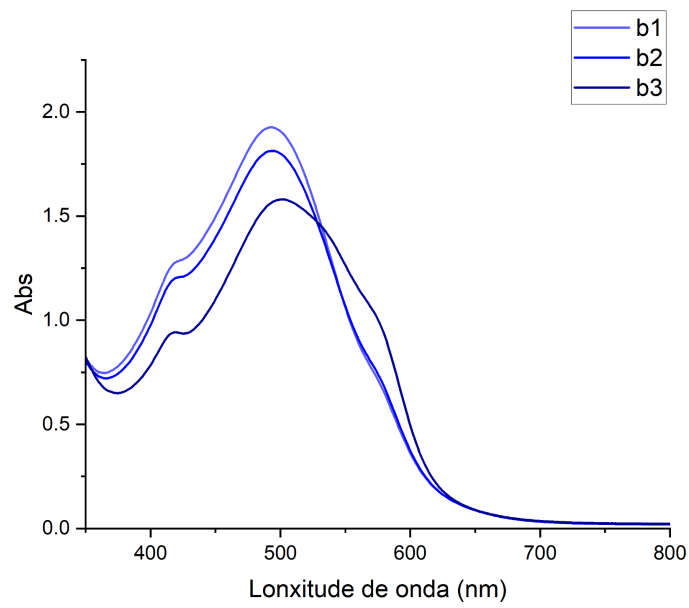


Fig 4.10: Espectros de absorción das tres dilucións da mostra 2 (táboa 2.3) que se mediron co reactivo BLANK.

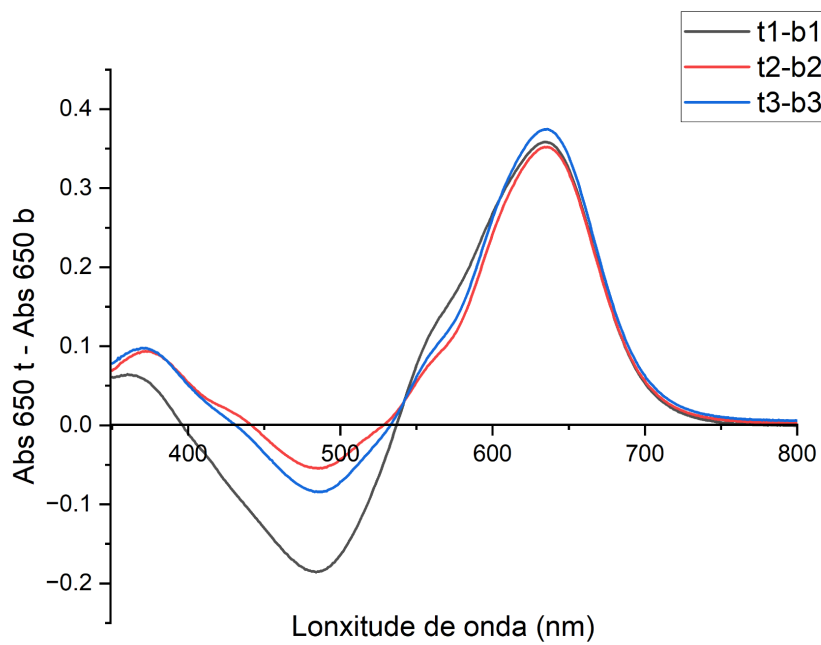


Fig 4.11: Espectros diferenza (espectros t-espectros b) das dilucións da mostra 2.

Os resultados das medidas das mostras 1_1, 1_2 e 2 co método do zincon aparecen recollidos na táboa 4.2; tanto os obtidos coa recta de calibrado que se fixo utilizando os espectros test (t) como os obtidos coa que se fixo cos espectros resultado de restar os brancos dos test (t-b). Está reflectida a media das tres medidas que se fixeron de cada mostra e a desviación estándar das mesmas.

Táboa 4.2: resultados das medidas das mostras 1, 1_2 e 2 co método zincon.

mostra	1_1		1_2		2	
[Ca](mg/dl)	7,10		7,10		8,00	
	media	desviación estándar	media	desviación estándar	media	desviación estándar
[Ca](mg/dl) t-b	4,94	1,31	7,51	0,38	8,56	0,48
[Ca](mg/dl) t	5,08	1,32	7,88	0,39	8,79	0,50

Como se pode ver na táboa 4.2, os resultados da mostra 1_1 dan moi por baixo do valor real e tamén dan por baixo dos valores obtidos para as outras mostras. Isto pode deberse a algún erro experimental ou a interferencias por compoñentes da propia mostra (podería ser por unha hemólise excesiva).

Tamén se pode observar que a recta “t” dá valores máis altos que a recta “t-b”, posiblemente debido a interferencias de compostos que provocan un aumento de absorbancia que son eliminadas ao restar os espectros dos brancos.

Hai unha serie de catións que poderían interferir á hora de detectar o Ca mediante este método, xa que tamén se unen ao zincon e provocan un cambio de cor similar ao que produce o zinc. Entre os catións que poden causar interferencias atópanse o níquel (Ni^{2+}), o cobalto (Co^{2+}), o chumbo (Pb^{2+}), o mercurio (Hg^{2+}) e o cadmio (Cd^{2+}). Cada un destes metais ten a capacidade de formar complexos co zincon, resultando nun cambio de cor que pode ser confundido co sinal producido polo Ca desprazando ao zinc. A pesar destas potenciais interferencias, estas non supoñen un problema significativo á hora de medir a concentración de Ca en mostras de sangue bovino, xa que, en condicións normais, estes catións non se atopan presentes en concentracións detectábeis no sangue.

Un caso distinto é o do cobre, que se atopa en cantidades mínimas pero detectábeis no sangue e pode interferir na detección de Ca mediante este método. A presenza de cobre é particularmente relevante debido á súa afinidade polo zinco, superando incluso á do zinc.

O complexo cobre-zinco presenta unha constante de disociación (K_d) de $4,68 \times 10^{-17}$ M, moito menor que a do complexo zinc-zinco, que ten unha constante de disociación de $2,09 \times 10^{-6}$ M (14). Esta diferenza indica que o complexo cobre-zinco é considerablemente máis estábel e ten unha maior tendencia a formarse. Como resultado, incluso pequenas cantidades de cobre poden competir eficazmente co zinc, formando complexos cobre-zinco e reducindo a precisión da medición do Ca.

Ademais, outra complicación na detección do Ca atópase nas propiedades espectroscópicas dos complexos formados. Os picos de absorción dos complexos cobre-zinco e zinc-zinco aparecen a lonxitudes de onda moi próximas (19).

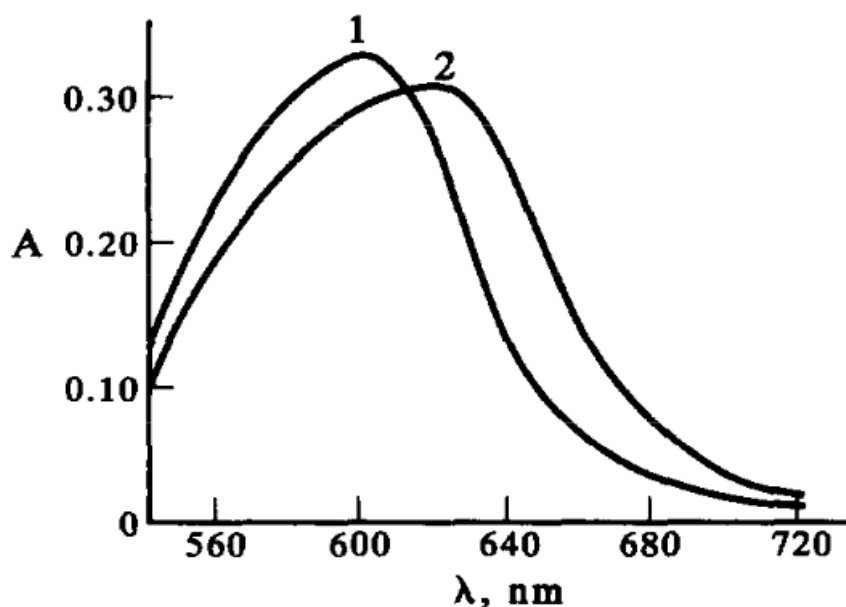


Fig 4.9: Espectros de absorción do complexo cobre-zinco (1) e do complexo zinc-zinco (2). Tomado de (19).

Na figura 4.12, pode apreciarse unha banda a lonxitudes de onda próximas aos 600 nm no espectro b3, que podería deberse á interferencia do cobre.

En xeral os resultados obtidos con este método son bastante bos, próximos ao valor real da concentración de Ca de cada mostra (a excepción da xa mencionada mostra 1_1), pero hai que ter en conta as dificultades experimentais asociadas á utilización do zincon como indicador. A inestabilidade dos reactivos, a necesidade de facer un branco para cada medida e o feito de ter que facer as medidas poucos minutos despois de preparar as mostras fano un método pouco idóneo para empregar nun dispositivo coas características do que se quere desenvolver.

Método 2: Arsenazo III

Curvas de calibrado

No caso do arsenazo III fixéronse varias curvas de calibrado: dúas empregando a disolución nai de Ca e tres empregando as mostras de soro (1_2, 2 e 3).

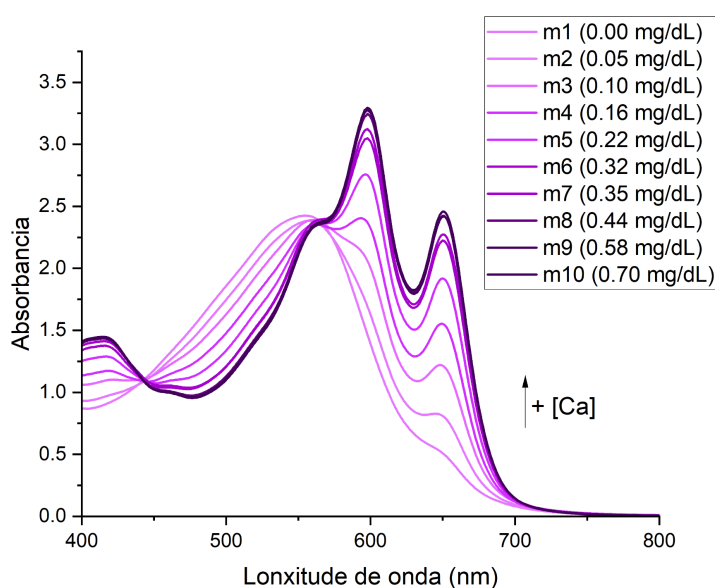


Fig 4.10: Espectros de absorción dunha das rectas de calibrado feitas con disolución nai de cloruro cálcico (método arsenazo III).

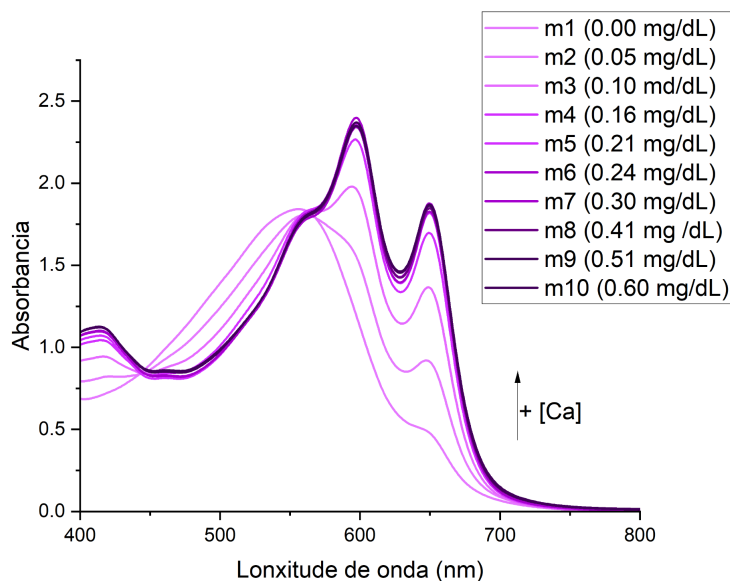


Fig 4.11: Espectros de absorción da recta de calibrado feita coa mostra 1_2 (método arsenazo III).

Como se pode observar nas figuras 4.10 e 4.11 os espectros para as rectas de calibrado feitas tanto de soro sanguíneo como de disolución nai de Ca son bastante similares. Presentan dúas bandas onde se ve unha clara variación da absorbancia coa concentración de Ca, unha no máximo, a 597 nm, e outra en torno a 650 nm.

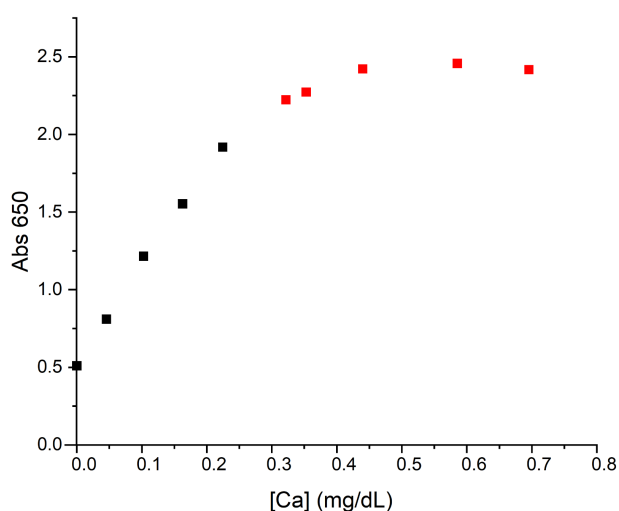


Fig 4.12: Variación da absorción a 650 nm coa concentración de Ca (método arsenazo III, recta de calibrado con disolución nai de Ca).

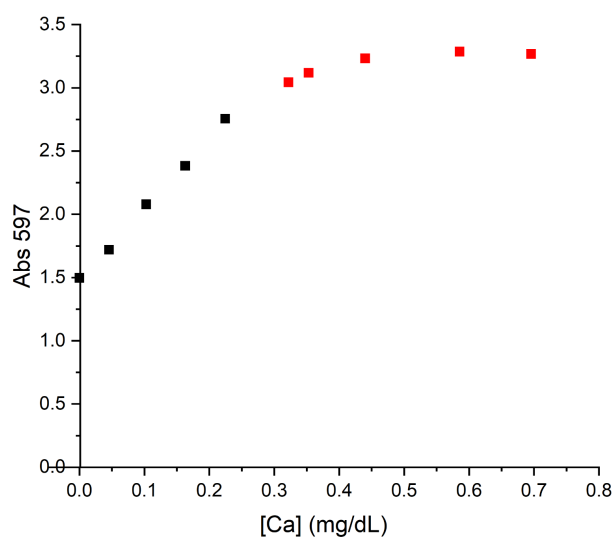


Fig 4.13: Variación da absorción a 597 nm coa concentración de Ca (método arsenazo III, recta de calibrado con disolución nai de Ca).

Nas figuras 4.12 e 4.13 pódese observar que a relación entre o cambio na absorbancia do arsenazo III e a concentración de Ca é lineal no intervalo que vai de 0 mg/dL a 0,2 mg/dL de Ca. Polo tanto, as rectas de calibrado fanse nese intervalo (figuras 4.14 e 4.15).

Para a obtención de rectas de calibrado, elixíronse as lonxitudes de onda dos máximos do espectro do arsenazo III en presenza de Ca, a 650 nm e 597 nm, xa que a variación de absorbancia coa concentración é máxima a esas lonxitudes de onda.

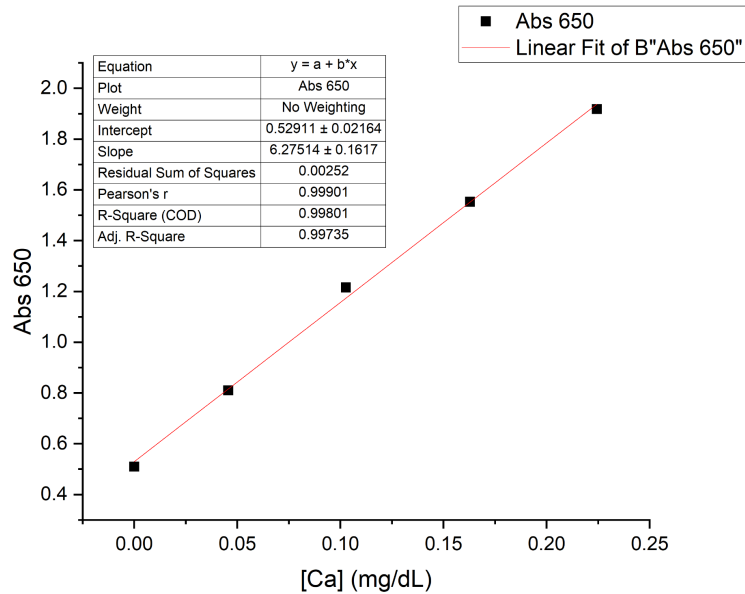


Fig 4.14: Axuste lineal da absorbancia a 650 nm fronte á concentración de Ca (método arsenazo III, recta de calibrado con disolución nai de Ca).

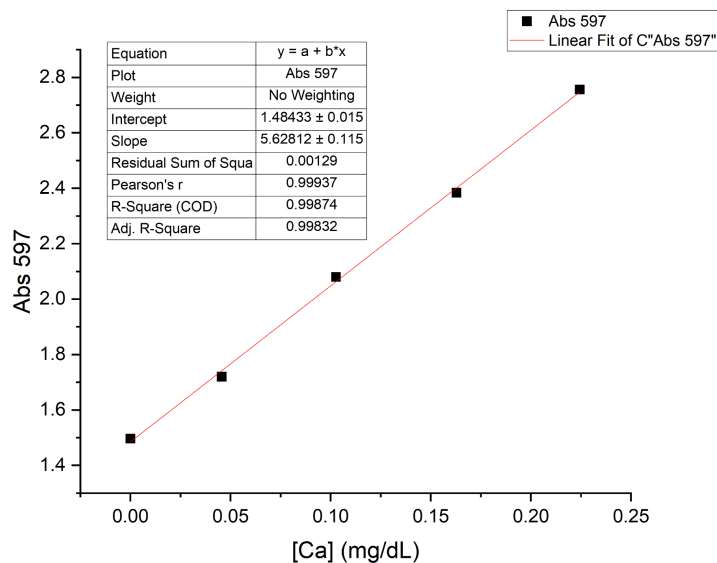


Fig 4.15: Axuste lineal da absorbancia a 597 nm fronte á concentración de Ca (método arsenazo III, recta de calibrado con disolución nai de Ca).

Observouse que o reactivo preparado con arsenazo III e PIPES perdía cor (absorbancia) co paso do tempo, polo tanto, para poder empregar as rectas de calibrado hai que normalizar os valores de absorbancia dividíndoos polo valor de absorbancia do arsenazo III sen complexar, é dicir, pola absorción das mostras sen Ca (o primeiro punto das rectas de calibrado).

Para facer a mesma normalización coa absorbancia das medidas das mostras (das que non hai unha medida do arsenazo III só, sen Ca, no momento das medidas) estímase cal sería absorbancia do arsenazo só. Isto faise tendo en conta o tempo transcurrido desde a preparación do reactivo. Para facelo, calcúlase o coeficiente de absorvidade molar aparente (ϵ aparente) do arsenazo dividindo a súa concentración entre a súa absorbancia sen complexar, e represéntase a súa variación fronte ao tempo (figura 4.16).

Con esta representación pódese estimar o valor de ϵ aparente no momento de facer as medidas e por tanto o valor de absorbancia que tería o arsenazo III sen complexar, que se calcula multiplicando o valor de ϵ calculado pola concentración de arsenazo III de cada mostra.

Unha vez é coñecido o valor de absorbancia do arsenazo III sen complexar, divídese a absorbancia das mostras por ese valor para poder empregar as rectas normalizadas.

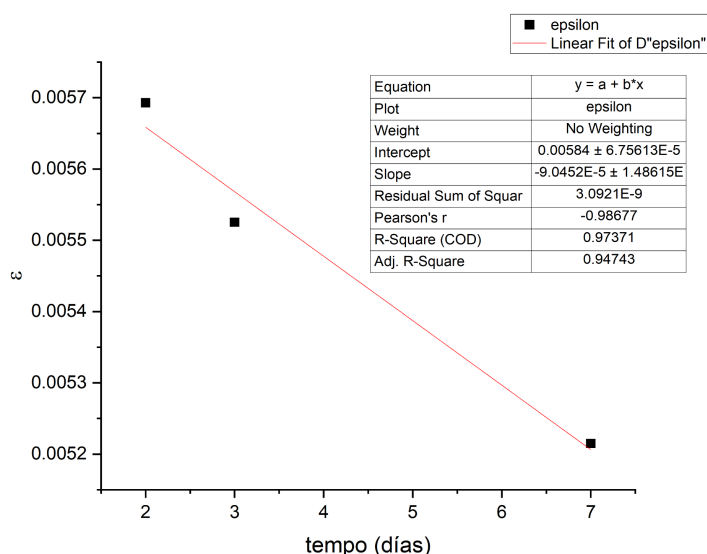


Figura 4.16: Representación da variación do ϵ aparente do arsenazo III fronte ao tempo e axuste lineal (lonxitude de onda de 650 nm).

Como amosa a figura 4.18, as rectas feitas coa disolución nai de cloruro cálcico e as feitas con mostras de soro sanguíneo teñen pendentes similares. Con todo, a recta

de calibrado obtida coa mostra 1_2 de soro sanguíneo presenta claramente unha pendente máis alta que as obtidas con outras mostras de soro e coa disolución de cloruro cálcico.

Este feito podería ser debido á influencia do soro sobre o espectro de absorción do arsenazo III. No anexo 3 móstranse as rectas de calibrado feitas a partir de mostras de soro sanguíneo corrixidas pola contribución do soro. Case non hai cambios respecto ás non corrixidas e segue a observarse unha pendente significativamente maior ás demais na recta feita a partir da mostra 1_2. Polo tanto, non se pode atribuír esta desviación ao efecto do soro.

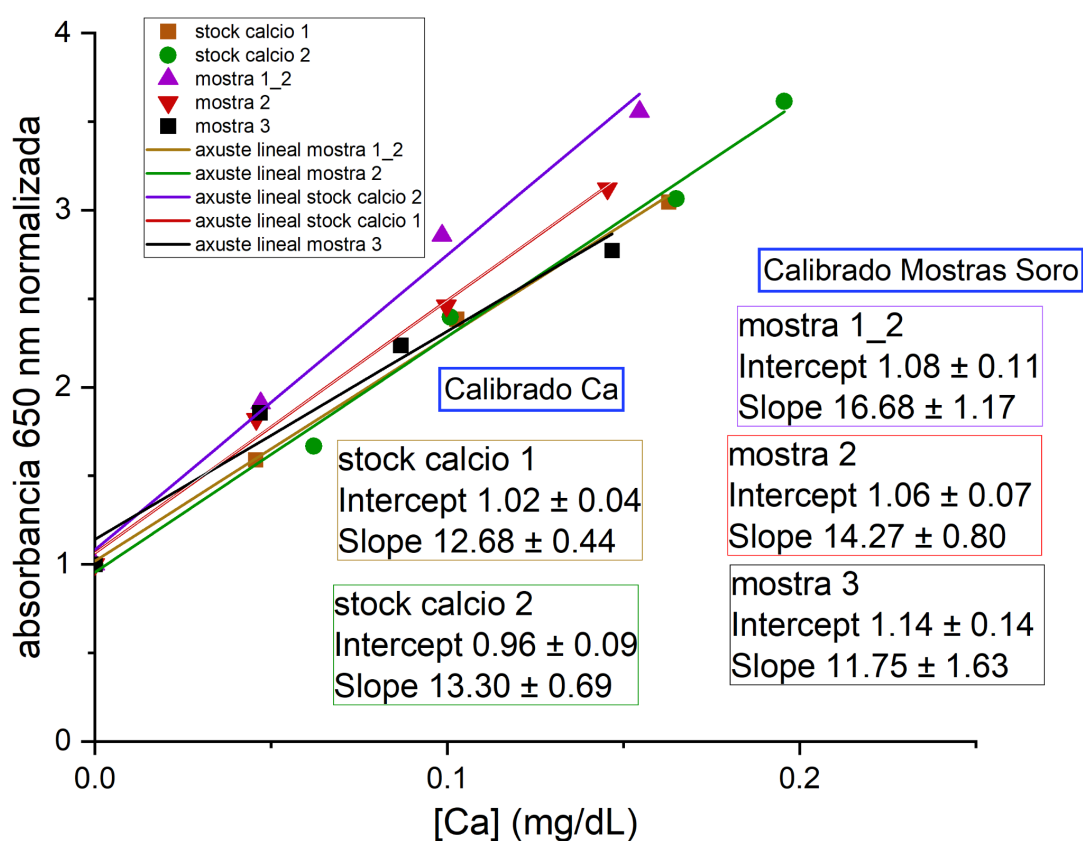


Figura 4.19.: Rectas de calibrado a 650 nm empregando arsenazo III. Rectas normalizadas co valor da absorbancia do arsenazo III sen complexar.

Ademais das rectas de calibrado a 597 nm e 650 nm tamén se fixeron rectas usando o método ratiométrico (figura 4.20), dividindo as absorbancias a 597 nm (máximo dos espectros con todo o arsenazo III complexado) entre as absorbancias a 555 nm (máximo dos espectros con todo o arsenazo III libre).

Cando se emprega un método ratiométrico non se utiliza a absorbancia a unha única lonxitude de onda, se non que se usa a relación entre absorbancias a dúas lonxitudes de onda, polo que é independente de factores externos que poidan afectar á inensidade absoluta da sinal.

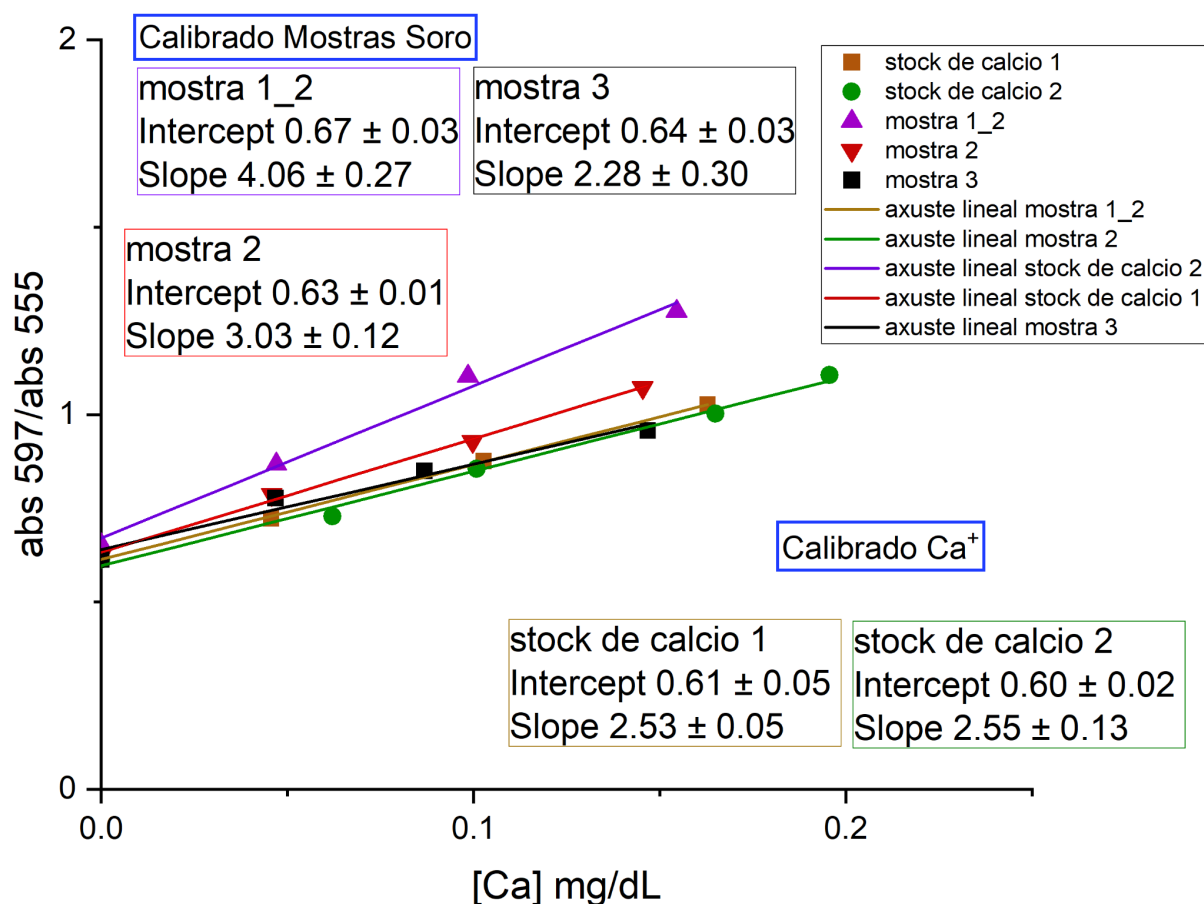


Figura 4.20: Rectas de calibrado do método ratiométrico con arsenazo III. Absorbancia 597 nm dividida entre a absorbancia a 650 nm.

A táboa 4.3 recolle as pendentes e ordenadas na orixe que se empregaron para medir o Ca nas mostras.

Táboa 4.3: Pendentes e ordenadas na orixe das rectas de calibrado corrixidass pola absorbancia do arsenazo III sen complexar.

	Recta de calibrado	Pendente	Ordenada na orixe
650 nm	nai Ca 1	12,31	1,04
	nai Ca 2	12,26	1,04
	mostra 1_2	16,67	1,08
	mostra 2	14,27	1,08
	mostra 3	14,35	1,06
650 nm sen plasma	mostra 1_2	16,41	1,08
	mostra 2	12,95	1,12
	mostra 3	11,74	1,14
597 nm	nai Ca 1	3,34	1,02
	nai Ca 2	3,68	1,00
	mostra 1_2	5,79	1,02
	mostra 2	4,03	1,03
	mostra 3	3,47	1,05
597/555	nai Ca 1	2,58	0,61
	nai Ca 2	2,72	0,56
	mostra 1_2	4,05	0,67
	mostra 2	2,84	0,64
	mostra 3	2,10	0,65

Medida das mostras de soro

A táboa 4.4 reflicte a media das tres medidas que se fixeron de cada mostra con cada recta de calibrado e a desviación estándar das mesmas.

Táboa 4.4: resultados das medidas das mostras 1, 1_2, 2 e 3 co método arsenazo III. As rectas nomeadas como “650 nm sen plasma” son as rectas feitas coas mostras pero restando o espectro do plasma diluído para así elimnar posibles interferencias.

	mostra	1		2		1_2		3	
	[Ca](mg/dl)	7,10		8,00		7,10		9,80	
	R de calibrado	M	D.E	M	D.E	M	D.E	M	D.E
650 nm	nai Ca 1	10,96	0,31	9,20	0,56	10,44	0,12	8,20	0,21
	nai Ca 2	10,99	0,31	9,22	0,56	10,48	0,12	8,22	0,22
	mostra 1_2	7,85	0,23	6,53	0,43	7,46	0,09	5,77	0,15
	mostra 2	9,29	0,27	7,76	0,49	8,83	0,11	6,89	0,18
	mostra 3	9,27	0,27	7,75	0,49	8,82	0,11	6,89	0,18
650 nm sen plasma	mostra 1_2	7,97	0,24	6,64	0,44	7,57	0,09	5,88	0,15
	mostra 2	9,03	0,33	7,28	0,63	8,47	0,14	8,09	0,16
	mostra 3	10,66	0,34	8,77	0,65	10,08	0,14	8,05	0,20
597 nm	nai Ca 1	14,07	1,45	12,15	0,85	13,82	0,31	9,96	1,23
	nai Ca 2	13,40	1,45	11,70	0,72	13,21	0,26	9,73	1,12
	mostra 1_2	8,19	0,93	7,09	0,48	8,05	0,17	5,83	0,71
	mostra 2	11,50	1,33	9,91	0,71	11,29	0,26	8,09	1,02
	mostra 3	13,29	1,67	11,27	0,95	12,98	0,34	9,00	1,25
597/555	nai Ca 1	10,10	0,95	8,90	0,61	10,15	0,17	10,15	0,17
	nai Ca 2	11,10	0,88	10,07	0,47	11,24	0,22	11,24	0,22
	mostra 1_2	5,07	0,63	4,23	0,43	5,03	0,07	5,03	0,07
	mostra 2	8,16	0,88	7,02	0,63	8,15	0,12	8,15	0,12
	mostra 3	10,76	1,20	9,20	0,87	10,74	0,15	10,74	0,22

Como se ve na táboa 4.4, o método do arsenazo III tende a sobreestimar a cantidade de Ca que hai na mostra. Isto pasa con todas as rectas de calibrado menos coa que se fixo coa mostra 1_2, que a excepción das dúas mostras coa

mesma concentración de Ca (1_1 e 1_2), dá valores por debaixo do real. Esta sobreestimación é un problema tendo en conta o tipo de dispositivo que se quere desenvolver, xa que podería dar falsos negativos.

Esta inexactitude é probablemente debida a interferencias por compoñentes do soro, polo que unha posíbel solución é a utilización de métodos ratiométricos para minimizar esas interferencias.

Neste traballo analizouse unha posíbel combinación de lonxitudes de onda para aplicar o método ratiométrico (597 nm e 555 nm), obtendo valores mis próximos aos reais (como amosa a táboa 5.1).

De cara a máis coa investigación, sería interesante probar outras combinación de lonxitudes de onda para aplicar o método ratiométrico, varias opcións interesantes serían:

- Empregar os dous máximos onde se ve maior variación da absorbancia coa concentración de Ca: 650 nm e 597 nm.
- Utilizar un deses máximos (650 nm ou 597 nm) e o primeiro punto isobéstico (565 nm).
- Facer o mesmo co segundo punto isobéstico (440 nm).
- Utilizar algún punto entre 450 nm e 550 nm, xa que neste intervalo a relación da absorbancia coa concentración de Ca é inversamente proporcional (como se ve nas figuras 5.1 e 5.2).

Tamén cabe destacar que os valores obtidos confirman que o método do Arsenazo III detecta o Ca total, tal e como se salientou na introdución. Isto débese á moito maior constante de complexación do arsenazo III co Ca en comparación coa constante de complexación do arsenazo III coa serolalbúmina.

Comparativa entre os dous métodos

Despois de facer rectas de calibrado e medidas tanto con zincon como con arsenazo III, pódese facer unha comparativa entre os dous métodos e valorar a súa viabilidade para ser utilizados nun prototipo de dispositivo *point of care* de

cuantificación de Ca total, que permita diagnosticar a HCS “a pé de vaca” analizando mostras de soro sanguíneo.

No caso do zincon, os resultados obtidos con este método son bastante bos e próximos ao valor real da concentración de Ca de cada mostra. Estes resultados positivos indican que o método ten potencial para proporcionar medidas precisas. Non obstante, é importante ter en conta as dificultades experimentais asociadas á utilización do zincon como indicador.

Primeiramente, a inestabilidade dos reactivos representa un desafío significativo, xa que imposibilita ter un nai almacenado durante períodos longos de tempo. Ademais, a necesidade de facer un branco para cada medida complica o proceso, xa que engade pasos adicionais que dificultarían moito as medidas en granxa.

Outro factor crítico é o feito de que as medidas deben realizarse poucos minutos despois de preparar as mostras. Esta restrición temporal é problemática porque require unha sincronización precisa e pode non ser práctica nun dispositivo deseñado para un uso máis flexible e autónomo.

Tamén hai que ter en conta as interferencias do soro que afectan a este método, como o cobre ou a hemoglobina, que poden inducir a variabilidade nos resultados.

En resumo, a pesar dos resultados favorables en termos de precisión, as dificultades experimentais fan que este método sexa pouco idóneo para empregar nun dispositivo coas características desexadas.

Por outra banda, co arsenazo III obtivéronse resultados máis dispares e afastados do valor real, aínda que dentro da orde de magnitude esperada. Mais, cómpre destacar que o procedemento para facer as medidas é moito máis simple que no caso do zincon xa que non é necesario preparar brancos para cada mostra e só é necesario un tipo de reactivo. Se ben é certo que se observou unha perda de absorbancia no arsenazo III co paso dos días, isto pode solucionarse facilmente normalizando as medidas coa absorbancia do arsenazo III sen complexar no momento de facer a medición.

Os resultados das medidas, que tenden a sobreestimar a cantidade de Ca que hai na mostra, posibelmente sexan debidos á composición da soro bovino, que fai que

aumente a absorbancia das mostras. Unha posíbel solución a isto é a utilización de métodos ratiométricos, que reduzan a influencia de factores externos na absorbancia das mostras.

Tendo en conta todo isto, aínda que os resultados obtidos co arsenazo III son algo menos precisos que os obtidos co zincon, este preséntase como un método con máis potencialidade para desenvolver un dispositivo das características que interesan, aínda que é necesario seguir probándoo para conseguir resultados que se axusten mellor aos valores reais. É importante ter en conta que non se pode sobreestimar a cantidade de Ca, xa que isto podería dar lugar a falsos negativos, provocando que non se detecten animais en situación de HCS e que non se poidan tratar.

A táboa 4.5 compara os dous métodos nos aspectos a ter en conta para o prototipo do dispositivo que se quere desenvolver.

Táboa 4.5: comparación entre o zincon e o arsenazo III.

	Zincon	Arsenazo III
Cuantificación de Ca	✓✓	✓
Estabilidade	✗	✓
Interferencias	✗	✓
Viabilidade para o prototipo do dispositivo “point of care”	✗	✓

5-CONCLUSIÓN

Despois de facer as medidas e comparar ambos métodos, chégase á conclusión de que indicador máis axeitado para o prototipo de dispositivo de medición de Ca é o arsenazo III.

Aínda que co arsenazo III obtivéronse resultados máis afastados do valor real de calcio nas mostras, é máis viábel utilizalo nun dispositivo para o seu uso rutineiro en granxa, xa que os reactivos son máis estábeis que no caso do zincon e o procedemento de medida é máis simple.

Requírese desenvolver unha análise multiparamétrica que permita determinar a concentración de Ca por complexación co arsenazo III de forma máis precisa e en presenza de soro sanguíneo con diversos graos de hemólise.

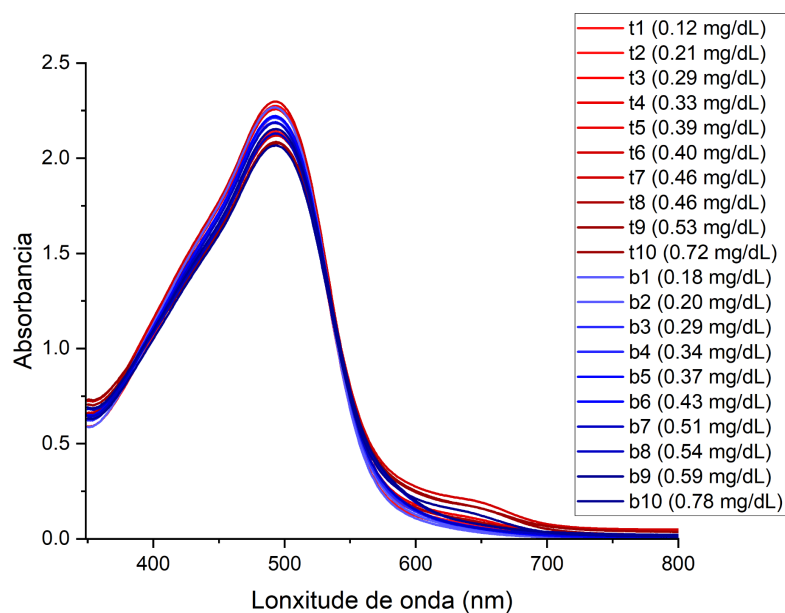
6-BIBLIOGRAFÍA

1. Chapinal N, Carson M, Duffield TF, Capel M, Godden S, Overton M, et al. The association of serum metabolites with clinical disease during the transition period. *J Dairy Sci.* October 2011;94(10):4897–903.
2. Martinez N, Risco CA, Lima FS, Bisinotto RS, Greco LF, Ribeiro ES, et al. Evaluation of peripartal calcium status, energetic profile, and neutrophil function in dairy cows at low or high risk of developing uterine disease. *J Dairy Sci.* December 2012;95(12):7158–72.
3. Van Saun RJ. Metabolic Profiling in Ruminant Diagnostics. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* March 2023;39(1):49–71.
4. Couto Serrenho R, DeVries TJ, Duffield TF, LeBlanc Stephen J. Graduate Student Literature Review: What do we know about the effects of clinical and subclinical hypocalcemia on health and performance of dairy cows? *J Dairy Sci.* May 2021;104(5):6304–26.
5. Rodriguez J, Hernan Rico D, Domenianni L, Laria D. Confinement of Polar Solvents within beta-Cyclodextrins. *J Phys Chem B.* 112(25):7522-759.
6. Caixeta LS, Ospina PA, Capel MB, Nydam DV. Association between subclinical hypocalcemia in the first 3 days of lactation and reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology.* May 2017;94:1–7.
7. Neves RC, Stokol T, Bach KD, McArt JAA. Method comparison and validation of a prototype device for measurement of ionized calcium concentrations cow-side against a point-of-care instrument and a benchtop blood-gas analyzer reference method. *J Dairy Sci.* February 2018;101(2):1334–43.
8. Reinhardt TA, Lippolis JD, McCluskey BJ, Goff JP, Horst RL. Prevalence of subclinical hypocalcemia in dairy herds. *Vet J.* April 2011;188(1):122–4.
9. Leno BM, Neves RC, Louge IM, Curler MD, Thomas MJ, Overton TR, et al. Differential effects of a single dose of oral calcium based on postpartum plasma calcium concentration in Holstein cows. *J Dairy Sci.* April 2018;101(4):3285–302.
10. Oetzel GR. Non-infectious Diseases: Milk Fever. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences* [Internet]. Elsevier; 2022 [cited June 19, 2024]. p. 414–22. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128187661001641>
11. Peiró JR, Borges AS, Gonçalves RC, Mendes LCN. Evaluation of a portable clinical analyzer for the determination of blood gas partial pressures, electrolyte concentrations, and hematocrit in venous blood samples collected from cattle, horses, and sheep. *Am J Vet Res.* May 2010;71(5):515–21.
12. Mamaril AM, Glasco DL, Leal Yepes FA, Bell JG. Identifying Hypocalcemia in Dairy Cattle by Combining 3D Printing and Paper Diagnostics. *ECS Sens Plus.* December 1, 2022;1(4):040601.
13. Inicio - IDEXX Spain [Internet]. [cited June 19, 2024]. Available at: <https://www.idexx.es/es/>
14. Säbel CE, Neureuther JM, Siemann S. A spectrophotometric method for the determination of zinc, copper, and cobalt ions in metalloproteins using Zincon. *Anal*

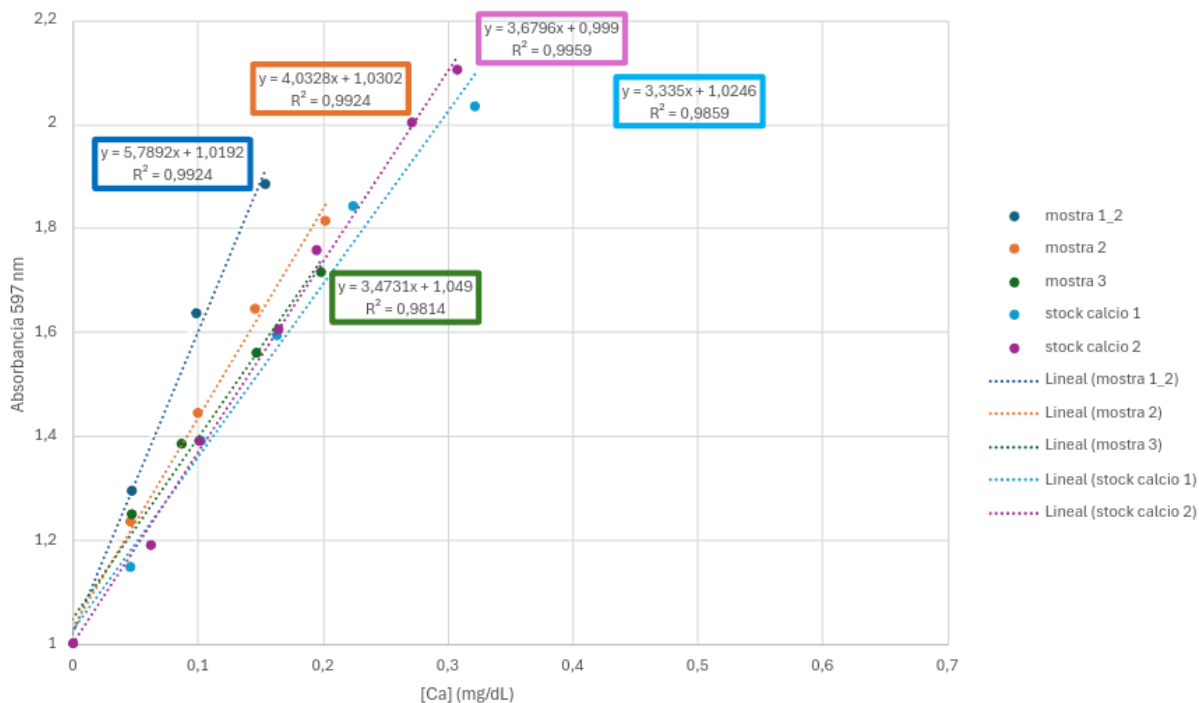
Biochem. February 2010;397(2):218–26.

15. Corns CM. A New Colorimetric Method for the Measurement of Serum Calcium Using a Zinc-Zincon Indicator.
16. Arsenazo III calcium-sensitive dye | 1668-00-4 [Internet]. [cited June 22, 2024]. Available at: <http://www.sigmaaldrich.com/>
17. Gratzer WB, Beaven GH. Use of the metal-ion indicator, Arsenazo III, in the measurement of calcium binding. *Anal Biochem.* July 1977;81(1):118–29.
18. Pedersen KO. Binding of Calcium to Serum Albumin I. Stoichiometry and Intrinsic Association Constant at Physiological pH, Ionic Strength, and Temperature. *Scand J Clin Lab Invest.* January 1971;28(4):459–69.
19. Liu RM, Liu DJ, Sun AL. Simultaneous determination of multicomponents by flow injection analysis Determination of copper and zinc in serum by using zincon as colouring reagent. *Talanta.* April 1993;40(4):511–4.

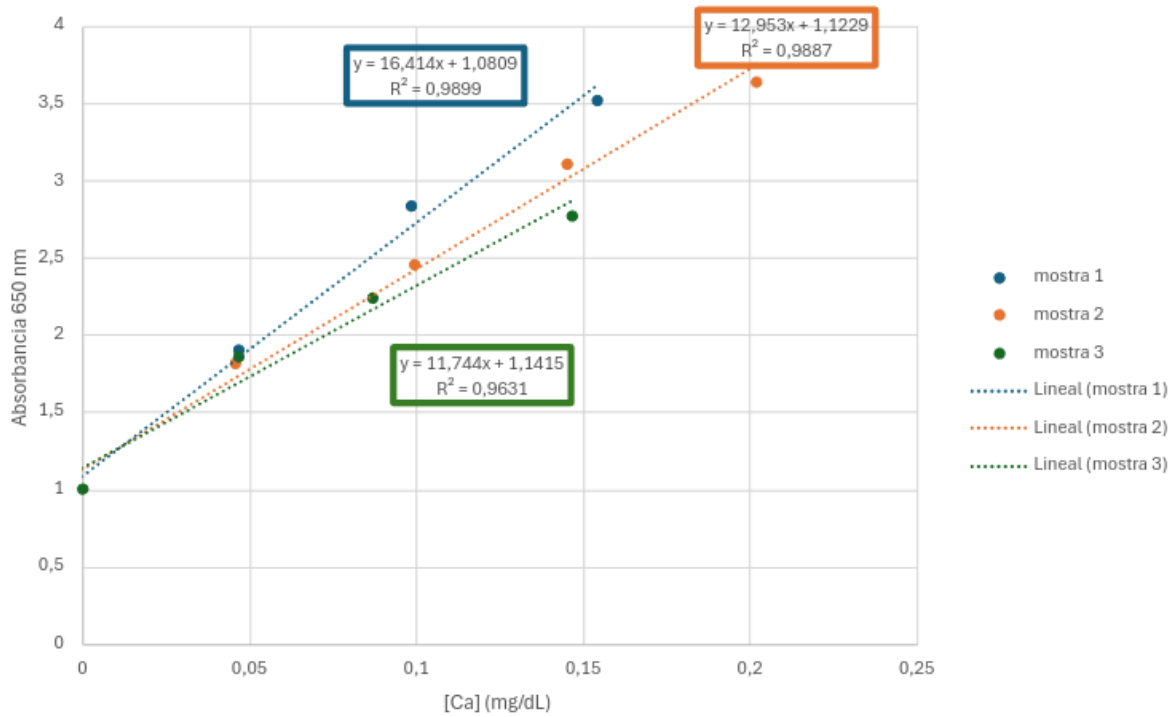
7-ANEXOS



Anexo 1: Curva de calibrado empregando zincon cando o tampón z xa levaba 5 días preparado. Espectros co reactivo TEST e espectros co reactivo BLANK.



Anexo 2: Rectas de calibrado a 597 nm empregando arsenazo III. Rectas normalizadas co valor da absorbancia do arsenazo III sen complexar.



Anexo 3: Rectas de calibrado a 650 nm empregando arsenazo III. Rectas de calibrado feitas con mostra ás que se lle restou o espectro do soro diluído. Rectas normalizadas co valor da absorbancia do arsenazo III sen complexar.