

Tesis de Posgrado

Análisis cualitativo y cuantitativo de la bilirrubina, urobilina, sales biliares, colesterol, albumina y mucina en el líquido duodenal

Brovedani, María Ivonne

1943

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:

Brovedani, María Ivonne. (1943). Análisis cualitativo y cuantitativo de la bilirrubina, urobilina, sales biliares, colesterol, albumina y mucina en el líquido duodenal. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0324_Brovedani.pdf

Cita tipo Chicago:

Brovedani, María Ivonne. "Análisis cualitativo y cuantitativo de la bilirrubina, urobilina, sales biliares, colesterol, albumina y mucina en el líquido duodenal". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1943.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0324_Brovedani.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

324

FCFBA. 40

ANALISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO
DE LA
BILIRRUBINA, UROBILINA, SALES BILIARES,
COLESTEROL, ALBUMINA Y MUCINA
EN EL
LIQUIDO DUODENAL.

Tesis de Doctorado en Química

MARIA IVONNE BROVEDANI

Tesis. 324

ej. 2

Buenos Aires
1943

padrino de tesis

Dr. VICTORIA DOMERA

Al Dr. ANDRES LOPEZ GARCIA
de la Academia Nacional de Medicina,
bajo cuya dirección y control fué
ejecutado el presente trabajo.

A los niños.

PROLOGO

La práctica del sondeo duodenal introducida con fines diagnóstico y terapéuticos por Meltzer-Lyon se ha beneficiado considerablemente estos últimos tiempos con la aplicación de técnicas químicas capaces de afinar el diagnóstico y evitar los errores propios de la apreciación macroscópica del tipo de bilis extrañas. El estudio del metabolismo de los pigmentos biliares ha recibido en efecto un impulso considerable gracias a la utilización de nuevas técnicas o a la aplicación de la espectrografía y espectroscopia al perfeccionamiento de los antiguos procedimientos colorimétricos. Muchos de estos adelantos han sido ya utilizados en el estudio de los líquidos orgánicos, y en particular en el del contenido duodenal extraído por sondeo en ayunas previa estimulación biliar.

Las funciones del químico y bacteriólogo se han visto así considerablemente acrecentadas y comprometida su responsabilidad en el diagnóstico clínico.

Es a la valoración y comparación de los distintos procedimientos químicos más en boga que hemos dedicado este trabajo; los procedimientos espectrofotométricos utilizando el fotómetro de Pulfrich han merecido preferentemente nuestra atención, siguiendo en esto los trabajos iniciados por el Dr. Andrés López García, en cuyo laboratorio del Instituto de Investigaciones de la Academia Nacional de Medicina, pude llevar a cabo estos estudios.

Agradezco la cooperación que me ha prestado el Dr. N. Patalano para el mejor éxito del presente trabajo.

FOYB-A.

1A TÉCNICA DE OBTENCIÓN DEL LÍQUIDO DUODENAL

El líquido duodenal se obtiene mediante sondaje que se efectúa con un tubo de goma flexible y fino. Entre las sondas más utilizadas figura la de Rehfuss, que consiste en un tubo de goma flexible, de 3 a 4 mm. de diámetro con diversas marcas (a los 40, 56 y 70 cms.), cuyo extremo consta de una oliva metálica, una jeringa de vidrio-para aspirar- acompaña la sonda. Se pueden asimismo citar otros modelos como los de Lyon, Levin y Jutte; Twiss, etc.

Colocada la extremidad de la sonda en el duodeno se estimula la secreción biliar utilizando una solución de sulfato de magnesio, que produce una relajación de las vías biliares, localizada en la región duodenal; o sino se emplean colagogos fisiológicos tales como el aceite de oliva, peptona y ácido oleico. La concentración de sulfato de magnesio utilizada es de un 33 %, solución que se instila a través de la sonda, una o más veces. Se aconsejan las siguientes dosis: una primera instilación con 45 cc., recobrando tanto como sea posible, seguida de una segunda estimulación de 30 cc. y de hasta una tercera instilación de 30 cc. Cuando se usa la peptona se emplean 50 a 100 cc. de una solución al 5 %, esterilizada; también se usa de 15 a 30 cc. de aceite de oliva, entibiado a la temperatura del cuerpo. Si se usa ácido oleico, se diluye de 5 a 10 cc. del ácido puro en 15 a 30 de agua.

El sondaje se debe hacer en ayunas. Se introduce la punta de la sonda en la boca del paciente; cuando dicha punta

FOFNA.

está en la parte posterior de la boca, el paciente debe tragar, y respirar naturalmente a través de la nariz, hasta que dicho extremo de la sonda haya pasado la glotis, después de lo cual, puede ser fácilmente introducida hasta la marca del estómago. Se extrae por gravedad cualquier residuo estomacal. Solamente en algunas ocasiones es necesario ayudarse succionando con una jeringa, en tal caso debe hacerse una succión mínima para evitar traumatismos. Se lava el estómago con agua esterilizada a la temperatura del cuerpo humano. Se la extrae luego. Luego se ordena al paciente que se acueste en la cama, sobre su lado derecho, y debe tragar la sonda muy lentamente, más o menos debe tardar unos 20 minutos hasta tener la marca duodenal en los labios.

Se conecta la sonda a la primer botella. El primer líquido que aparece de un color amarillo, mezcla de jugo duodenal y pancreático. Cuando el extremo de la sonda está en el duodeno, se estimula el flujo de la bilis con cualquiera de las substancias descritas anteriormente, introduciéndolas a la temperatura del cuerpo. A veces una mezcla de sulfato de magnesio y peptona da mayores resultados que cualquiera de los dos solos.

Cuando la oliva ha penetrado en el duodeno es fácil estudiar la bilis empleando la prueba de Meltzer-Lyon (2) (27). De 10 a 15 minutos después de la inyección intraduodenal, de sulfato de magnesio se retira un líquido claro, amarillo dorado y poco viscoso: es la bilis A, que según Lyon sería la bilis proveniente del colédoco. Un cuarto o media hora más

tarde, el líquido extraído cambia bruscamente de aspecto; es más viscoso, más oscuro, más rico en pigmentos biliares; es la bilis B, que provendría de la vesícula biliar. Después de un tiempo más o menos largo, la bilis extraída vuelve a ser más clara y menos espesa; es la bilis C que para Lyon sería la de los canales hepáticos y del hígado.

Se deben cambiar las botellas recolectoras a intervalos, a medida que las fracciones de bilis se van identificando.

Antes de retirar la sonda conviene insuflar un poco de aire, a través de la misma, evitando así que se produzcan raspaduras en las mucosas.

Adhiriéndome a las opiniones de diversos profesionales (Bengolea y Velazco Suárez⁽³⁾, Castex y López García⁽⁴⁾) la práctica de sondeo con fines diagnósticos debe ser realizada por el médico única persona indicada para definir y aprovechar el resultado de esta operación. Siendo el líquido que se extrae una mezcla de jugo gástrico, pancreático y bilis, los componentes se alteran por digestión, siendo necesario que el análisis se efectúe de inmediato. Así por ejemplo: la bilirrubina se oxida; al acidificarse, precipitan las sales biliares, el colesterol; el mesobilirrubinógeno se oxida y se transforma en urobilina; cuando llega a haber albúmina, ésta se digiere: lo mismo sucede con la mucina.

Si no se pudiera efectuar el análisis inmediatamente se recomienda conservar el líquido, un corto tiempo, en la heladera a la temperatura de 4°; se impiden así la acción de los fermentos pero no la oxidación, debido al ácido clor-

hérico del jugo gástrico.

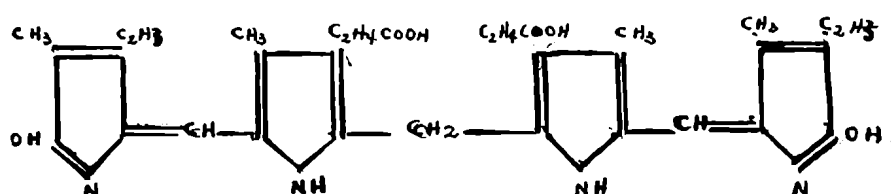
—

24 BILIRRUBINA

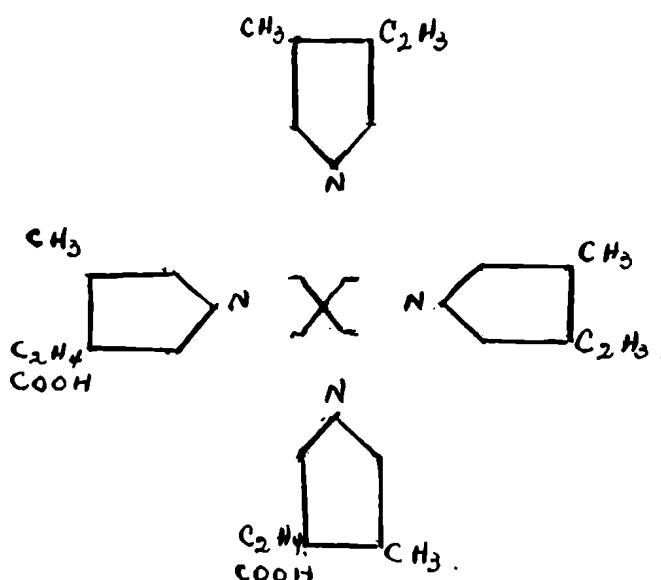
Es la materia colorante parda de la bilis; también se encuentra en el suero sanguíneo al que contribuye a dar su tonalidad característica. Su fórmula bruta $C_{33}H_{36}O_6N_4$, engloba varias bilirrubinas, pero que poseen distinta disposición molecular.

Cristalizada presenta un color rojo oscuro y en soluciones diluidas, un color amarillo oro. Insoluble en agua, poco en alcohol, es fácilmente soluble en cloroformo, benceno, sulfuro de carbono, glicerina y alcalis. Es muy sensible a los oxidantes. Se comporta como un ácido débil, bibásico; encontrándose en la bilis, probablemente al estado de bilirrubinato de sodio. En una serie de reacciones características: Con el ácido nítrico-nitroso se producen una serie de sustancias coloreadas (verde, azul, violeta, rojo amarillo) que son distintos grados de oxidación. Esta es la reacción de Gmelin, usada por Fischer como reacción de grupo con una mezcla de ácido sulfanílico y nítrico (dialo reactivo) se produce una sustancia de color rojo (azobilirrubina) de la que nos ocuparemos más adelante en detalle.

La fórmula según Fischer⁽⁵⁾ está constituida por cuatro grupos pirrólicos dispuestos en cadena



La bilirrubina se produce en el organismo a expensas de la hemoglobina, ésta es una proteína conjugada formada por una proteína básica del tipo de las histonas: globina y por el hem o grupo prostético, constituido por 4 núcleos pirrólicos. Los hemocromógenos son combinaciones del hem con una sustancia básica nitrogenada.



Si X es Fe bivalente se trata de Hem.

Si X es Fe - Cl se trata de Hemina.

Si X es Fe OH se trata de Hematina

Si X se trata de Protoporfirina.

Si en la protoporfirina se oxidan los grupos vinílicos: CH₂ CH dando una función alcohólica CH₂-CHOH - se obtiene la hematoporfirina. Si la protoporfirina se calienta con álcalis, se pierde CO₂ de los grupos propiónicos, y los vinílicos se reducen a etílicos, quedando lo que se denomina etio- porfirina, que se ha obtenido sintéticamente artificialmente.

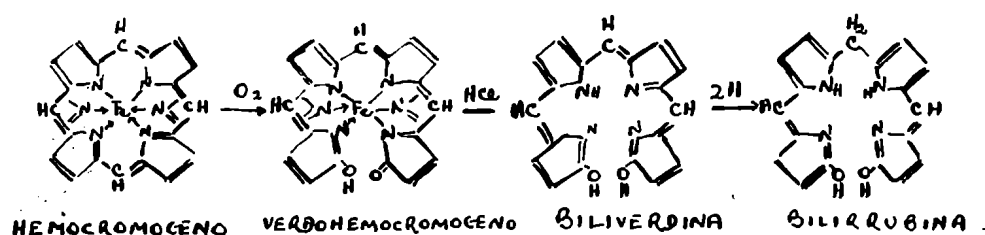
Se han obtenido cuatro etioporfirinas que se diferencian en la posición de las cadenas, metílicas o etílicas. La etioporfirina III es idéntica a la obtenida de la materia colorante de la sangre, por su espectro, por su forma cristalina y por sus propiedades químicas.

Las etapas intermedias en el metabolismo pigmentario que va desde la hemoglobina hasta la bilirrubina no están bien aclaradas.

Lemberg⁽³⁰⁾ elabora las etapas de transformación en la siguiente forma. Partiendo del hemocromógeno se produce una oxidación con rotura del anillo tetrapirrólico pero sin pérdida del átomo de hierro.

Esta sustancia la denomina verde-hemocromógeno, que, por acción del HCl pierde el hierro y es separada de la base quedando transformada en biliverdina. Una reducción ulterior en el hígado transforma la biliverdina en bilirrubina.

de
La teoría/Lemberg tiene un apoyo en experiencias realizadas "in vitro" pero no ha sido demostrada hasta ahora "in vivo". Es con todo una hipótesis de trabajo que puede llevar a la aclaración de numerosos problemas biológicos.



En el líquido duodenal las cantidades normales, según Royer⁽⁶⁾, Castex y López García⁽⁴⁾, Chiray y Lebon⁽⁷⁾, son las siguientes:

Bilis A = 0,07 - 0,10 g o/oo de bilirrubina

Bilis B = 0,20 - 0,40 g o/oo

Bilis C = 0,02 - 0,05 g o/oo

—

Numerosas son las técnicas que se han utilizado para determinar bilirrubina en bilis.

1º Métodos por diazotación.

2º " " oxidación.

Normalmente sólo hay bilirrubina; en los casos patológicos hay biliverdina. Por este motivo, los métodos más exactos, son los de oxidación, que la dosan como biliverdina.

Como oxidantes se han utilizado persulfatos, ácido nítrico, agua oxigenada.

Hemos ensayado al líquido duodenal el método propuesto por Castex, López García y Zelasco⁽⁸⁾ para el dosaje de la bilirrubina total en la sangre:

0,5 cc bilis + 1,5 jarabe simple + 0,5 cafeína benzoato de sodio 50 % + 1 cm³ de diazo.

Tubo contraste: 0,5 cm³ bilis + 1,5 jarabe + 0,5 cafeína benzoato + 0,5 diazo I. Se hace la lectura a los 15 minutos con filtro S 55. A = 101 mg o/oo.

Cálculo: E x 101 = mg. bilirr. por 1000 cc. Los resultados los hemos comparado con un método de oxidación propuesto por los mismos autores: (Cuadro 1)

2 cm³ bilis + 8 alcohol acético. Se agrega enseguida 0.06 NO₂H puro mezclar. Añadir enseguida 0.04 cc. NO₂ Na 0.5%. Filtrar bajo vidrio de reloj. Leer al fotometro a la media hora con filtro 461. Con bilirrubina pura d'Hoffmann la Roche en un espesor de cuba de 1 cm. se encuentra para A el valor de 252 mg o/oo.

Cálculo: E x 252 = mg bilirrubina o/oo.

Cuadro N° 1

DIAZOTANDO mg. ‰	OXIDANDO mg. ‰
105	89,60
85	81,90
39	43,50
240	140
Utilizando bilis de color verde	
1700	2227
250	371
95	112,64
105	233
75	90

Comparación de un método de oxidación, con uno de diazo-
tación.

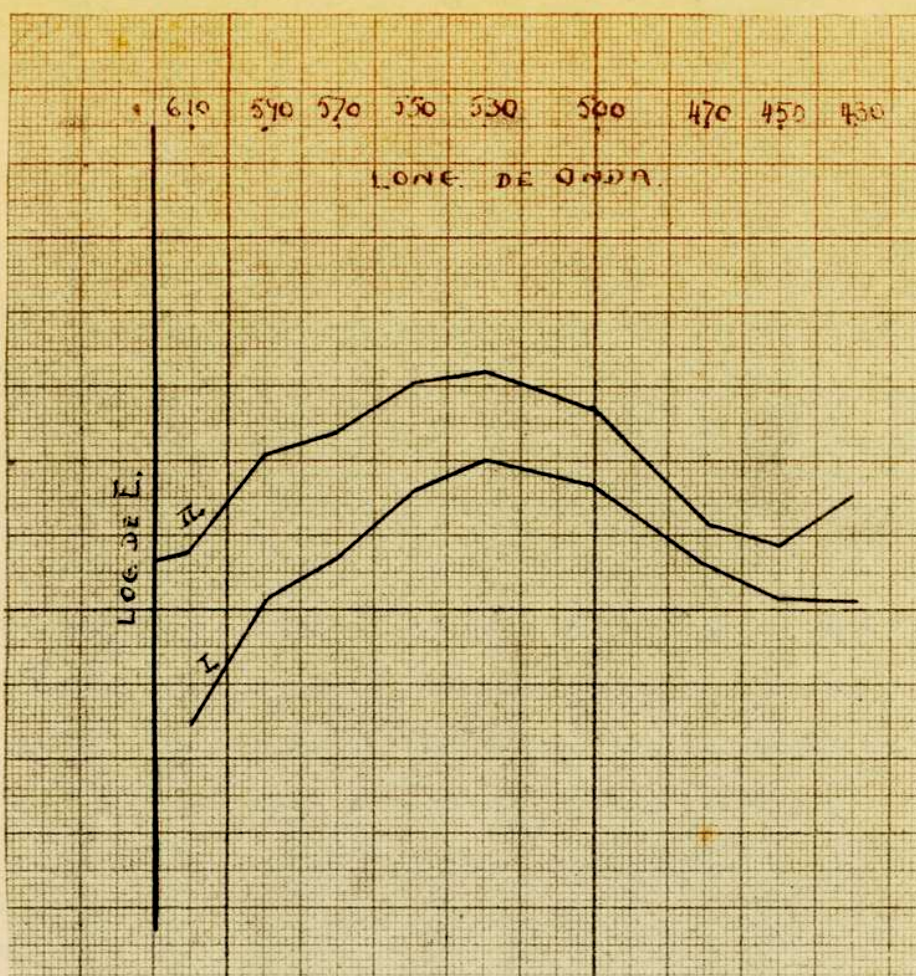


GRAFICO N° 1

Curva I:- Obtenida diazoando bilirrubina en solución alcalina (OHNa 0.15 ‰)

Curva II:- Obtenida diazoando una bilis. Las diferencias se anotan en el filtro S 50 debido a la presencia de urobilina, y en el S 47 y 45 a la presencia del mesobilirrubinógeno diazoado.

El método de diazotación da más debido a productos agregados; (cuadro N°1); cuando la bilis es verde da menos. La diazo reacción de Ehrlich Prüsscher es una reacción específica para la bilirrubina en medio ácido. En medio alcalino reaccionan también otros productos (los fencoles que dan un color amarillo rojizo). En medio ácido reacciona el mesobilirrubinógeno dando un color amarillo dorado (reacción amarilla de Varela Fuentes estudiada por López García)⁽⁹⁾.

Como en la bilis hay mesobilirrubinógeno, la presencia de éste falsea el dosaje colorimétrico dando colores incomparables cuando la cantidad es importante. Habitualmente puede despreciarse su influencia pues se encuentra en cantidades de 100 a 30 veces menores que la bilirrubina (Castex y López García)⁽¹⁰⁾; Royer⁽⁶⁾.

Esta perturbación es todavía menor si se utilizan fotómetros espectrales o fotocolorímetros provistos de filtros que dejen pasar solamente la zona del espectro absorbida por la bilirrubina 550 - 530 mμ.

El impedimento principal del método de diazotación, sobreviene cuando existe biliverdina en cantidad apreciable. Su ventaja reside en que puede emplearse un colorímetro común, contra testigo de cobalto; sobre todo usando un filtro verde de fotografía.

El método de oxidación tiene pérdidas de un 20 a 25 % debido seguramente a que el oxidante destruye el pigmento; como se demuestra comparando con el método de Evelyn y Malloy.

Hemos comparado así, estos métodos con el procedimiento primitivo de Meulengracht⁽¹¹⁾, que compara el color amarillo del líquido duodenal con una solución diluida de bicromato de potasio (0.05 g $\text{Cr}_2\text{O}_7\text{K}_2$ en 500 cc. de H_2O)

Cuadro N°2

	Diazotando mg ^o /oo	Oxidando mg ^o /oo	Colorimétrico mg ^o /oo
1	420	512.	150
2	85	69,1	46
3	290	230	100
4	440	614	250
5	160.	153,6	85
6	60	76,8	45
7	300	409	210
8	1160	936	500
9	2520	2355	870
10	370	335,6	170
11	2600	2460	910
12	145	256	80
13	3240	2800	970
14	1500	1300	570

Comparación de los métodos de oxidación y diazotación con el procedimiento colorimétrico de Meulengracht.

Este método colorimétrico es malo (cuadro 2) sirviendo simplemente como un método de orientación. El enturbiamiento falsea y hace imposible la comparación. Lo mismo puede decirse de la presencia de biliverdina. Es fundamental el pH del medio,

pues las soluciones de bilirrubina cambian de color según el pH del mismo. Van del amarillo al rojizo según sea ácido o alcalino, y el líquido duodenal tiene un pH muy variable, según los casos y según se haya mezclado con jugo gástrico.

Se probó el método de Jendrassik y Grof⁽¹²⁾:

1 cm³ de líquido + 2 cm³ de cafeína + 0,5 cc. de solución de diazoico y después de 10 minutos 1.5 cm³ de solución alcalina de Fehling. Se lee con filtro S 61. contra agua.

Cálculo

$$E \times 5,32 = \text{mg } \%$$

Cuadro N°3

LIQUIDO DUODENAL	DIAZOTANDO	METODO DE JENDRASSIK y GROF	OXIDANDO
Bilirrubina mg %			
1	880	404	750.
2	260	164	209
3	168	123	120
4	188	140	161
5	160	109	117
6	840	270	750
7	648	231	645
8	790	600	780

Comparación de los métodos de oxidación y diazotación con el método de Jendrassik y Grof.

No hay concordancia entre los resultados obtenidos con el método de Jendrassik y Grof y los restantes; como se puede observar en el Cuadro N°3. El método de Jendrassik y Grof ha sido criticado por Sanguinetti⁽¹³⁾, quien aconseja trabajar con

tenores de bilirrubina bajas, entre 5 y 15 mg. ‰. Otra causa de error sería la turbidez, que se produce. Aconseja finalmente usar en lugar de la solución alcalina de Fehling, una solución de $\text{OHNa}^{\text{N}}/1$. La ventaja del método de Grof, consiste en que como hace la determinación en medio alcalino, la azorrubina da color verde, que en los fotómetros se lee en los 600 u u, muy lejos de la zona de influencia de los colores originados por sustancias parásitas.

Se probó también el método de Malloy y Evelyn⁽¹⁴⁾ y se comparó con el de diazotación.

Método de Malloy y Evelyn:

1º tubo: 0,40 material + 3,60 cc H_2O + 5 cc. alcohol metílico + 1 cc. diazo fuerte.

2º tubo (contraste): 0,40 material + 3,60 cc. H_2O + 5 cc. alcohol metílico + 1 cc. HCl 15‰. Se lee con Filtro S 55 y 53.

S 55

A = 27

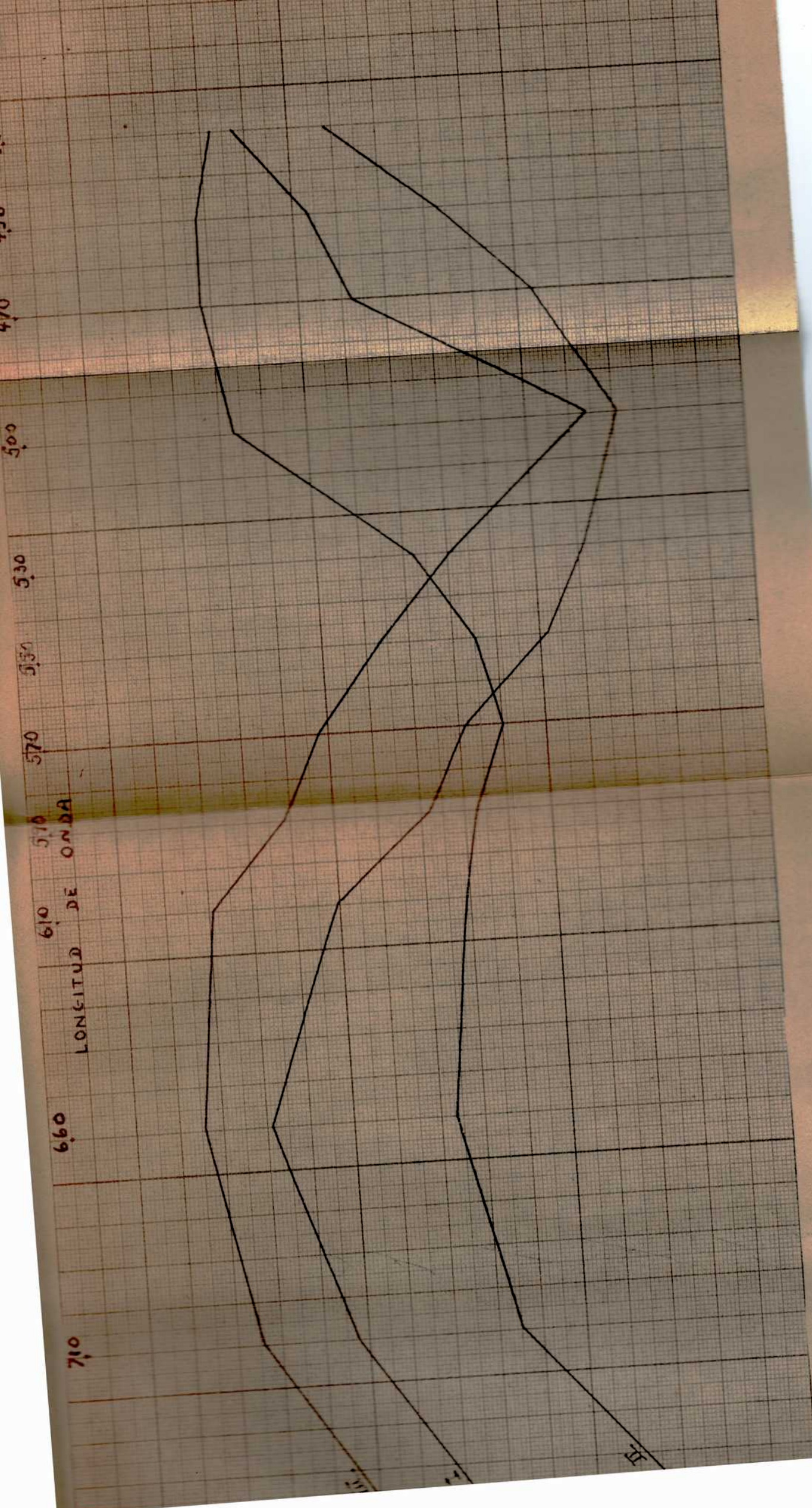
E x 27 = mg ‰.

Cuadro N°4

LUCIDO DUODENAL	DIAZOTACION	MALLOY y EVELYN
	mg ‰ de bilirrubina	
1	460	410
2	1100	1075
3	460	450
4	780	777
5	500	496
6	100	87
7	220	200
8	60	67,5
9	720	621
10	2140	1700
11	6800	6156

Comparación del método de diazotación de Castex López García con el de Malloy y Evelyn.

En general dan igual resultado (Cuadro N°4) las diferencias que se producen deben ser por enturbiamiento del tubo contraste, producido por el alcohol metílico.



G R A F I C O N° 2

I - Curva típica de Bilirrubina Roche oxidada con 0.06 cc. NO_3H
0.04 cc. de NO_3Na .

II y III - Curvas correspondientes a dos bilis, tratadas en la
forma anterior.

Las curvas son paralelas desde los 750 hasta los 660 y luego
se diferencian por los productos agregados a la bils. En la cola,
la urobilina, en los 550-570, puede dar color también la porfi-
rina.

Se probó otro método de Malloy y Evelyn⁽¹⁵⁾ que se basa en la oxidación; utilizando el agua oxigenada como oxidante la que reacciona rápidamente, produciendo el máximo de color en un tiempo mínimo, hecho importante, sobre todo en la bilis, pues cuando se utiliza el reactivo nítrico, se requiere a veces más de diez horas;

Técnica.

1º) Reactivo oxidante 0.4 cc H_2O_2 30 % y 2 cc. HCl concentrado en 100 cc alcohol etílico 94 %.

2º) Alcohol etílico 94 %

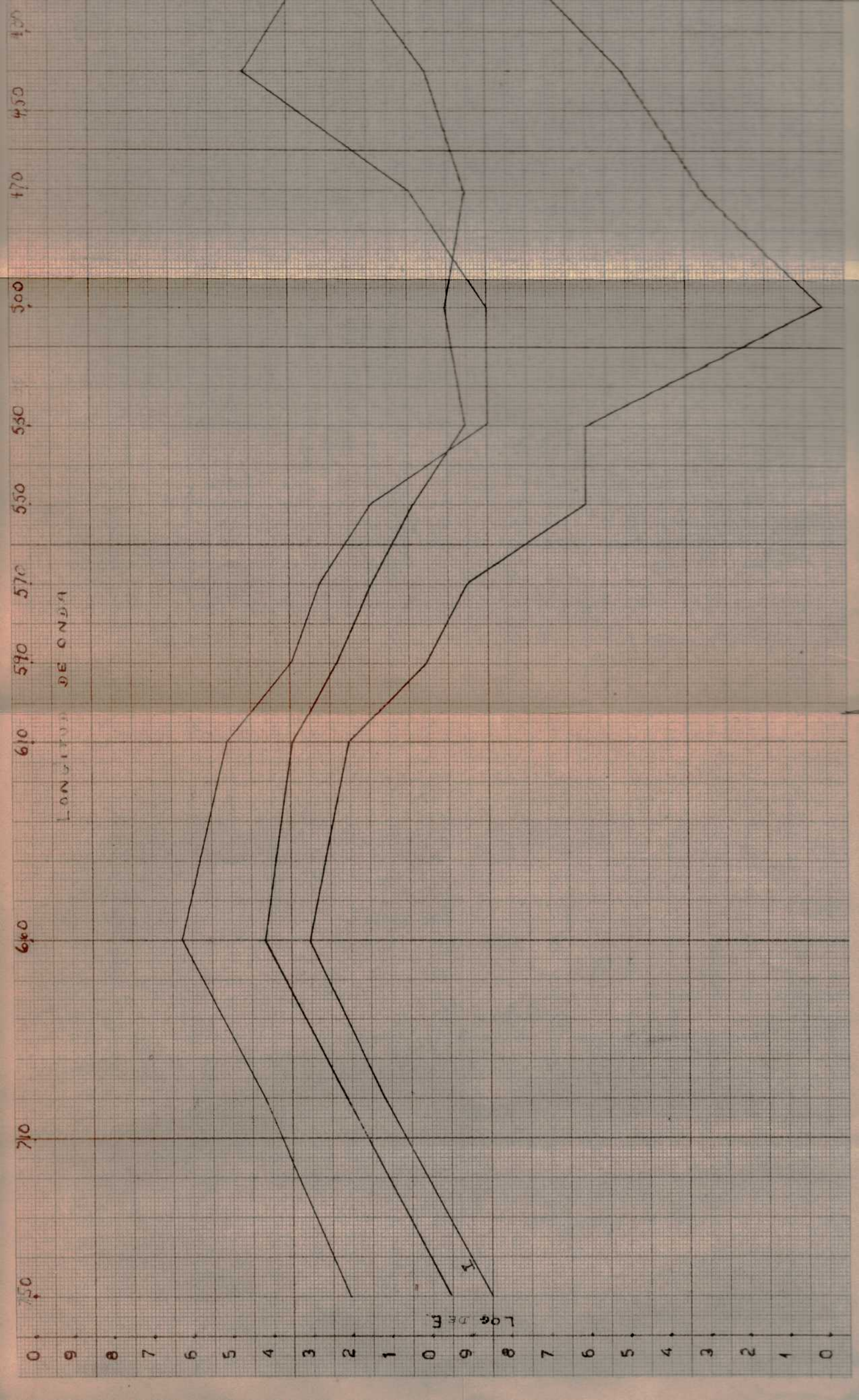
9.5 cc. alcohol etílico + 10 cc. reactivo oxidante son agregados a 0.5 cc. de bilis, después de una hora se filtra en un tubo del fotocolorímetro y se lee con filtro S 66 contra un tubo con alcohol.

$$\frac{2-\log G}{78} \times \frac{20}{0.5} \times S$$

78 = constante de calibración.

G = lectura

S = volumen de bilis en 24 horas.



G R A F I C O N° 3

I - Curva testigo de bilirrubina utilizando como oxidante el agua oxigenada.

Las dos curvas restantes pertenecen a dos billas tratadas de la misma manera.

Las curvas son paralelas hasta el Filtro S 61, luego difieren por los productos agregados.

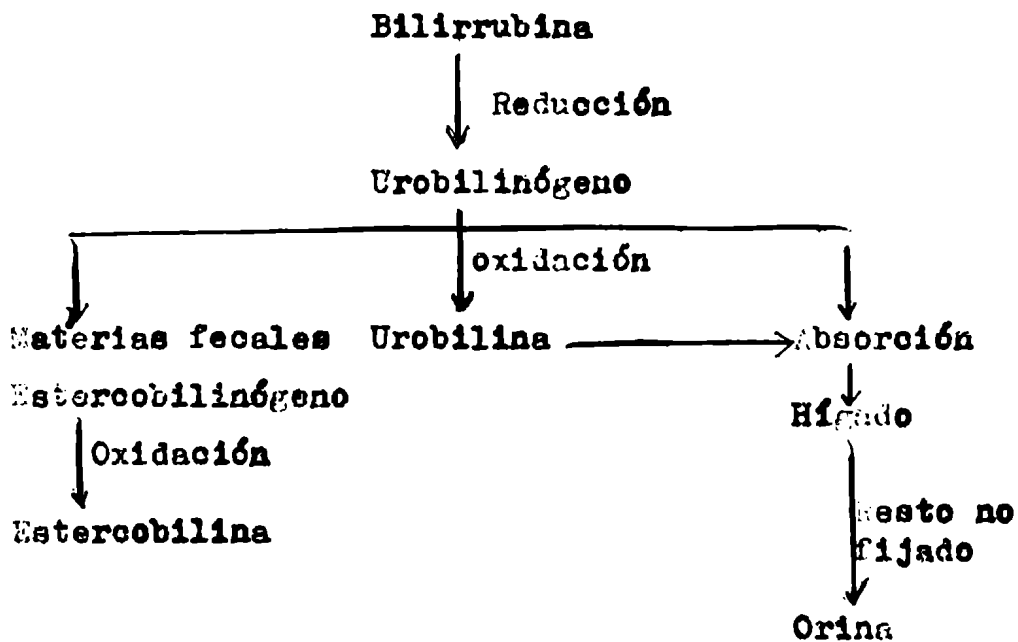
Hemos buscado el valor de A para el fotómetro de Pulfrich, trabajando con bilirrubina Hoffmann la Roche en solución clorofórmica al 100 mg. ⁰/100. La constante hallada es la misma que la encontrada por aquellos autores para el Fotocolorímetro.

Resumen del trabajo personal efectuado

- 1°- Hemos comparado el método de diazotación propuesto por Castex - López García y Zelasco, para el dosaje de la bilirrubina total en la sangre, aplicado a la bilis con un método de oxidación propuesto por los mismos autores.
 - 2°- También fueron comparados los dos métodos anteriormente citados, con el procedimiento primitivo de Meulengracht para sueros sanguíneos; aplicándolo al líquido duodenal.
 - 3°- Se controlaron los resultados del método de Jendrassik y Grof, comparándolo con los obtenidos con los métodos anteriores.
 - 4°- Se probaron los métodos de Malloy y Evelyn - de diazotación y oxidación comparándolos con los métodos anteriormente citados.
 - 5°- Aconsejamos dosar la bilirrubina, con un método de oxidación, como biliverdina. Recomendamos el método de oxidación de Malloy y Evelyn, que al usar agua oxigenada, no produce pérdidas, por destrucción del pigmento.
-

3ª UROBILINA

El urobilinógeno, formado en el intestino a expensas de la bilirrubina, se oxida fácilmente dando urobilina. Esta transformación puede ocurrir en las partes finales del intestino y en la vejiga urinaria.

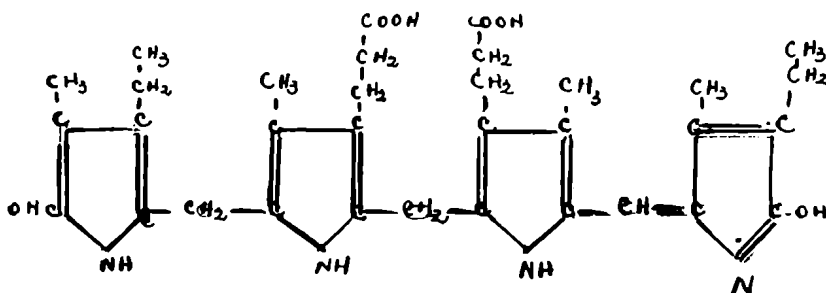


(De la Química Biológica de Deulofeu Marenzi).

Si la urobilina está ya formada en la parte del intestino que es capaz de absorber pasa en parte a la sangre; una porción es fijada por el hígado y otra, eliminada por vía renal.

La estercobilina y la urobilina son sustancias muy semejantes.

La urobilina responde a la fórmula bruta $C_{33}H_{42}N_4O_6$; la fórmula constitucional según Fischer es la siguiente:



Es una sustancia sólida de color pardo, amorfa, poco soluble en agua; soluble en alcohol y cloroformo. Sus disoluciones son rojizas o amarillas; casi incoloras cuando son ácidas.

Son reacciones características: la fluorescencia con cloruro de zinc en medio amoniacal, el espectro de absorción bastante característico y la reacción roja de Ehrlich con el para-dimetil-amino-benzaldehido en medio ácido.

La existencia de la urobilina en la bilis fué negada por algunos autores, debido a las técnicas deficientes que se empleaban; sin embargo hoy día con el perfeccionamiento de las mismas se la encuentra siempre en la bilis normal Royer⁽⁶⁾, Castex y López García⁽⁴⁾. Las técnicas para dosar urobilina están basadas en dos principios:

1º- Determinación del urobilinógeno y urobilina al estado de urobilina, determinando la fluorescencia que producen en presencia de sales de zinc.

2º- Determinación del urobilinógeno y urobilina al estado de urobilinógeno por la reacción de Ehrlich.

Las siguientes técnicas están comprendidas en el primer caso:

I) 4 cm³ bilis + 4 cloruro férrico 20 % (que oxidan el urobilinógeno) + 8 de amoníaco 10 %. Filtrar. En un tubo tomar 1 cm³ y agregar 9 cm³ de buffer (acetato de sodio 70 g; acetato de zinc 25 g; ácido clorhídrico 5 cc.; alcohol 60° hasta 1000cc).

Royer aconseja, después de filtrar la bilis oxidada con el percloruro, neutralizar con HCl, En realidad comprobamos que no vale la pena neutralizarla pues las diferencias obtenidas son

muy pequeñas (cuadro 5). Se hacen las lecturas al fotómetro-nefelómetro de Fulfrich, sucesivamente con luz roja y luz blanca; permitiendo así determinar la luminosidad producida por la turbidez y calcular la que corresponde a la fluorescencia. Para cada fotómetro es necesario, hacer una tabla, utilizando una solución de tripaflavina, que relacione la concentración con los por cientos de luz emitida, como describen Castex y López García (17).

Ejemplo de como se efectúa un cálculo:

Filtro Rojo (turbidez)	= 3,6
Filtro verde (luz total)	= <u>21,-</u>
Diferencia	= 17,4

En la tabla, construída para el fotómetro de Fulfrich, con el que se ha trabajado.

$$17,4 - 3,82$$

$$3,82 \times 2 = 7,64 \text{ mg } \% \text{ de urobilina}$$

Cuadro N° 5

SIN NEUTRALIZAR	NEUTRALIZANDO
mg % de urobilina	
3.70	3.33
0.33	0.44
4.10	5.05
1.57	1.64
7.64	7.70

Método propuesto por Castex y López García (únicamente utilizable con el nefelómetro-fluorescómetro de Zeiss).

2 cc bilis + 2H₂O + 4 gotas de Yodo + 4 cc. alcohol 96°.

Filtrar, diluir con buffer 1 a 10.

Este método reemplaza el cloruro férrico, por el yodo, oxidante éste que actúa sobre el pigmento sin destruir la urobilina, por lo que se obtienen resultados más altos. También parece que los resultados más altos encontrados son debidos, a la absorción parcial que en el método anterior sufriría el pigmento por el precipitado férrico - (cuadro 6).

Al utilizar este método es necesario leer la fluorescencia a través de filtros verdes, pues quedan restos de bilirrubina, de color amarillo o verde, que hacen imposible la comparación directa con el dispositivo de Royer.

Cuadro N° 6

LIQUIDO DUODENAL	USANDO CLORURO FERICO		USANDO IODO
	SIN NEUTRALIZAR	NEUTRALIZANDO	
mg % de urobilina			
1	0.088	0.132	0.186
2	8.40	8.96	10.52
3	7.	7.14	7.66
4	2.30	3.	3.24
5	1.84	2.06	2.54
6	0.98	0.98	1.36

Comparación de los resultados obtenidos utilizando como oxidantes: cloruro férrico (sin neutralizar, y neutralizando la solución final), y yodo.

La reacción de Schlessinger puede ser falseada por flavinas,

eosina, quinina.

Determinación de urobilinógeno y urobilina al estado de urobilinógeno

En el año 1925, Terwen⁽¹⁸⁾ describe un método basado en la reducción de la urobilina al estado de urobilinógeno, por medio de la Sal de Mohr y su determinación por la reacción de Ehrlich.

Método de Terwen: 80 cm³ líquido + 20 de sal de Mohr 16 % recientemente preparada, agregar luego lentamente y agitando 20 cm³ hidróxido de sodio 12 %. Se coloca durante 24 horas en un frasco oscuro, cerrado, sin burbuja de aire. Se filtra en frasco oscuro: 20 cm³ del filtrado + 5 cc Acido acético 20 %; agregar 40 cc. de éter. Separar el éter, lavarlo con 3 cc. de agua, cuatro veces.

Se hace la reacción de Ehrlich en este líquido con para - dimetilaminobenzaldehído, agregando ácido clorhídrico y una solución de acetato de sodio. Se compara con un testigo de fenoltaleína en medio alcalino.

Terwen demostró que el precipitado de hierro no arrastra urobilina, que el éter extrae la totalidad del urobilinógeno; y que el lavado del éter, con agua, no arrastra esta sustancia. Royer probó sin embargo que el método de Terwen destruye una parte del pigmento que se va a dosar, equivalente a 2/3 partes del total; debido a la labilidad de la urobilina.

En el año 1931 Watson^{(19), (20)} reemplaza la Sal de Mohr por sulfato ferroso y el hidróxido de sodio al 12 % por uno de concentración de 10 %. La reducción se efectúa en una hora:

50 cm³ de líquido se coloca en un erlenmeyer y se agrega 25 cm³ de sulfato ferroso 20 % y agitando 25 cm³ de hidróxido de sodio 10 %. Después de una hora una porción del filtrado se trata cualitativamente con reactivo de Ehrlich (0.7 g de p. dimetilaminobenzaldehído, 150 cm³ de ácido clorhídrico concentrado y 100 cm³ de agua): 2 a 3 cm³ del filtrado son acidificados con la misma cantidad de reactivo de Ehrlich. Se agrega 3 a 4 cm³ de una solución saturada de acetato de sodio, y se nota la intensidad de color desarrollado. Si el color es muy intenso se usa 1 cm³ o aún menos; si es rojo pálido 3 a 5 cm³; si es pálido 10 a 30. Si no hay: 50 cm³.

La cantidad a utilizar se coloca en un embudo separador; después de diluir a 20 cm³ con agua (si se han usado menos de 20 cm³); luego cubrir con 20-30 cm³ de éter de petróleo puro y fuertemente acidificado con ácido acético glacial. Es preferible como lo hemos comprobado usar éter sulfúrico, pues se separa mucho más fácilmente. Agitar durante unos minutos.

Se extrae luego dos veces más con éter de petróleo. La solución combinada es lavada dos veces con agua destilada. El urobilinógeno se extrae agitando con 1 a 2 cm³ de reactivo de Ehrlich. Se agrega doble volumen de una solución acuosa saturada de acetato de sodio; con la que se desarrolla la reacción coloreada. Agitar y extraer.

El éter se vuelve a agitar con otra pequeña cantidad de Ehrlich, seguido de adición de otra pequeña cantidad de acetato de sodio. En caso que desarrolle color bien perceptible, este procedimiento debe ser repetido hasta que la extracción de urobilinógeno sea completa. Si en las extracciones se formara emulsión, conviene separar con unas de alcohol 95°. Se lee con el filtro 57 y 55. F57, A = 1,13 ; F 55 A = 0,89

Ejemplo de un cálculo, con el método de Watson.

Se utilizaron 50 cc. de bilis; 50 de defecado; 2 cc. de Ehrlich y 4 cc. de acetato de Sodio.

$$F57 \quad E = 1.90 \quad A = 1,13.$$

$$F55 \quad E = 2.40 \quad A = 0,89$$

$$2.40 \times 0,89 = 2.10$$

$$50 \text{ } \%. 6 = 8.33$$

$$2,10 \text{ } \%. 8,33 = 0,25$$

$$0,25 \times 2 \times 10 = 5 \text{ mg. } \%$$

Cuadro N°7

LIQUIDO DUODENAL	METODO DE WATSON	USANDO CLOURO FERRICO
mg. de urobilina ‰		
1	5.80	6.10
2	3.20	2.30
3	4	3.60
4	4.70	5.60
5	6.20	6.06
6	3,8	3.24

Comparación de un método que determina el urobilinógeno y urobilina al estado de urobilinógeno (método de Watson); con otro que los determina al estado de urobilina.

Se han hecho una serie de críticas de todos los métodos que utilizan la reacción de Ehrlich. Hay una serie de sustancias que interfieren en la reacción: dan color rojo la tripaflavina, el indol, la acriflavina, la hematina reducida, el tolueno, benzidina, fenilhidracina, fenil-metil-pirrazolona. Dan color anaranjado: el indicán, la urea, el triptófano, la acetona, morfina, alcanfor, novocaína, neosalvarsan, antiperina, glicocols, asparagina, alanina, ácido sulfanílico. El escatol y el ácido glicocólico dan color azul. Las proteínas y derivados proteicos dan color que varía del rojizo al naranja violeta. La presencia de albúmina y mucus, dificulta la extracción del pigmento ocasionando pérdidas considerables. En las pruebas de recuperación, con el método de Watson se han obtenido pérdidas de hasta un 30 % debido a las extracciones. Siendo además un método largo y engorroso se han descripto otros, más sencillos, que suprimen la extracción etérea. Pero debido a que de este modo, intervienen una serie de compuestos que dan la reacción de Ehrlich, estos métodos dan resultados muy abultados.

Se aconseja adoptar el método basado en la fluorescencia pues:

- 1°- Las sustancias que interfieren en el método de fluorescencia, son muchas menos que la que interfieren en la reacción de Ehrlich.
- 2°- La urobilina según Watson, se transforma especialmente en

mesobiliviolina y copronigrina, que no son fluorescentes, por lo tanto producirían un error en menos. Castex y López García⁽²¹⁾. Comparando los 2 métodos comprobamos que el de Watson da valores más altos, "sospechándose que exista un producto parásito, que aumente los resultados". Cuando las urobilinas son elevadas la diferencia de los valores obtenidos, por los dos métodos, es muy pequeña, indicando así que la formación de mesobiliviolina y copronigrina es reducida. Conviene por lo tanto velar los dos pigmentos al estado de urobilina.

Resumen del trabajo personal efectuado

- 1º) Hemos comparado métodos que dosan el urobilinógeno y urobilina, al estado de urobilinógeno. (Método de Watson) con otros que los dosan al estado de urobilina (Castex y López García; Royer).
- 2º) Comprobamos la inutilidad de la neutralización con ácido clorhídrico, que aconseja Royer, después de filtrar la biliar oxidada con percloruro; ya que los resultados obtenidos son casi iguales.
- 3º) Entre los métodos que dosan el urobilinógeno y urobilina al estado de urobilina, comparamos el método de Royer, adaptado al fotómetro con el de Castex y López García; recomendamos este último, puesto que el oxidante utilizado no destruye la urobilina; con la ventaja que no se producen fenómenos de adsorción como en el método primero.
- 4º) Aconsejamos, finalmente dosar los pigmentos al estado de urobilina y no de urobilinógeno.

4°- ACIDOS BILIARES

En la bilis humana, y en la de los animales se encuentran ciertos ácidos, llamados ácidos biliares, cuya estructura está relacionada, íntimamente con la ^{de la} coles-terina. Normalmente se encuentra de 6 a 8 g.°/cc de líquido duodenal.

Bilis A = 3 a 4 g ac.colal °/cc

B = 8 a 11

C = 1.5 a 2.5

según Chiray y Marcotte (22).

Cuny divide a los ácidos biliares en 5 series.

I) Serie colálica comprende el ácido colálico (trioxicolánico) y sus derivados más importantes que son el ácido glicocólico (el ácido colálico unido a la glicocola) y el tauro cólico (es el ácido colálico unido a la taurina).

II) Serie desoxicólica. El ácido desoxicólico es el dioxicolánico, se halla en la bilis humana bajo la forma de ácido colelnico. Pertenece a esta serie el ácido hloglicocólico, en la bilis del cerdo; el ácido antropodesoxicólico, en la bilis humana; y el ácido tauroquenocólico en la bilis del pato.

III) Serie litocólica. Comprende el ácido litocólico, o monooxicolánico, que existe en la bilis humana.

IV) Serie fococólica comprende los ácidos y fococólicos, hallados en la bilis de focas y morsas.

V) Serie de los éteres del Skymmol. Parecen tener un parentesco con los ácidos biliares; han sido hallados en la bilis de algunos plagiostomias.

Se han practicado diversos métodos para caracterizar los ácidos biliares. Basándose que disminuyen la tensión superficial de los líquidos en los que se hallan disueltos, hay una serie de reacciones. Por ej. la que utiliza flor de azufre, que cae al fondo del recipiente cuando se espolvorea un líquido que contiene ácidos biliares (Reacción de Hay). También se han usado métodos estalagmométricos.

Las reacciones químicas, que se han utilizado para caracterizarlos son muy numerosas y generalmente modificaciones de la Pettenkofer, que utiliza $2/3$ partes del volumen inicial de ácido sulfúrico, vigilando que la temperatura no pase de 50° ; luego se añade II o III gotas de azúcar de caña 20 %. Se desarrolla un color rojo violáceo. Hay, sin embargo, muchas sustancias que son capaces de enmascarar la reacción. Se pueden citar la albúmina mucina, pigmentos biliares colesteroína lecitina, aminoácidos, ácidos grasos, etc. Las albúminas, mucinas y pigmentos biliares pueden ser separadas de la bilis en forma completa. Las dos primeras coagulando con alcohol 95° ; los pigmentos defecando con sales de plomo.

Se ha modificado la reacción de Pettenkofer reemplazando el ácido sulfúrico por otros ácidos (ácido clorhídrico, fosfórico) y el azúcar de caña o furfurool por otras sustancias (vainillina).

Técnica de Cuny (23). 2 cc bilis + 0.5 cc solución acuosa de acetato de plomo 20 % + 7.5 alcohol 95° mezclar y filtrar. a 1 cm³ filtrado + 0,5 cc furfurool 1 % + 3.5 ácido fosfórico $\delta = 1.71$. Se hacen una serie de testigos: I) 0,20 g % de ácido colálico en alcohol 80° . II) 0,10 g %. III) 0,05 g %. IV) 0,025 etc. Se tratan igual que el filtrado. Se lleva a B.M.

hirviendo durante 5 minutos. Se enfría y completa a 10 con ácido acético glacial. Comparar el colorímetro con el testigo que se asemeje más.

$$I) \frac{I}{D} \times 10 = \text{ácido colélico por litro.}$$

$$II) \frac{I}{D} \times 5 =$$

$$III) \frac{I}{D} \times 2,5$$

$$IV) \frac{I}{D} \times 1,25$$

La técnica de Cuny fué una de las primeras en dar resultados prácticos; tiene sin embargo el inconveniente del costo.

Por eso Etcheverry (24) trató de aprovechar la reacción de Ville y Derrien, que resulta en un método más económico y más fácil.

Método de Etcheverry.

3 cm³ bilis + $\frac{1}{2}$ acetato de plomo 20 % + 7,50 de alcohol etílico 95°. Agitar. Filtrar. A 1 cm³ de la solución alcohólica, agregar 1 cm³ de vainillina 2 % + 8 de ácido sulfúrico 50% + 2 ó 3 gotas de acetato de plomo. Calentar a B.M. hirviendo durante 8 minutos. Enfriar, centrifugar. Se lee con cuba de medio y con filtro S 57.

Se ensayó el método de Etcheverry en la forma aconsejada por su autor, utilizando el colorímetro y 5 testigos de ácido colélico de distintas concentraciones. Los resultados son en general satisfactorios aunque en ocasiones los tintes resultan poco comparables.

Intentamos después una adaptación a lecturas fotométricas, obteniéndose con distintos testigos la siguiente curva.

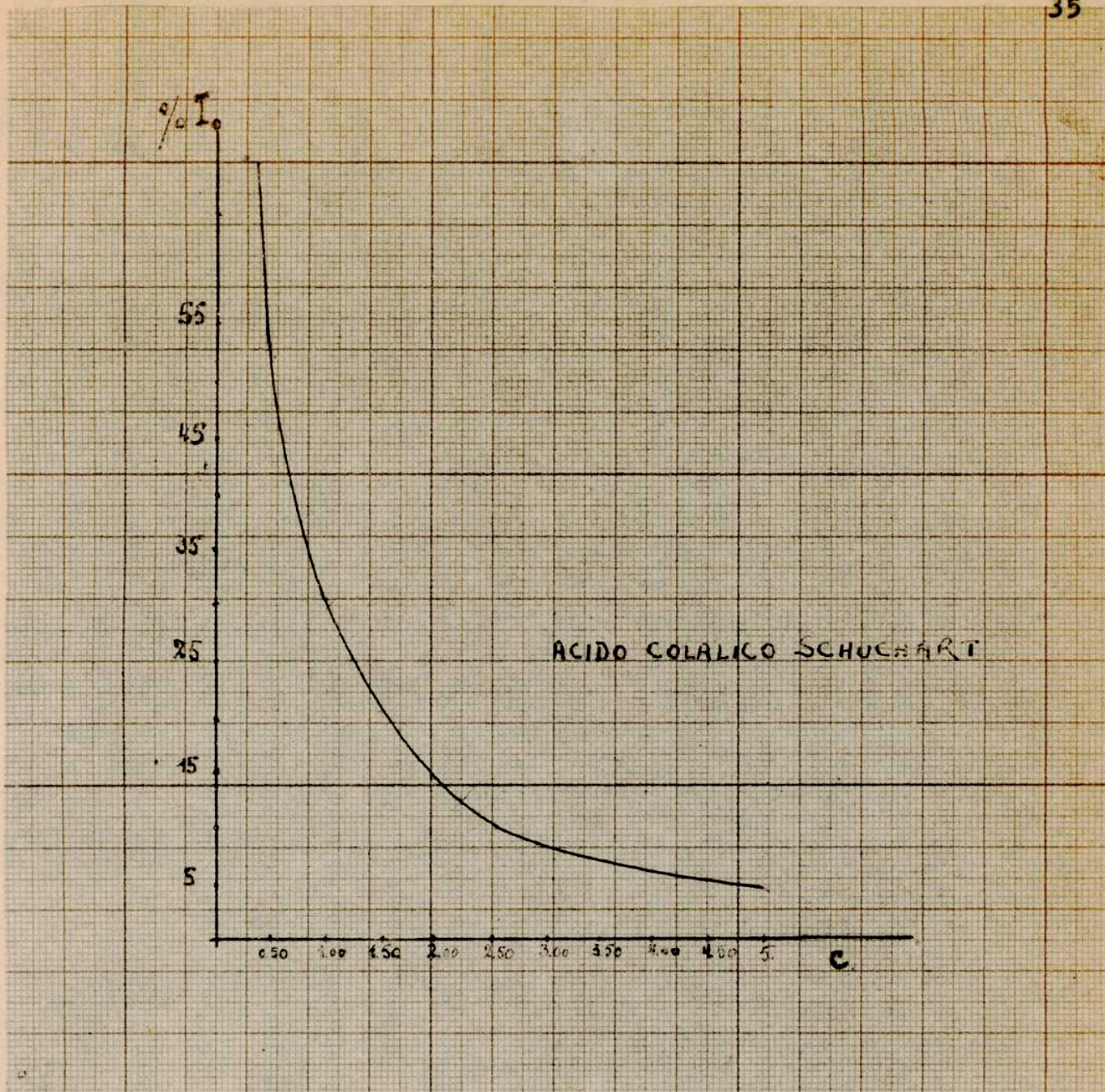


GRAFICO N° 4

Tabla para sales biliares; tomando 2 cc. de bilis a 10 cc. en alcohol incluyendo 0.50 cc. de acetato de plomo 20 %, da el resultado final.

Cuba de 5 mm. Filtro S 57.

Para cantidades mayores, diluir; para menores evaporar y concentrar.

En las ordenadas se representan el % de luz transmitida y en las abscisas la concentración que correspondería a una bilis tratada en la forma original, propuesta por Etocheverry. Puede notarse que no se cumple la ley de Lambert - Beer; o sea que las extinciones, no son proporcionales a las concentraciones cuando se compara contra agua.

Según resulta de la comparación entre las extinciones y concentraciones:

con.	Ext.	
0,250 ‰	- 0,188	} Dif. 0.12
0,500	- 0,300	
0,750	- 0,428	
1,000	- 0,545	
1.250	- 0,665	

Pero resultan proporcionales si se descuenta un valor de 0,065 a cada extinción. Este valor es la absorción correspondiente a el color desarrollado por la reacción vainillina-ácido sulfúrico.

Con toda la ley se cumple hasta llegar a concentraciones de 0,300 g de ácido colálico por 1000; equivalentes a 1.500 g. de colálico en bilis. En adelante la curva es empírica y poco exacta.

Por este motivo conviene diluir las bilis hasta obtener lectura que correspondan a los límites en que la ley se cumple.

$$\text{Cálculo } A = 2,06.$$

$$E = 0,065 \times 2,06 = g \text{ ‰}$$

Se probaron dos clases de vainillina; notándose que para una misma concentración, resultados diferentes.(cuadro 8).

Cuadro 8

VAINILLINA RIEDEL	V.DEL PAIS
1.071	1,097
0,921	0,854
0,783	0,699

Aconsejándose, que al cambiar de Vainillina hay que hacer una nueva curva.

Pudo notarse también que la extinción aumenta, al aumentar la concentración de vainillina (cuadro 9) pero resultando, la más conveniente la de 2 % aconsejada por Etcheverry.

Cuadro 9

VAINILLINA 2 %	VAINILLINA 4 %	VAINILLINA 8%
1.046	1,260	1,369
0,886	0,939	0,961
0,733	0,796	0,865
0,569	0,678	0,708

El aumento en la concentración de ácido sulfúrico, aumenta igualmente la coloración, pero sin ventajas, pues en esas extinciones donde la ley se cumple en forma menos exacta. La concentración óptima es de 50 %.

Con ácido sulfúrico al 25 % no se obtiene casi coloración.

Cuadro 10

SO_4H_2 75 %	SO_4H_2 50 %
Extinción	Extinciones
más de 3,000	1.699
2.651	0,796
1.921	0,688
1.319	0,569

También se probó el tiempo de calentamiento, dando diferencias apreciables:

Cuadro 11

		Extinción E	
		Lectura inmediata	Lectura a las 24 horas
Calentando	2 m	: 0,268	0.658
x°	4 m	: 0.444	0.699
	6 m	: 0.585	0.678
	8 m	: 0,658	0.796
	10 m	: 0,67	0.854
	12 m	= 0,699	0.921
<hr/>			
Otro caso			
Calentando	4 m	= 0.456	0.699
	6	= 0.585	0.745
	8	= 0.620	0.721
	10	= 0.638	0.770
	12	= 0.658	0.796

Como se observa, con el tiempo se intensifica el color, de tal modo que conviene leer en seguida.

Así por ejemplo el cálculo de la conc. daría:

A los 8 minutos = $(620 - 65) \times 2.06 = 1.14 \text{ g } \text{‰}$.

A los 12 minutos = $(650 - 65) \times 2.06 = 1.26$

ó sea un 10 % en MAS por cuatro minutos MAS de calentamiento.

Por estos motivos, CONVIENE adoptar un tiempo de calentamiento, ocho minutos como aconseja Etcheverry, CONVIENE diluir las bilis y leer en seguida.

Resumen del trabajo personal efectuado

- 1º) Probamos la técnica de Cury que da buenos resultados pero tiene el inconveniente de ser costosa.
- 2º) Ensayamos el método de Etcheverry en la forma aconsejada por su autor, utilizando el colorímetro, con resultados generalmente satisfactorios, si bien los tintes obtenidos a veces resultan, poco comperables.
- 3º) Intentamos una adaptación de este método al fotímetro de Pulfuch.
- 4º) Con el fin de "Standardizar" la recolección y estudiar las condiciones de variabilidad de la intensidad de color, comparamos distintas marcas y concentraciones de vainillinas; hicimos variar asimismo la concentración del ácido sulfúrico, y probamos diferentes tiempos de calentamiento.
- 5º) De lo expresado llegamos a la conclusión que conviene adoptar un tiempo de calentamiento determinado, diluir la bilis y leer en seguida. Hay que tener presente que cada marca de vainillina, que se utilice, requiere el trazado de una nueva curva-testigo.

5° - COLESTEROL

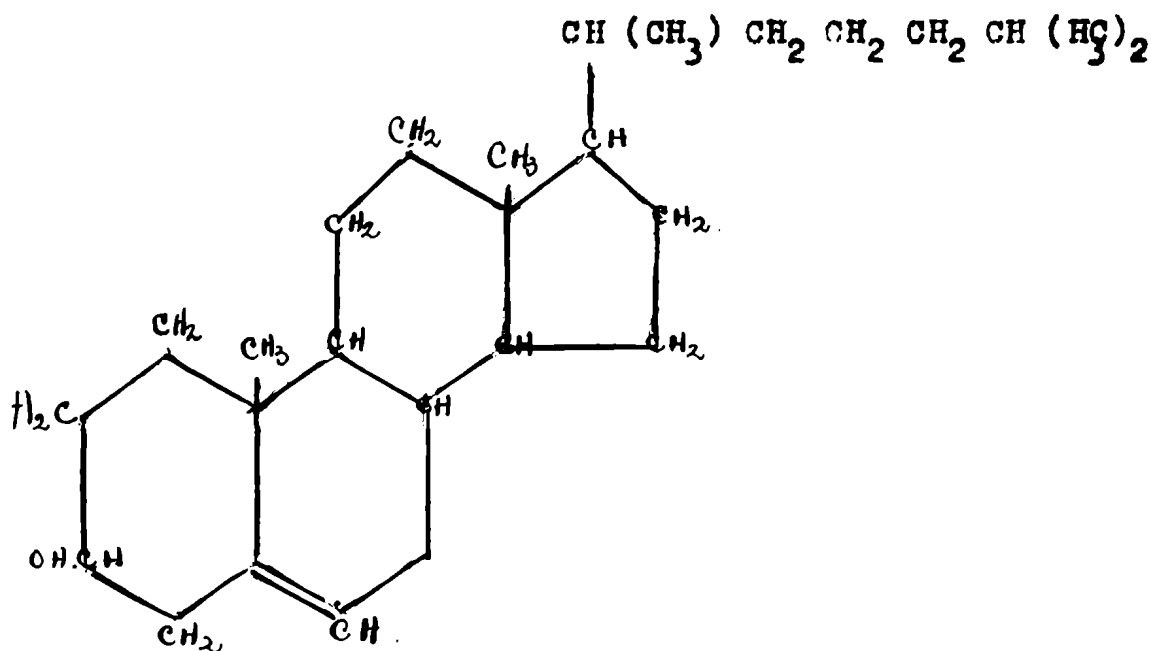
Las esterinas, que comprenden las zoosterinas que se encuentran en el organismo animal, y la fitosterinas, en los vegetales, tienen una estructura muy complicada. Sus moléculas contienen 4 anillos de carbono hidrogenados, de los cuales varios son anillos de ciclohexano.

La colessterina, es la esterina mejor estudiada, la cual en parte formando ésteres, se encuentra en casi todos los órganos, y abunda especialmente en el encéfalo, y en el tejido nervioso. Los cálculos biliares, la contienen en mucha cantidad.

un alcohol monovalente, bien cristalizado, ópticamente activo.

Sobre su estructura han trabajado mucho, Windaus y Wieland.

La fórmula de constitución es la siguiente:



La colessterina tiene 8 átomos de carbono, asimétricos: de modo que existen varios isómeros: la isocolessterina, alcohololes-

terina, metacolesterina, pseudocolesterina.

Los métodos para dosificar el colesterol en la bilis, tropezaban con el inconveniente de que las extracciones cloroformicas o etéreas, arrastraban bilirrubina, que luego daba un tinte parásito que molestaba y hasta impedía la comparación colorimétrica. Por este motivo Deulofeu y Bavio utilizan el yeso, que absorbe la bilirrubina y no el colesterol.

Con los fotómetros y fotocolorímetros este inconveniente no existe. La dificultad reside en estabilizar el color, lo que parece conseguirse agregando además del anhídrido, ácido acético (método de Schonheimer). Se probó el método colorimétrico de Deulofeu y Espinel Bavio, que es el que recomendamos.

Reactivos:

- 1º) Solución concentrada madre de colesterol: 0,16 g en 100 cc de cloroformo puro.
- 2º) Soluciones testigos: a) Se diluyen 5 cc. de solución N° 1 madre hasta 100 cc. de cloroformo; B) Se diluyen 10 cc. a 100 cm³ de cloroformo.
- 3º) Solución de hidróxido de sodio al 30 %.
- 4º) Cloroformo, éter sulfúrico, ácido sulfúrico y anhídrido acético y yeso de París.

A unos 5 cc. de yeso de París, colocados en un vaso de unos 20 cc. se añaden 2 cc. de líquido de sondaje duodenal y se mezclan bien. Se añade 0.3 cc. de OHNa 30 % y se mezcla nuevamente. Se coloca el vaso en una estufa a 105 - 110° y se seca durante una hora. Se seca bien, y se pulveriza; se pasa el polvo a un extractor de los empleados comunmente, realizando la extracción con éter sulfúrico durante 90 minutos.

Se evapora luego el éter a baja temperatura, el residuo se disuelve en cloroformo, llevando en una probeta a 5 cc. Se añade 1 cc. de anhídrido acético y 0.2 de ácido sulfúrico concentrado. Agitar y realizar la lectura colorimétrica a los 15 minutos.

Los testigos se preparan tomando 5 cc. de cada solución tipo y procediendo en la misma forma.

Para el testigo 1 el cálculo es:

$$\frac{I}{D} \times 0,0004 \times \frac{d}{5} \times 1000 = g \text{ ‰ de colesterol}$$

donde, T = testigo

D = desconocido.

d = dilución clorofórmica del desconocido para 1 cc.
de líquido duodenal.

Para el testigo 2 substituir 0,0004 por 0,0008.

Resumen:

Hemos aplicado el método de Deulofeu y Espinel Bavio, que es el que recomendamos por los buenos resultados obtenidos.

APENDICE

Albumina y Mucina. Análisis cualitativo

1 volumen de bilis + 2 volumen alcohol acético 20 %. Precipita: Conviene centrifugar a alta velocidad, para que el líquido sobrenadante quede límpido; en este líquido es donde se encuentra la albúmina.

Se trata con ácido tricloroacético y se observa si hay enturbiamiento.

El precipitado que contiene la mucina se disuelve en hidróxido de sodio, o en agua. Y se puede efectuar algunas de las siguientes reacciones para reconocer a dicha proteína:

a) Probar su solubilidad en los disolventes ordinarios. b) Reacción de Millon, c) Disolver una pequeña cantidad en OHNa y hacer la prueba del biuret, d) hervir con 10 a 25 cc de agua a la que se agrega 5 cc. de HCL diluido hasta que la solución se vuelva marrón. Enfriar, alcalinizar con OHK sólido y probar con reactivo de Benedict. La mucina es considerada como una glucoproteína y el grupo carbohidrato en la molécula, que es separado de la porción proteica con el ácido es reconocido por la reducción de Benedict.

Normalmente la bilis no contiene albúmina, ni mucina.

Se probaron bilis normales y patológicas, encontrándose albúmina en bilis de fístula.

Sensibilidad del método para la albúmina.

								(Resultado
2 cc bilis	+	4 cc.alcohol acético	+	0.5 suero	1 ‰	(++	
" " "	+	" " "	"	0.2 "	1 ‰	(++	
" " "	+	" " "	"	0.1 "	1 ‰	(++	
" " "	+	" " "	"	0.5 "	1‰	(++	
" " "	+	" " "	"	0.5 "	1‰ ₀₀	(+	

Sensibilidad para la mucina.

1 cc.bilis + 0.5 cc solución de saliva + 3 cc alcohol acético.

				Resultado
Solución	1 ‰	saliva	(++
"	1 ‰ ₀	"	(+
"	1 ‰ ₀₀		(negativo

Resumen:

Utilizamos el método de Rane para investigar cualitativamente la albúmina y mucina, en el líquido duodenal investigando sus límites de sensibilidad.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

- 1°) Se hace una descripción del sondaje duodenal.
- 2°) En lo que respecta a la determinación de la Bilirrubina. Hemos comparado el método de diazotación propuesto por Castex Lopez Barcia y Zelasco, aplicándolo a la bilis con un método de oxidación; y con uno colorimétrico. (Meulengracht).
- 3°) Controlamos los resultados del método de Jendrassik y Grof, comparándolo con los anteriores.
- 4°) Probamos los métodos de Malloy y Evelyn -de diazotación y oxidación- y los comparamos.
- 5°) Aconsejamos dosar la bilirrubina en bilis, para un método de oxidación, -al estado de biliverdina.-

Recomendamos el método de oxidación de Malloy y Evelyn, que usa agua oxigenada, oxidante que no destruye el pigmento.
- 6°) En lo que respecta a la determinación de urobilina comparamos métodos que dosan los pigmentos al estado de urobilinógeno (Watson), con otros que lo dosan al estado de urobilina (Royer; Castex y Lopez Garcia).
- 7°) Recomendamos el método de Castex y Lopez Garcia, (solamente utilizable con el nefelómetro - *fénoreoscómetro* de Zeiss); puesto que se evitan las pérdidas por adsorción, y la destrucción de la urobilina.
- 8°) Aconsejamos, dosar los pigmentos al estado de urobilina.
- 9°) Probamos la técnica de Cuny, para la determinación de ácidos biliares, que da buenos resultados pero es costosa.
- 10°) Ensayamos el método de Etcheverry utilizando el colorímetro, y lo adaptamos al *fo*ldímetro de Pulfrich.

11°) Hicimos variar los componentes de la reacción, y llegamos a la conclusión de que conviene adoptar un tiempo de calentamiento determinado, diluir las bilis, y leer en seguida. Cuando se cambia de marca de vainillina hay que confeccionar una nueva curva-testigo.

12°) Probamos el método de Deulofeu, y Bivio para el dosaje del colesterol, aplicado a la colorimetría; que es el que recomendamos, por los resultados obtenidos.

13°) Investigamos cualitativamente la presencia de albúmina y mucina, y determinamos su límite de sensibilidad.

María Lorena Bronckau

BIBLIOGRAFIA

- (1) FERNANDEZ ITHURRAT E.M. y TOBIAS J.W.- Contribución al estudio del líquido duodenal "La Semana Médica" N° 24, 1924.
- (2) MELTZER, LYON V. - Citado por Marcel Brulé, "Pathologie du Foie et du Pancréas". Masson Editeurs 1931. París.
- (3) BENGOLSA A. y VELAZCO SUAREZ C.- "Sondeo duodenal". El Ateneo Editor. Buenos Aires. 1942.
- (4) CASTEX M.R. y LOPEZ GARCIA A.- "Fisiopatología del hígado y vías biliares". Fascículo I "Las Ciencias".- Editor. Buenos Aires, 1936.
- (5) FISCHER H. y ADLER.- "Synthese der Bilirrubin und Xanthobilirrubinester und ihrer Isomeren" Z. Physiol. Chem. 197, 237-280, 1931.
- (6) ROYER M.- "La urobilina en el estado normal y patológico".
- (7) CHIRAY y LEBON.- Le tubage duodenal. Año 1924.
- (8) CASTEX M.R., LOPEZ GARCIA A. y VELAZCO J.F.- "Estudio de la bilirrubinemia total, directa e indirecta por medio de un método de dosaje espectrofotométrico". Anales del Instituto de Investigaciones Físicas, aplicadas a la Patología Humana. 1940, 1, 109.
- (9) LOPEZ GARCIA A.- Bilirrubinemia urobilinemia y diazo-reacción amarilla de Varela Fuentes. Revista Medicina 1941, 1, N° 3. Buenos Aires.

- (10) CASTEX M.R. y LOPEZ GARCIA A.- "La bilis B." Archivos Argentinos del aparato digestivo y de la nutrición.
- (11) MEULENGRACHT.- Citado por Raices A.E. en "Los Pigmentos Biliares en la Sangre y en la Orina".
- (12) VENDRASSIK L. y GROF P.- Biochem Z. 1938, 297, 81.
- (13) SANGUINETTI A.- Determinación de la bilirrubinemia con el fotómetro Leifo. Rev.Soc.Arg.Biol. 1942, Vol. XVIII, N° 6.
- (14) MALLOY H. y EVELYN K.A. - The determination of Bilirrubin with the Photoelectric Colorimeter. Biol. Chem 1937, 119.
- (15) MALLOY H. y EVELYN K.A.- "Oxidation Method for Bilirrubin Determination in Bile and meconium with the photoelectric colorimeter". Biol. Chem. 1938, 122.
- (16) RAICES A.E. - Los pigmentos biliares en la sangre y en la orina. Rev.Med.Quir. Pat.Fem. 1936 - 8 - N° 1.
- (17) CASTEX M. y LOPEZ GARCIA A.- Estudio de una técnica para el dosaje de la urobilina por fluorescencia, utilizando el nefelómetro de Zeiss aplicado al fotómetro de Pulfrich. Anales del Instituto de Investigaciones Físicas, aplicadas a la Patología Humana.- Año I.- Vol. 1, pág. 17.
- (18) ROYER M.- El método de Terwon para el dosaje de urobilina. Rev. Asoc.Arg. Biol. 1934 N° 6-7.
- (19) WATSON C.- "An improved method for the Quantitative Estimation of urobilinógenos in Urine y Feces. Am. y Clin.Fath. 1936, 6, 458.

- (20) WATSON C.- "Studies of urobilinogen". Arch. Int.Med. 1937, 59, N° 2.
- (21) CASTEX M. y LOPEZ GARCIA A.- Estudio comparativo del dosaje del Urobilinógeno urinario por el método de Watson y Heilmayer y por fluorescencia. Anales del Inst.de Investigaciones Físicas aplicadas a la Patología Humana. Año 1. Vol.1, pág.37.
- (22) CFIRAY y MARCOTTE.- Dosaje colorimétrique des sels biliaires dans le liquide duodénal. Bull et mem. de la Soc.Med.des Hop.de Paris, 1929.
- (23) CUNY.- Le dosage des sels biliaires dans la bile et le liquide duodénal. Paris. Masson editours,1930.
- (24) ETCHEVERRY M.A. - Los Sólidos biliares. Algunas investigaciones clínicas y de laboratorio. Edición del Asilo de Huérfanos. 1931.
- (25) DEULOFEU V. y MARENZI A.- Química Biológica. 1940.
- (26) DEULOFEU y ESPINEL PAVIO.- Rev.Soc.Arg.Biol. 1932, 8,102.
- (27) TOBIAS W.- Exploración de la Secreción biliar por el método de Meltzer - Vincen - Lyon. Su estudio crítico 1924 N° 15.
- (28) TOBIAS W.- El líquido duodenal normal y patológico. Trabajo de adscripción a Clínica Médica, 1924. Inédito.
- (29) KOLNER J. AND BOERNER.- Approved Laboratory Technic. Appleton Century Company. New York 1938.
- (30) LEMBERG R.- "Animal Pigments. Ann.Rev. Biochem. 1938. 7, 421.

FOFNA

INDICE

	Pág.
PROLOGO	4
1° - TECNICA DE OBTENCION DEL LIQUIDO DUODENAL.	5
2° - BILIRRUBINA.	9
Técnica.	21
Resumen del trabajo personal efectuado	23
3° - UROBILINA.	24
Determinación de urobilinógeno y urobilina al es	
tado de urobilinógeno.	28
Método de Terwen.	28
Ejemplo de un cálculo, con el método de Watson .	29
Resumen del trabajo personal efectuado	31
4° - ACIDOS BILIARES.	32
Técnica de Cuny.	33
Método de Etcheverry	34
Resumen del trabajo personal efectuado	39
5° - COLESTEROL	40
Reactivos.	41
Resumen.	42
APENDICE.	43
Albúmina y Mucina. Análisis cualitativo	43
Sensibilidad para la mucina	44
Resumen	44
RESUMEN Y CONCLUSIONES.	45
BIBLIOGRAFIA.	47