

## Tesis de Posgrado

# Comparación de métodos para valoración del colesterol en líquidos biológicos

Guidobono, Héctor Ernesto

1955

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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Guidobono, Héctor Ernesto. (1955). Comparación de métodos para valoración del colesterol en líquidos biológicos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_0843\\_Guidobono.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0843_Guidobono.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Guidobono, Héctor Ernesto. "Comparación de métodos para valoración del colesterol en líquidos biológicos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1955. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_0843\\_Guidobono.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0843_Guidobono.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

MINISTERIO DE EDUCACION

UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Comparación de métodos para valoración del colesterol  
en líquidos biológicos

por

HECTOR ERNESTO GUIDOBONO

-----o-----

T E S I S

para optar al título

de

DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

(orientación Química Analítica)

1955

TE 13 843

MINISTERIO DE EDUCACION  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

----

COMPARACION DE METODOS PARA VALORACION  
DEL COLESTEROL EN LIQUIDOS BIOLOGICOS

por

Hector Ernesto Guidobono

----

T E S I S

para optar al título

de

Doctor en Ciencias Químicas  
(orientación Química Analítica)

---o---

R E S U M E N

Se ha efectuado el presente estudio con el objeto de seleccionar el método más adecuado de valoración del colesterol para cada uno de los líquidos biológicos examinados, procurando establecer las condiciones óptimas para la ejecución de dichas técnicas; como resultado del trabajo experimental efectuado se ha llegado a las siguientes conclusiones:

1) Se realizó un estudio comparativo de varias técnicas (especialmente las de Grigaut, Sackett y Braier-Chouela), para la determinación del colesterol en sangre, líquido de sondeo duodenal y líquido cefalorraquídeo.-

2) Las determinaciones realizadas mediante la técnica de Grigaut en suero y plasma humanos, acusaron resultados ligeramente inferiores a los obtenidos con las otras técnicas.-

3) Siguiendo la técnica descrita por Braier-Chouela, se obtuvieron valores más elevados que con las de Grigaut y Sackett, lo que indica posiblemente una mejor extracción.-

4) El método de Braier-Chouela presentó la ventaja de ser de ejecución rápida, y permitió obtener una coloración verde perfectamente comparable con las de las de las soluciones testigos, cuando se trabajó en suero, en plasma o en sangre entera.-

5) Empleando la técnica de Sackett se obtuvo con frecuencia una coloración verde, que cuando se observó a simple vista presentó una tonalidad denominada de "hoja seca" distinta a las obtenidas con las soluciones testigos.-

6) Trabajando con extractos acetónicos de sangre, se estudiaron los siguientes factores que pueden influenciar el desarrollo de la coloración de Liebermann-Burchard: a) Temperatura; b) Tiempo; c) Luz; d) Cantidad de los reactivos y forma de añadir los mismos; e) Estado del colesterol libre o combinado). Como resultados de estos ensayos se aconseja:

a) Realizar la extracción del colesterol siguiendo la técnica descrita por Braier-Chouela.-

b) Efectuar la reacción de Liebermann-Burchard a una temperatura lo más próxima posible a 22°C.-

c) Realizar la lectura de la reacción entre los 12' y los 14', pues es este el lapso óptimo para el desarrollo de la coloración.-

# FOENBA.

- d) Mantener los tubos en la oscuridad durante el desarrollo de la coloración en la reacción de Liebermann-Burchard.
- e) Los reactivos (20 ml. de anhídrido acético - 1 ml. de ácido sulfúrico) deben mezclarse antes de añadirlos a la solución clorofórmica de colesterol; la mezcla mencionada, conservada en la heladera, puede utilizarse hasta 60' después de haber sido efectuada.

7) No hemos podido reproducir los resultados de las experiencias realizadas por Reinhold en 1935, que le permitieron valorar el colesterol libre y el combinado trabajando a bajas temperaturas; hemos realizado las determinaciones entre 0°C y 2°C, como indica el autor citado anteriormente, no habiendo obtenido coloración verde aún después de 60' de iniciada la reacción.-

8) Además de los métodos indicados en el párrafo 1., se efectuó un estudio comparativo del método de Zlatkis, Zak y Boyle, habiendo obtenido los siguientes resultados:

- a) El método nos ha dado resultados más altos que los métodos de Grigaut, Sackett y Braier-Chouela.-
- b) Cuando en los sueros examinados el valor de la bilirrubinemia sobrepasó los 10 mgrs. por mil, se observó que se obtenían datos aún más elevados, lo cual aumentó la divergencia de los resultados obtenidos con este método y con los de Grigaut, Sackett y Braier-Chouela.-
- c) Cuando no se empleó ácido acético "pro-análisis", se produjo una turbiedad que impidió la comparación.-

9) Se efectuaron determinaciones en líquidos de sondeo duodenal. En Bilis A y Bilis C se efectuó una comparación entre las técnicas de Grigaut y de Braier-Chouela, obteniéndose resultados aceptables y semejantes con ambas técnicas.-

10) Con Bilis B se compararon las técnicas de Grigaut, Braier-Chouela, Deulofeu-Bavio y Bloor. Siguiendo las técnicas descritas por Grigaut y Braier-Chouela se obtuvieron coloraciones débiles o de tonalidades distintas a las de los testigos. Con las técnicas de Deulofeu-Bavio y de Bloor se obtuvieron buenas coloraciones y resultados comparables. El método de Bloor resultó más rápido y simple que el de Deulofeu-Bavio.-

11) Se efectuaron determinaciones en líquido cefalorraquídeo siguiendo las técnicas de Grigaut, Sackett y Braier-Chouela, habiendo encontrado en líquidos normales cifras comprendidas entre 0,0020 y 0,0045 grs. por mil.-

12) En líquidos cefalorraquídeos patológicos se encontraron en todos los casos cifras superiores a las encontradas en líquidos normales.-

13) Al comparar las diferencias técnicas en líquidos

# FOFNA

cefalorraquídeos, se observó que al igual a lo encontrado en sangre el método de Grigaut acusó resultados más bajos que con los otros métodos; los valores más altos se obtuvieron siguiendo la técnica de Braier-Chouela.-

---=0=---

*Guadalupe*

A mis padres.

Padrino de Tesis:

Dr. Ventura Morera

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

Me es grato, asimismo, dejar constancia de mi agradecimiento a la Dra. Rosa M. Ferro, Profesor Adjunto de Análisis Biológicos, quien me orientó en la aplicación de los métodos estadísticos.

# I N D I C E

## CAPITULO I

	<u>pág.</u>
Consideraciones generales. Introducción al estudio de la espectrofotometría .....	2

## CAPITULO II

Métodos de determinación del colesterol de la sangre y comparación de las técnicas de Grigaut, Sackett y Braier-Chouela .....	20
---	----

## CAPITULO III

Estudio de los factores que pueden influenciar el desarrollo de la reacción de Liebermann-Burchard.....	40
---	----

## CAPITULO IV

El colesterol en el líquido de sondeo duodenal .....	58
--	----

## CAPITULO V

El colesterol en el líquido cefalorraquídeo.....	64
--	----

---=O=---

C A P I T U L O - I -

Consideraciones generales

Introducción al estudio de la espectrofotometría

-----o-----

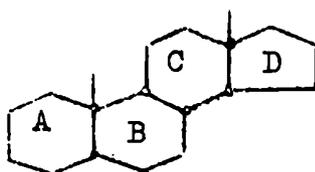
El colesterol fué conocido a mediados del siglo XVIII y extraído de los cálculos biliares, por primera vez, en 1762 por Poulletier de la Salle; recién en el siglo siguiente, en 1816, encontramos estudios sobre su naturaleza química, siendo realizados dichos estudios por Chevreuil (1) que determinó su punto de fusión y señaló que es de 137°C. Boudet, en 1833, indicó su presencia en la sangre y once años más tarde Becquerel y Racier dieron las primeras cifras sobre la cantidad del colesterol sanguíneo: 0,10 - 0,20 expresado en gramos 0/00. Flint (2), en 1862, utilizando el éter como disolvente del colesterol sobre la sangre desecada, encontró valores más elevados y a principios de este siglo Zulkowsky, Soxhlet y otros autores emplearon otros disolventes del colesterol e idearon aparatos de extracción mejores que permitieron obtener cifras mayores en la sangre de una persona normal. En 1903 Liebermann (5) presentó un trabajo en el que realizó el primer ensayo de saponificación de los lípidos que se encuentran en la sangre y en los tejidos, y cinco años más tarde otros dos autores Kumagawa y Suto perfeccionaron este procedimiento. Windaus (3), en 1910, realizó diversas experiencias comprobando la propiedad que tiene el colesterol de combinarse, en medio alcohólico, con la digitonina para dar un compuesto insoluble que permitía la diferenciación y separación de las dos formas en que se encuentra el colesterol en la sangre: libre y combinado.-

Posteriormente, Gerard llegó a demostrar que el colesterol es capaz de unirse con el aldehído benzoico en forma de un compuesto insoluble en alcohol; pero, concordadas estas experiencias y las de Windaus, se verificó que se obtenían resultados superiores con este método lo que indicaría que el aldehído benzoico no alcanzaría a precipitar todo el colesterol; llegamos así al año 1913 en el que Grigaut (4) presentó su tesis " Le Cycle de la Cholestérimie ", proporcionando un método exacto para determinar el colesterol en la sangre, que se basaba en la saponificación, extracción etérea y determinación del colesterol sobre un posterior extracto clorofórmico, aplicando para ello la reacción de Liebermann que era conocida desde 1885 y que había sido mejorada por Burchard.

### ESTRUCTURA DEL COLESTEROL

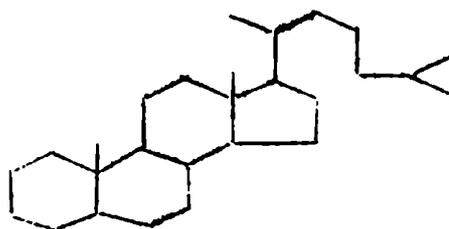
El colesterol es el mas difundido y estudiado de todos los esteroides conocidos; recordemos que los esteroides son alcoholes secundarios, naturales, del grupo de los esteroides y estos constituyen una parte muy importante de las sustancias naturales de estructura policíclica derivada del ciclopentanoperhidrofenantreno. Debemos, pues, establecer la estructura de este hidrocarburo para llegar a la del colesterol.-

El ciclopentanoperhidrofenantreno resulta de la condensación de un núcleo ciclopenteno con el fenantreno y es por hidrogenación total de él que obtenemos el ciclopentanoperhidrofenantreno. En los esteroides naturales, el ciclopentanoperhidrofenantreno posee siempre dos grupos metilos en los carbonos 10 y 13, que se denominan metilos angulares; la estructura general está representada de la siguiente manera:

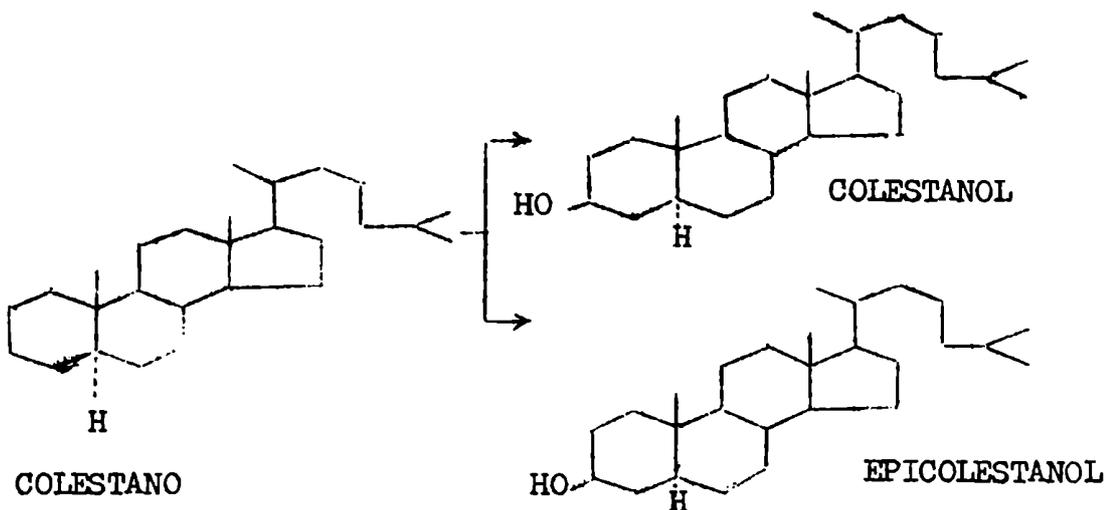


Este nuevo hidrocarburo, con los metilos angulares, tiene al igual que el ciclopentanoperhidrofenantreno seis carbonos asimétricos, que son aquellos comunes a dos ciclos y llevan los números: 5,10; 8,9; 13,14. De acuerdo al número de carbonos asimétricos podrían existir 64 isómeros del mismo, pero, salvo pocas excepciones, los esteroides naturales se diferencian tan sólo en la estereoisomería de los carbonos 5 y 10, que son comunes a los ciclos A y B. Dando una posición fija al metilo del carbono 10, el átomo de hidrógeno del carbono 5 puede tener las dos posiciones relativas siguientes: a) Estar del mismo lado del plano de la molécula que el grupo metilo, es decir en posición "cis"; b) Estar del otro lado del plano de la molécula en que está el grupo metilo, es decir en posición "trahs". El hidrocarburo que resulta en este caso se denomina androstano y de él derivan, entre otros, el colestano.

El hidrocarburo fundamental del que deriva el colesterol es el colesteno, que a su vez procede del colestano por formación de una doble ligadura entre los carbonos 5 y 6; posee, además, una cadena lateral en el carbono 17:

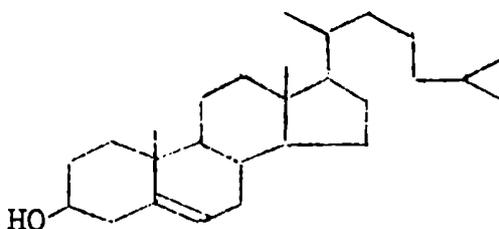


Por existir esa doble ligadura, el carbono 5 deja de ser asimétrico y no hay posibilidad de isomería en cuanto a la unión de los ciclos A y B. Muchos esteroides naturales poseen en el carbono 3 una función alcohólica secundaria; este carbono es entonces asimétrico y pueden presentarse dos casos: a) que el hidroxilo del carbono 3 esté del mismo lado del plano de la molécula que el metilo unido al carbono 10, o sea en posición "cis" con respecto al mismo; esta posición del hidroxilo con el metilo se designa con la letra griega  $\beta$  ( $3\beta\text{OH}$ ). En química orgánica es habitual designar a estos isómeros que se diferencian por invertirse la posición de un átomo o de un grupo de átomos, en el carbono asimétrico, como epímeros; en el caso de estos esteroides es el grupo hidroxilo el que se invierte:



y de estos dos últimos, derivan respectivamente: el colesterol y el epicolesterol ( $3\alpha$  colesterol). Esquemáticamente, podemos represen-

tar el colesterol de la siguiente forma, recordando que su fórmula química es  $C_{27}H_{45}OH$ :



### PROPIEDADES DEL COLESTEROL

Es una sustancia blanca, que cristaliza de alcohol caliente en placas rectangulares; es insoluble en agua, pero dá soluciones coloidales al estar disperso en ella. Según Bloor (Biochemistry of fatty acids, 1943) " el colesterol es insoluble en agua y funde aproximadamente a  $148^{\circ}C$ ; es levorotatorio, variando la rotación con el "solvente; por exposición a la luz y al aire experimenta cambios lentamente: su punto de fusión baja, su solubilidad cambia y las reacciones de coloración se hacen indefinidas; admite, también, que es escasamente soluble en alcohol frío, fácilmente soluble en alcohol caliente y en los disolventes generales de las grasas, siendo el tetracloruro de carbono su mejor disolvente, mejor aún que el cloroformo". Rapier y Leathes señalan que el punto de fusión es de  $148^{\circ}-150^{\circ}C$  y que no contiene agua de cristalización; del alcohol y algunas veces del éter se forman cristales con una molécula de agua de cristalización: consisten en placas rómbicas, teniendo frecuentemente un ángulo entrante; en ácido acético glacial es sólo debilmente soluble y cuando se le calienta se convierte parcialmente en acetato. Indicamos a continuación las solubilidades del colesterol en distintos solventes, expresadas en gramos por % y teniendo en cuenta la temperatura:

<u>Solvente</u>	<u>Temperatura</u>	<u>Solubilidad</u>
Etanol absoluto	$18^{\circ}C$	2,28
Etanol de $96^{\circ}$	0 "	0,68
Etanol de $96^{\circ}$	20 "	1,29
Etanol de $96^{\circ}$	60 "	7,85
Etanol de $96^{\circ}$	$78,5''$	27,70
Metanol	40 "	1,80

<u>Solvente</u>	<u>Temperatura</u>	<u>Solubilidad</u>
Metanol	64,1 °C	5,32
Cloroformo	20 "	15
Eter	20 "	26
Piridina	20 "	68,10
Agua	20 "	0,26

Señalaremos, también, los principales derivados del colesterol con sus correspondientes puntos de fusión: dibromuro, p.f.: 116°C acetato, p.f.:114°C; benzoato, p.f.:145,5°C; palmitato, p.f.: 78°C; oleato p.f.:44,5°C; dibromoacetato, p.f.:115°C.

#### REACCIONES DEL COLESTEROL

El colesterol produce reacciones características y comunes con otros esteroides; sus principales reacciones de coloración son las siguientes:

Reacción de Hager-Salkowski: a una solución de colesterol en cloroformo se le añade igual volumen de ácido sulfúrico concentrado, quedando los líquidos separados; en la zona de contacto aparece un anillo coloreado y agitando se observa que el cloroformo se tiñe de rojo intenso y el ácido sulfúrico toma una fluorescencia verde. Esta reacción la producen otros esteroides.-

Reacción de Rosenhein (11): El colesterol disuelto en cloroformo se calienta suavemente con un exceso de ácido tricloroacético al 90 %, apareciendo una coloración rojiza que pasa luego al azul. También la producen otros esteroides.-

Reacción de Schulze (15): El colesterol disuelto en cloroformo, adicionado de ácido nítrico y evaporado dá una mancha azul que ante el añadido de amoníaco vira al rojo.-

Reacción de Barden y Robinson: 0,10 grs. de colesterol disueltos en 5 ml. de éter de petróleo liviano dan con exceso de furfuraldehído una débil coloración púrpura que aparece lentamente; con 0,50 grs. dá inmediatamente un intenso color ante el añadido de ácido sulfúrico concentrado.-

Reacción con el Formol-Acido Sulfúrico: a 2 ml. de solución clorofórmica de colesterol se añade, en un tubo de ensayo seco, 2 ml. de solución de formol en ácido sulfúrico (1 parte de formol

al 40 % en 50 partes de ácido sulfúrico); se comprobará que el cloroformo toma color cereza; se vierte este en otro tubo y se le añaden 2 ó 3 gotas de anhídrido acético, produciéndose un color azul.-

Reacción de Walker y Antener (12): los autores describen la reacción con 1,2 y 4 gotas de una solución de furfural al 1 % en alcohol y añadiendo ácido sulfúrico; señalan, también, que es realizable con este último únicamente; indican lo siguiente: " a) "inmediatamente se obtiene un anillo violeta y luego encima de este "un anillo azul, cuando la cantidad de furfural es pequeña; cuando "es grande ambos anillos aparecen simultáneamente. Después de dejar-"lo 3/4 hora el cuadro de colores es el siguiente: b) Colesterol más "una gota de furfural y ácido sulfúrico concentrado, dá un anillo de "varias partes de diferentes colores en la siguiente serie de abajo "hacia arriba: anaranjado amarillo, marrón violáceo, violeta claro, "azul grisáceo; b') .colesterol más dos gotas de furfural y ácido sul-"fúrico concentrado, dá un anillo análogo al anterior con los colo-"res en la siguiente forma; violeta, anaranjado, negro, azul; b") "colesterol más cuatro gotas de furfural y ácido sulfúrico concentra-"do, dá un anillo análogo a los anteriores con los colores en el si-"guiente orden: violeta, marrón, negro, azul; c) colesterol más áci-"do sulfúrico concentrado, dà un anillo de tres colores: anaranjado "marrón, anaranjado claro, amarillo verdoso".-

Reacción de Scherrer (13): La reacción es descrita por su autor en forma análoga a la anterior, con la variante del uso del benzaldehído en lugar del furfural.-

Reacción de Nath (14): también en este caso el autor procede en la forma indicada en las dos reacciones anteriores, pero utiliza acetato de mercurio.-

Reacción de Schultz (15): el reactivo utilizado para poner de manifiesto el colesterol es: alumbre férrico al 2,5 % y partes iguales de ácido sulfúrico concentrado y ácido acético glacial; el colesterol y sus esteres dan un color azul-verde en pocos minutos que a los treinta minutos se decolora pasando al pardo.-

Reacción de Liebermann-Burchard: una solución de colesterol en cloroformo, ácido acético o anhídrido acético, y ácido sulfúrico concentrado permiten obtener una gama de colores transitorios,

pasando por el rojo púrpura y el azul hasta que el color se estabiliza en el verde azulado por un cierto tiempo y al cabo de unas horas desaparece para dar lugar a un color amarillo-marrón intenso. Sperry-Brand dicen que la reacción se produce mejor en solución de anhídrido acético y no en cloroformo como generalmente se hace.

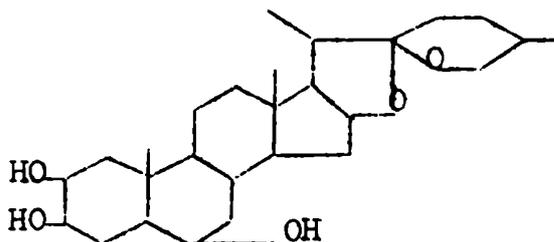
De las distintas reacciones que pueden realizarse con el colesterol, la única prácticamente empleada es la de Liebermann-Burchard. Respecto de ella dicen Marenzi, Cardini, Villalonga (20): "la naturaleza del pigmento no se conoce; el anhídrido acético puede formar compuestos coordinados o pueda reaccionar químicamente con compuestos no saturados; parece probable, además, que se originen por deshidratación compuestos no saturados durante la reacción. El no ser una reacción química definida y el hecho de que depende de una serie de factores son las causas de los inconvenientes más grandes que presenta".-

Anderson y Nabenhauer, en un trabajo publicado en 1924, admiten lo siguiente: " al estudiar la reacción de Liebermann-Burchard nos convencimos de que solamente los esteroides no saturados desempeñan algún papel en la formación del color que se produce; de hecho un compuesto se forma entre los esteroides no saturados y el ácido sulfúrico y cuando se añade el anhídrido acético dá un color azul intenso o verde. Este compuesto permanece disuelto cuando la concentración es tan baja como la que suele encontrarse en las sustancias donde esta prueba se aplica. Sin embargo cuando están presente grandes cantidades de esteroides no saturados, la cantidad total del compuesto coloreado puede ser separada de la solución cloroformica por la adición de unas pocas gotas de agua".-

Esta reacción es, pues, típica de los esteroides no saturados, pero no es específica del colesterol; el caroteno también la produce, pero la velocidad de obtención del máximo de color es mucho más rápida y en las condiciones corrientes el caroteno no interfiere en las determinaciones corrientes efectuadas en la sangre. Concluyamos diciendo que esta reacción, realizada en condiciones bien específicas, es cuantitativa y permite la valoración del colesterol libre y combinado y de allí que valore el colesterol total a diferencia de la digitonina que se une al libre. La reacción ha sido

sometida a varios estudios a fin de eliminar las posibles causas de error que presenta.-

Reacción con la Digitonina: el colesterol y otros estéridos presentan la propiedad de dar combinaciones moleculares con algunas saponinas y especialmente útil es la que producen con la digitonina. Esta sustancia es un raro, escaso y caro glucósido existente en las semillas de digital conjuntamente con otras saponinas; contiene un pentasacárido (4 moléculas de galactosa y 1 de xilosa) unido a un núcleo de sapogenina, y tiene la fórmula empírica  $C_{57} H_{92} O_{29}$  y un peso molecular de 1229, siendo su estructura la siguiente:



siendo altamente hidroxilada, es muy soluble en agua e insoluble en éter. El derivado que forma con el colesterol es monomolecular y se denomina digitónido; la reacción es sensible 1:10.000. La precipitación con digitonina es específica para los esteroides conteniendo grupo hidroxilo en el carbono 3 de la configuración (cis), utilizándose esta reacción para establecer la presencia del grupo 3 oxhidrilo y para separar los derivados epi(trans).

El complejo formado por la digitonina con el colesterol, es del tipo unión coordinativa y es un compuesto sólido, cristalino, insoluble en agua, en acetona y éter; es poco soluble en alcohol de 96°C, fácilmente soluble en alcohol absoluto caliente, en metanol, en ácido acético y especialmente en piridina; es estable frente a la mayor parte de los solventes, y el xilol durante varias horas de ebullición lo disocia extrayendo el colesterol. La formación del precipitado no responde a una ecuación química definida y la composición del mismo puede variar según las condiciones de la operación. Schoenheimer y Dam (1933) estudiaron las condiciones de formación de los digitónidos del colesterol, dehidrocolesterol y coprosterol, y las solubilidades de los mismos. Según el exceso que se emplea de la solución de digi-

tonina, la cantidad de precipitado obtenido es distinta, dependiendo también de la calidad de digitonina utilizada; con un 20 % de digitonina en exceso se tiene la composición teórica y a mayor exceso el precipitado es mayor. En la precipitación con digitonina, junto al colesterol se separan a veces fosfolípidos y otras sustancias que impurifican el digitónido, además de un exceso de digitonina; los primeros se eliminan con solventes como éter, acetona o alcohol y la digitonina por lavado con agua.-

Windaus (1910) fué el primero en aplicar la reacción para la valoración del colesterol libre y del esterificado en los tejidos. La solución alcohólica del colesterol se precipita con una solución alcohólica al 1% de digitonina; después de varias horas se filtra, se lava con alcohol y éter, se seca a 110°C y se pesa. En el filtrado los esteres se hidrolizan y se vuelven a precipitar. Esta técnica de Windaus dá un error de 2 - 3 % y es considerada una de las más exactas; ha sufrido varias modificaciones a fin de adaptarla a cantidades menores de tejidos o sangre y de subsanar algunos errores que provienen de la solubilidad del digitónido en alcohol; Schoenheimer y Sperry (1934) precipitan en medio alcohólico diluído. El tiempo de reacción puede acelerarse por evaporación de las soluciones a sequedad y lavando luego el residuo con agua, para eliminar el exceso de digitonina y con éter, acetona y alcohol para purificar el digitónido. Sturges y Knudson realizan la precipitación en medio ácido, demostrando que se realiza en mejores condiciones que en medio neutro.-

En el organismo existe un activo metabolismo del colesterol, y la cantidad de esta sustancia presente en el mismo es expresión de un equilibrio dinámico existente entre el colesterol absorbido y el sintetizado en el organismo por una parte, y el excretado y destruído por la otra. El colesterol tiene, pues, dos orígenes: uno, exógeno, por ingestión de alimentos, y otro, endógeno, por síntesis en los tejidos; se considera que, de acuerdo a las necesidades, el organismo puede sintetizar entre 3 y 5 grs. de colesterol por día. El colesterol existe, en los tejidos y en la sangre, en dos formas: libre y combinado; combinado en su mayor parte como ester con los ácidos grasos y en parte como lipoproteínas. En el animal en ayunas

los tejidos tienen colesterol libre y combinado en una proporción fija, pero hacen excepción a esta regla la bilis y los glóbulos rojos que no contienen esteres de colesterol; en el plasma ambas formas existen, representando los esteres del colesterol, en promedio, el 73% con variaciones normales que van del 70% al 76%. En los tejidos y en la sangre, casi todo el colesterol está combinado, juntamente con otros lípidos, a las proteínas formando lipoproteínas.-

La sangre contiene cantidades muy variables de colesterol aún durante el ayuno, la concentración puede variar dentro de límites muy amplios; comunmente se dan como cifras normales de 1,50 a 1,90 grs. 0/00, pero estos límites pueden extenderse hacia uno y otro lado sin que ello signifique alteraciones patológicas de su metabolismo; es así, que vemos que muchos autores dan como límites normales de 1,00 a 2,30 grs. 0/00.-

En los líquidos del organismo en colesterol se encuentra en pequeña proporción; en la orina, en el líquido cefalorraquídeo, en los líquidos de edema, la cantidad de colesterol hallada es practicamente insignificante; encontramos, en cambio, cantidades variables en los tres tipos de bilis; en los líquidos pleurales se encuentra cantidades que van de 0,50 a 2,00 grs. 0/00.-

El colesterol se encuentra repartido en todos los tejidos del organismo; al igual que en la sangre, puede existir en los estados libre y combinado; de todos los tejidos el más rico en colesterol es el tejido nervioso ya que se ha determinado que representa el 97% de los esteroides existentes en el cerebro humano, existiendo una pequeña cantidad de colesterol al estado combinado. Windaus dió las primeras cifras de colesterol en los riñones: 2,20 grs. por mil y halló en las glándulas suprarrenales de ovejas cifras que van de 1,40 a 5,30 grs. 0/00.-

#### ESTUDIO ESPECTROFOTOMETRICO

Cuando la energía luminosa atraviesa un medio cualquiera sufre modificaciones que son apreciadas ya sea por el ojo del observador a simple vista o con la ayuda de un dispositivo especial. Se considera a la luz una vibración transversal del éter, que tiene una

determinada longitud de onda la cual varía con los distintos colores de que se compone la luz blanca.-

El ojo humano capta cierta zona de esta serie de longitud de onda a la que llamamos energía luminosa; esa zona se extiende desde 750 Å a los 430 Å y las distintas longitudes de onda intercaladas corresponden a los distintos colores de que se compone la luz. Al atravesar un medio incoloro, la luz blanca perderá energía pero permanece blanca por la calidad de incoloro del medio atravesado; al aparecer color cuando la luz blanca atraviesa una sustancia, significa que ese medio es coloreado al contemplarlo entre la fuente luminosa y la retina, eso nos indica que la luz se ha modificado por la energía absorbida por la sustancia interpuesta; cuando contemplamos una solución y decimos que tiene color rojo se quiere significar que las radiaciones que pasan menos modificadas son las correspondientes a la zona roja del espectro. Si además de coloreado, el medio es turbio se produce además de una absorción, la reflexión de los rayos lumínicos por las partículas que están dispersas en el medio, lo que disminuirá la cantidad de luz transmitida. Pero este fenómeno no se produce tan simplemente, debido a que al perderse el paralelismo de los rayos luminosos como consecuencia de la difracción, estos rayos oblicuos provocan interferencias y nuevas reflexiones lo cual hace que la luz transmitida final no pueda servir estrictamente para la medición indirecta de lo absorbido como en el caso de ser perfectamente transparente.-

La fotometría, en el sentido en que se emplea el término en química analítica, consiste en la medida de la capacidad de transmitir la luz de una solución con el fin de averiguar el contenido de material absorbente de luz. Se da el nombre de transmitancia (T), de una solución, a su capacidad para transmitir la luz; hablando rigurosamente, la transmitancia se define como la relación entre la intensidad (I) de la luz que sale de la solución y la intensidad incidente ( $I_e$ ); sin embargo, es más práctico definir la transmitancia de una solución que contenga una concentración C de material absorbente de luz como la relación entre la intensidad de la luz que emerge de la solución ( $I_c$ ) y la intensidad de la luz que sale de una solución de referencia ( $I_p$ ), que es, por lo general, el disolvente incoloro, exa-

nándose ambas soluciones en condiciones equivalentes de longitud de onda, intensidad de luz incidente y espesor de solución. De esta manera no es necesario determinar la intensidad de la luz incidente, ni la pérdida de luz no específica; tampoco interfieren en el análisis los vestigios que contaminan la sustancia que se estudia o los reactivos naturalmente coloreados. El cambio provocado en la transmitancia por la presencia de la sustancia depende exclusivamente del incremento de absorción de luz por encima de un nivel que se toma arbitrariamente como cero.-

La transmitancia es, pues, una medida relativa y es siempre menor de 1,0, si hay algún material que absorba la luz; puede expresarse numericamente por una fracción decimal o bien en un porcentaje. Un modo mas satisfactorio de expresar la transmitancia de una solución es en función de su logaritmo, o sea de  $-\log. T$ , recibiendo este valor el nombre de Densidad Optica (O).-

Determinación de la transmitancia: se realiza usando un fotómetro; se han descripto muchos tipos de fotómetros y son numerosos los modelos que se encuentran en el mercado; sin embargo, cualquiera sea su construcción, el principio en que se basan es el mismo: se deja pasar la luz de una longitud de onda adecuada a través de una solución de referencia, por lo general el disolvente incoloro colocado en un recipiente de dimensiones fijas, al que se da el nombre de cubeta. La intensidad de luz que emerge de la solución de referencia se fija en un valor arbitrario por cualquiera de los métodos que se describirán mas adelante, correspondiendo por lo general a una lectura en la escala del fotómetro de O de densidad óptica o de 100 por 100 de transmitancia; la solución testigo se reemplaza por la solución problema, colocando a esta en la misma cubeta y se mide la intensidad de la luz emergente en relación a la establecida para la solución que se examina.-

La intensidad de la luz que emerge de una solución puede establecerse por medios visuales, fotográficos o fotoeléctricos; de todos estos métodos, el mas comunmente usado es el último. Con los aparatos fotosensibles se utiliza la variación de intensidad en la corriente producida como medida de la variación de la intensidad de

la luz; si se ajusta la corriente producida a un valor arbitrario con la solución de referencia en el sitio correspondiente del fotómetro, sucede que la transmitancia de una solución desconocida es igual a la relación entre la corriente producida con esta solución y la de la solución de referencia. Se supone que la corriente producida es rigurosamente proporcional a la intensidad luminosa. Recordemos que la ley de Beer dice que la transmitancia de una solución que contenga un material que absorba la luz depende de: a) la naturaleza de la sustancia; b) la longitud de onda de la luz; c) la cantidad de material absorbente de luz que existe en la trayectoria luminosa. La relación entre esos diversos factores fué demostrada por Beer para las soluciones coloreadas y puede expresarse así: para una determinada longitud de onda :  $T = 10^{-k.l.c.}$  siendo k: constante característica de la sustancia; c: concentración del material absorbente de la luz; c: concentración de material absorbente de luz; d) espesor de la solución atravesada por la luz. De la fórmula anterior deducimos:  $\log. T = -k.l.c.$  y de esta:  $-\log. T = k.l.c.$ ; estas son las ecuaciones que sirven de base al análisis fotométrico. Cuando es aplicable la ley de Beer, la densidad óptica es directamente proporcional a la concentración y para calibrar un procedimiento en función de la lectura de un patrón simultáneamente preparado, se aprovecha este hecho; por consiguiente: para dos soluciones de la misma sustancia a diferentes concentraciones, a la misma longitud de onda y a igual espesor de solución, tenemos la siguiente relación:

$$\frac{L. D_1}{L. D_2} = \frac{C_1}{C_2}$$

donde significan: L. D<sub>1</sub>: lectura de la solución problema; L. D<sub>2</sub>: lectura de la solución testigo; C<sub>1</sub>: concentración de la solución problema; C<sub>2</sub>: concentración de la solución testigo.-

Relación entre transmitancia y longitud de onda: esta relación viene dada por el llamado espectro de absorción de la sustancia; este se determina cuantitativamente midiendo la transmitancia para una concentración y espesor determinados de solución a diversas longitudes de onda y representando gráficamente los resultados en forma de una curva que relacione la transmitancia y la longitud de onda. El espectro de absorción de una sustancia suele ser característico de la misma y puede servir para identificarla. Se obtiene la máxima sensibilidad en los procedimientos fotométricos con la longitud de onda

a la que se produce la variación máxima en la transmitancia por unidad de variación en la concentración.-

Filtros de luz: La longitud de onda a la que se deben hacer las medidas fotométricas puede determinarse empleando filtros de luz ( filtrofotómetros ) o produciendo un espectro completo y aislando la porción deseada ( espectrofotómetro ); la mayor parte de los fotómetros de uso corriente son filtrofotómetros. Los filtros luminosos consisten en trozos de vidrio seleccionados que puedan transmitir la luz en una porción limitada del espectro; así, poniendo un filtro de esa clase en la trayectoria luminosa del fotómetro, pueden efectuarse medidas en la región espectral correspondiente a los límites de transmitancia del filtro. Es costumbre designar los filtros de acuerdo con la longitud de onda correspondiente al máximo de la transmitancia; así, un filtro "num. 540" tiene su máxima transmitancia en una longitud de onda de 540 milimicras.-

Para eliminar los inconvenientes de los fotómetros de una sola cubeta, se han ideado diversos tipos de aparatos que emplean dos fotoceldas en un circuito compensado, de los cuales es un ejemplo el aparato de " Cromoión " ;uno análogo hemos utilizado en la mayor parte de nuestras determinaciones: para manejarlo, con un filtro adecuado en su lugar, se coloca la solución testigo en una cubeta y ésta en la trayectoria de la luz, que incide en una de las fotoceldas; éstas se hallan dispuestas en un circuito de potenciómetro de modo que la corriente de una celda sea contraria a la de la otra a través de un instrumento que señala cero (galvanómetro de poca sensibilidad). Con la escala del fotómetro puesta en cero (correspondiente a densidad óptica cero) la corriente generada por la segunda celda fotoeléctrica se ajusta de modo que neutralize exactamente la que procede de la celda sobre la que actúa la luz que emerge de la solución; esta neutralización queda indicada por la lectura cero en el galvanómetro. Luego se reemplaza la solución testigo por la solución problema; cualquier absorción de luz por esta solución equilibrará eléctricamente las dos celdas, debiéndose restablecer la neutralidad haciendo girar el cuadrante del potenciómetro hasta que el galvanómetro llegue nuevamente a cero; la lectura de la escala del potenciómetro en este punto mide la absorción de luz por la solución.-

El foco luminoso es una lámpara de 100 wattios alimentada directamente por la corriente eléctrica ordinaria; el circuito compensado impide que las fluctuaciones en la intensidad de la luz influyan sobre las lecturas. El aparato está construido para usarlo con filtros luminosos de una transmisión espectral relativamente reducida; las cubetas necesitan aproximadamente 5 ml. de solución, pudiendo emplearse microtubos que requieren 2 ml.; el espesor efectivo de solución, con las cubetas grandes es de 1 centímetro.-

Hemos realizado la calibración de este colorímetro y del que vende la casa Crudo-Caamaño, para la valoración del colesterol, procediendo en la siguiente forma: preparamos una solución de colesterol "Merck", puro, al 2 0/00 en cloroformo anhidro; tomamos de la misma en distintos tubos de ensayo, perfectamente secos, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50, 1.75, 2.00 ml., añadiendo en cada caso la cantidad necesaria de cloroformo para hacer un volumen total de 5 ml.; los tubos fueron colocados en un termóstato que se hallaba a 22°C; Al cabo de 5' les hemos añadido 2 ml. del reactivo a cada uno de ellos (el reactivo había sido preparado mezclando 20 ml. de anhídrido acético y 1 ml. de ácido sulfúrico concentrado "Merck"). Las lecturas en el fotocolorímetro, fueron realizadas entre los 12' y los 14' y con los valores obtenidos se efectuó las respectivas curvas de calibración.-

C U A D R O 1

Calibración del fotocolorímetro " Cromoión " para la valoración del colesterol:

<u>Extinción</u>	<u>Colesterol</u>
- log.T	grs.0/00
330	0,50
390	1,00
450	1,50
510	2,00
570	2,50
620	3,00
680	3,50

## C U A D R O 2

Calibración del fotocolorímetro de la casa Crudo-Caamaño para la valoración del colesterol:

<u>Extinción</u>	<u>Colesterol</u>
-log.T	grs.0/00
350	0,50
500	1,00
650	1,50
800	2,00
950	2,50
1100	3,00
1250	3,50

-----0-----

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

- (1) CHEVREUIL J. Ann. de Chim. et de Phys. 2, 346 (1916).-
- (2) FLINT A. Amer. Jour. of the Medical Sciences. (1862).-
- (3) WINDAUS A. Z. Physiol. Chem. 65, 110 (1910).-
- (4) GRIGAUT A. Le Cycle de la Cholesterinemie. Paris (1913).-
- (5) LIEBERMANN C. Ber. Deutch. Chem. Ges. 18, 1803 (1885).-
- (6) DEULOFEU V., MARENZI D. Química Biológica. Buenos Aires (1955).-
- (7) BODANSKY M., BODANSKY O. Biochemistry of Disease. N. York. (1941)
- (8) WELLS H., DE WITT L., LONG E. The Chemistry of Tuberculosis. Belt (1923).-
- (9) KAUCHER J., GALBRAITH D., BUTTON M., WILLIAMS O. Archiv. of Biochemistry . 3 , 203 (1943).
- (10) HAGER W., SALKOWSKY H. Z. Physiol. Chem. 57, 523 (1908).-
- (11) ROSENHEIM C. Biochem. J. 23, 47 (1929).-
- (12) WALKER C., ANTENER J. Helv. Chim. Acta. 22, 1309 (1939).-
- (13) SCHERRER J. Helv. Chim. Acta. 22, 1329 (1939).
- (14) NATH W. Amer. Biochem. Exptl. Med. 2, 83 (1942).-
- (15) SCHULTZ A. Zentr. Allgem. Path u Analt. 35, 314-317 (1924).-

- (16) FIESER J., FIESER O. The Chemistry of Natural Products Related to Phennanthrene.-
- (17) ANDERSON J., NABENHAUER A. J. Am. Chem. Soc. 60, 46 (1929).-
- (18) HAWK P., OSER B., SUMMERSON W. Química Fisiológica Práctica. México (1940).-
- (19) KREBS W. La Colorimetría Clínica con Ayuda del Fotómetro de Pulfrich.
- (20) MARENZI A., CARDINI C., BANFI R., VILLALONGA F. Bioquímica Analítica Cuantitativa. Ed. El Ateneo. Buenos Aires (1947).-



## C A P I T U L O   I I

Métodos de determinación del colesterol de la sangre  
y comparación de las técnicas de Grigaut, Sackett y  
Braier-Chouela.

La mayoría de los métodos colorimétricos que se han utilizado y se utilizan para la determinación del colesterol existente en la sangre, se basan en la reacción que produce este esteroide con el anhídrido acético y el ácido sulfúrico, es decir la reacción de Liebermann-Burchard. Se han establecido dos métodos generales de extracción del colesterol: a) extracción previa desecación de la sangre; b) extracción directa por medio de distintos disolventes; a) entre los métodos que realizan una extracción clorofórmica de la sangre secada por calor o por agentes deshidratantes, se encuentran los siguientes:

Myers y Wardell (1), secan el suero o plasma sobre yeso de París, extraen con cloroformo y dosan colorimetricamente con la reacción indicada.-

Leiboff (3), (4), (5), (6), describe un procedimiento en el que la muestra se seca sobre un pequeño trozo de papel absorbente que se extrae en un matraz especialmente diseñado.-

Gettler y Baker (1916), utilizan para el secado el papel de filtro, al igual que Ling (1931), empleando en cada caso dispositivos especiales para la extracción.-

Reinhold y Shiels (2), utilizan el sulfato de sodio anhidro, señalando Reinhold que el empleo del yeso es causa de una extracción incompleta y a ello atribuye el haber obtenido con dicho deshidratante valores inferiores a los obtenidos con el método gravimétrico, indicando que cuando emplea el sulfato de sodio las cifras son más concordantes a las que da la precipitación con digitonina.-

Los métodos citados han dado buenos resultados realizados por sus autores, pero presentan el inconveniente que se requiere un tiempo muy grande para la desecación de la sangre y la posterior extracción en caliente con cloroformo, siendo poco útiles para aplicar en la clínica y sobre todo en aquellos laboratorios donde es necesario realizar varias determinaciones. b) Debido a esas causas son generalmente preferidos aquellos métodos que realizan la extracción de la sangre entera por medio de alcohol, alcohol-éter, acetona, etc; a este tipo pertenecen los métodos de: Bloor, Schoenheimer-Sperry; Grigaut; Sackett y Braier-Chouela, que son los más utilizados en nuestros laboratorios.-

Bloor (7), propuso su método en 1916; consiste en realizar una extracción de la sangre con una mezcla de 3 partes de alcohol y 1 parte de éter, en caliente; después de llevar a volumen y filtrar se toma una parte alícuota del filtrado y se lleva a sequedad; se extrae con cloroformo y se realiza la reacción de coloración. Las modificaciones a esta técnica original de Bloor, sugeridas por los distintos autores fueron las siguientes:

Mueller (1916), lava el extracto cloroformico con agua y luego lo seca con sulfato de sodio anhidro.-

Stoddard y Drury (1929), propiciaron la saponificación previa a la disolución en cloroformo.-

Sackett (1925), realiza la extracción (alcohol-éter), sin calentamiento. Cantoni (1930), sugiere el agregado de una mezcla de ácido oleico y palmítico al testigo para compensar el color.-

Bloor (1928), propuso el uso de un vidrio rojo en el colorímetro.

Muñoz(8), introdujo una modificación que le permite valorar fosfolípidos y colesterol para lo cual trata la sangre con alcohol caliente que extrae la totalidad de los lípidos; el extracto una vez evaporado se toma por éter de petróleo, en cuyo medio precipítanse los fosfolípidos por acetona y cloruro de magnesio, quedando en la solución de acetona el colesterol; se evapora la acetona y el extracto se disuelve en cloroformo, aplicando la reacción de coloración. El método de Muñoz tiene la desventaja de requerir mucho tiempo, mucha atención y de ser costoso, pues requiere varios disolventes.-

Schoenheimer y Sperry (9), en 1934, publicaron un detallado estudio en el cual describen un método, que requiere 0,20 ml. de suero, para determinar ambas formas del colesterol. El procedimiento consiste en la precipitación con digitonina del colesterol libre, seguida por la aplicación de una reacción de color al precipitado; se han tenido en cuenta las condiciones para que el precipitado sea completamente insoluble y pueda ser aislado fácilmente por centrifugación. Se puede resumir esquemáticamente así : a) precipita las proteínas con alcohol-acetona y filtra; b) sobre una parte alícuota del filtrado precipita el colesterol libre con digitonina y centrifuga; c) se-

ca el precipitado, disuelve en ácido acético, añade anhídrido acético y ácido sulfúrico, efectuando la lectura después de 30'; d) otra porción alícuota del filtrado se saponifica con hidróxido de potasio, se neutraliza con ácido clorhídrico y se precipita el colesterol total con digitonina, procediendo como en a), b) y c). En los considerandos y discusión del trabajo se consideran: la totalidad de la precipitación, las curvas de absorción de la coloración, coeficientes de extinción del colesterol y del digitonido en diferentes medios (utiliza el fotómetro de Pulfrich), tiempo requerido para la precipitación, saponificación de los esteres, comparación con otros métodos, precipitación en presencia de sales, desarrollo del color y exactitud del método.-

Es, evidentemente, uno de los mejores métodos de dosaje del colesterol, a pesar de ser un micrométodo laborioso y que requiere mucho tiempo; pero tiene en su favor la exactitud, aunque el empleo de 0,15 y 0,05 ml. de sangre que corresponde a las lecturas finales es exigua y los colores desarrollados resultan muy pálidos para la colorimetría; por estos motivos son los siguientes los métodos que más se emplean en nuestros laboratorios de análisis clínicos: Grigaut, Sackett y Braier-Chouela ; con ellos efectuamos los dosajes de colesterol en sangre, procurando poner de manifiesto las virtudes y defectos de cada uno, encontrar cual de ellos da resultados más exactos y es más útil para las condiciones de nuestro laboratorio.

METODO DE GRIGAUT: reactivos necesarios:

- 1) Solución clorofórmica exactamente titulada de colesterol conteniendo 0,060 grs. %.
- 2) Alcohol al 60 %, conteniendo 1/200 grs. de hidróxido de sodio.
- 3) Alcohol al 70 %, conteniendo 1/200 grs. de hidróxido de sodio.
- 4) Eter sulfúrico.
- 5) Cloroformo anhidro.
- 6) Anhídrido acético puro.
- 7) Acido sulfúrico puro.

Técnica para suero o plasma: colocar en el colesterinómetro del autor 2 ml. de suero sanguíneo, alcohol sodado al 60% hasta la marca indicadora de 15 ml.; tapar, mezclar invirtiendo varias

veces el aparato, dejar reposar y añadir éter sulfúrico hasta la segunda marca, mezclar y dejar reposar]; retirar la capa acuosa inferior reemplazándola por 20 ml. de agua que se mezcla y se deja 5' en reposo; nuevamente se extrae el agua y se efectúa otro lavado en la misma forma. Separadas las aguas de lavado, se vierte el éter en una cápsula de porcelana de 60 cc.; se lava el aparato con unos cc. de éter y se agrega al extracto primitivo evaporándolo a sequedad en baño maría, quedando en la cápsula unas gotitas de aspecto graso que se toman por varias porciones de cloroformo hasta completar 5 ml., colocándolas en una probeta graduada de 10 ml.; se practica la reacción de Liebermann-Burchard, añadiendo a la solución clorofórmica 2 ml. de anhídrido acético y 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado, dejándolo en reposo media hora. Al mismo tiempo en otra probeta graduada que sirve de testigo se mezclan 5 ml. de solución clorofórmica de colesterol al 0,060 grs.% con 2 ml. de anhídrido acético y 3 gotas de ácido sulfúrico.-

De acuerdo con el autor, al cabo de media hora la coloración verde ha alcanzado su máxima intensidad, procediéndose a la lectura colorimétrica; para ello, y según explica Grigaut, se puede colocar 5 ml. de cada una de ellas en los tubos de un colorímetro de dilución y llevar a igualar los tintes diluyendo según el caso con una mezcla de cloroformo, anhídrido acético y ácido sulfúrico. Sean, entonces, N el número de ml. marcado por la solución diluida; la cifra P que es la colessterina de un litro de suero será dada por la siguiente fórmula:

1) En el caso de la solución a dosar:  $P = 0,30 \times N$  gramos

2) En el caso de la dilución del testigo:  $P = \frac{7,50}{N}$  gramos

Al realizar las determinaciones hemos sustituido, sin ningún inconveniente, el "colesterinómetro de Grigaut" por una ampolla de decantación teniendo la precaución de medir el alcohol sodado y el éter sulfúrico; las lecturas fotocolorimétricas fueron efectuadas a los 15' por haberse verificado que es cuando se obtiene el máximo en la intensidad de la coloración; hemos efectuado el cálculo de la cifra de colesterol de la siguiente manera:

Lectura de la solución desconocido 1,50 = grs.0/00 de colesterol  
Lectura de la solución testigo

METODO DE SACKETT: reactivos necesarios:

- 1) Solución madre de colesterol: se disuelven 0,160 grs. de colesterol en 100 ml. de cloroformo.  
Solución testigo: 5 ml. de la solución madre se llevan a 100 ml. con cloroformo.
- 2) Alcohol al 96 %.
- 3) Eter sulfúrico puro.
- 4) Cloroformo anhidro.
- 5) Anhídrido acético.
- 6) Acido sulfúrico.

Técnica para suero, plasma o sangre entera: en un tubo de centrífuga graduado de 15 cc., se colocan 9 ml. de alcohol y 3 ml. de éter y se mezclan bien; a la mezcla se añade lentamente 0,20 ml. de suero, plasma o sangre entera, se tapa el tubo y se agita fuertemente durante 1'; se coloca el tubo en forma horizontal y se le deja reposar media hora de tal manera que el sedimento se reparta a lo largo del mismo; se centrifuga rápidamente durante 3 ' y se decanta el sobrenadante a un vaso de precipitación evaporándolo a sequedad en baño maría; el residuo que contiene el colesterol, se extrae 2 veces con 2-2,50 ml. de cloroformo cada vez, dejando en contacto el disolvente unos 2'. El cloroformo se decanta a una probeta graduada de 10 ml. y se completa exactamente con ese mismo disolvente a 5 ml.; a esta solución y, separadamente, a 5 ml. de la solución testigo, se añaden 2 ml. de anhídrido acético y 0,10 ml. de ácido sulfúrico; se agita bien, se deja en reposo en la oscuridad 15' y se compara en el colorímetro. El cálculo del valor de colesterol se realiza así:

Lectura de la solución desconocida 2,00 = grs.0/00 de colesterol.  
Lectura de la solución testigo

Este método fué realizado como indica su autor.

METODO DE BRAIER-CHOUELA: reactivos necesarios:

- 1) Solución testigo de colesterol al 2,00 grs.0/00 en cloroformo.
- 2) Acetona.
- 3) Cloroformo anhidro.

4) Anhídrido acético.

5) Acido sulfúrico.

Técnica para suero, plasma o sangre entera: En un matríz aforado de cuello largo y de 25 cc. de capacidad, se colocan 15-18 ml. de acetona pura, y se agrega, gota a gota, 2 ml. de suero, plasma o sangre entera; se lleva a un baño maría a 70°-75°C durante 5', agitando de vez en cuando con cuidado para evitar la ebullición tumultuosa de la acetona que puede derramarse. Por lo general el volúmen queda reducido a unos 12-15 ml. aproximadamente; se deja enfriar y se completa con acetona hasta 25 ml., se filtra por papel de filtro delgado y se miden 12,50 ml. que se pasan a un pequeño vaso de precipitación bien seco y se evapora en baño maría, en baño de arena o en la estufa a una temperatura que no pase de los 90° -100°C. Si no se dispone de tiempo suficiente para realizar inmediatamente la determinación completa, el extracto acetónico de la sangre se puede dejar varias horas apenas retirado del baño maría, para completar su volúmen más tarde; si no se desea calentar en baño maría la acetona se procede así: en un matríz aforado de 25 ml. se colocan 20 ml. de acetona anhidra, se agregan 2 ml. de suero, gota a gota y agitando el matríz para mezclar bien, se tapa éste y se deja a temperatura ambiente hasta el día siguiente; entonces se filtra, una vez completado el volúmen a 25 ml. y se prosigue como se ha indicado antes.-

También puede evitarse la evaporación del filtrado acetónico en caliente; una vez medidos los 12,50 ml. del filtrado en un vaso de precipitación se abandona a temperatura ambiente hasta el día siguiente, dejando que la evaporación se produzca espontáneamente en un sitio aireado. El residuo seco se disuelve en 2 ml. de cloroformo puro y se pasa a una probeta graduada de 10 ml.; se vuelve a extraer el residuo con 1-2 ml. de cloroformo y una tercera vez hasta completar en total 5 ml. de extracto clorofórmico. Simultáneamente en otra probeta se coloca 1 ml. de solución testigo de colesterol y se completa con cloroformo hasta 5 ml.; se añaden a las dos probetas 2 ml. de anhídrido acético y después de mezclar bien 0,20 ml. de ácido sulfúrico, se mezcla bien invirtiendo las probetas y se coloca en la oscuridad alrededor de 15'. El cálculo del valor de colesterol se realiza de la siguiente manera:

Lectura de la solución desconocida 2,00 = grs.0/00 de colesterol

Lectura de la solución testigo

Siguiendo algunas de las técnicas anteriormente detalladas, hemos realizado 168 determinaciones de colesterol en plasma sanguíneo (humano), realizando comparaciones entre los métodos de Grigaut, Sackett y Braier-Chouela.-

C U A D R O 3

Comparación entre las determinaciones efectuadas en plasma sanguíneo (humano) según las técnicas de Grigaut y Sackett. Las cifras expresan el colesterol en grs. 0/00.-

<u>Grigaut</u>	<u>Sackett</u>		<u>Grigaut</u>	<u>Sackett</u>
1,60	1,80		1,45	1,49
1,94	2,02		1,80	1,92
2,30	2,35		2,04	2,15
2,40	2,50		1,70	1,85
1,69	1,78		1,76	1,80
1,48	1,50		2,16	2,20
2,00	2,04		1,57	1,60
1,50	1,66		1,97	2,00
2,50	2,75		2,30	2,35
1,79	1,80		1,16	1,20
2,00	2,10		1,52	1,60
1,48	1,55		1,74	1,80
2,86	3,00		1,82	1,90
1,79	1,85		2,40	2,50

-----0-----

A través de estas 56 determinaciones se observa que el método de Grigaut da, generalmente, valores más bajos que el de Sackett.-

C U A D R O 4

Comparación entre las determinaciones efectuadas en plasma sanguíneo (humano) según las técnicas de Grigaut y Braier-Chouela. Las cifras expresan el colesterol en grs.0/00.-

<u>Grigaut</u>	<u>Braier-Chouela</u>	<u>Grigaut</u>	<u>Braier-Chouela</u>
1,50	1,68	1,56	1,70
1,80	2,00	1,78	1,89
1,46	1,64	1,45	1,58
1,55	1,77	1,63	1,73
1,97	2,12	1,82	1,94
2,26	2,40	2,01	2,15
3,78	3,96	1,56	1,59
1,62	1,72	2,34	2,49
1,90	2,04	1,87	2,01
1,46	1,60	1,56	1,69
1,29	1,43	1,90	2,07
1,51	1,62	1,57	1,71
1,98	2,11	1,90	2,15
2,04	2,15	1,45	1,60

-----o-----

Se observa que hemos obtenido resultados siempre mayores con el método de extracción con acetona y estas diferencias fueron en algunos casos bastante apreciable, término medio de 10%.-

C U A D R O 5

Comparación entre las determinaciones efectuadas en plasma sanguíneo (humano) según las técnicas de Sackett y Braier-Chouela. Las cifras expresan el colesterol en grs. 0/00.-

<u>Sackett</u>	<u>Braier-Chouela</u>	<u>Sackett</u>	<u>Braier-Chouela</u>
1,90	1,92	1,95	1,99
2,50	2,54	1,91	1,95
2,10	2,15	2,09	2,11
2,85	2,91	1,66	1,69
1,26	1,28	1,78	1,82
1,32	1,33	2,04	2,06
1,59	1,64	2,14	2,17
1,87	1,89	1,45	1,50
2,28	2,30	1,89	1,93

<u>Sackett</u>	<u>Braier-Chouela</u>	<u>Sackett</u>	<u>Braier-Chouela</u>
2,02	2,05	1,70	1,72
1,46	1,48	1,45	1,50
1,40	1,44	2,14	2,16
1,59	1,61	2,56	2,59
1,72	1,74	1,78	1,83

-----o-----

En este caso, prácticamente, no encontramos diferencias, aunque, en la mayoría de los casos, obtenemos resultados más altos con el método de Braier-Chouela. Es evidente que es el método de Grigaut el que da resultados más bajos, que podría ser atribuido al repetido lavado con agua que arrastraría parte del colesterol; este inconveniente se obviaría, según algunos investigadores, dejando el colesterinómetro durante un tiempo mayor en reposo, después de añadida el agua, para que la separación de la capa acuosa inferior se efectúe en forma más definida.-

Procurando encontrar justificativos a las diferencias halladas, efectuamos las determinaciones en la siguiente forma: en la técnica de Grigaut, retiramos la capa acuosa inferior después de 12 horas de reposo aproximadamente y continuamos en la forma indicada por su autor; en la técnica de Braier-Chouela llevamos a un volumen de 25 ml. después de filtrar. Se trataba de verificar si esas diferencias serían atribuidas al hecho de que en el Braier-Chouela al filtrar hubiera evaporación de la acetona con la consiguiente concentración del filtrado. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

C U A D R O 6

Comparación entre las determinaciones efectuadas en plasma sanguíneo (humano) según las técnicas de Grigaut y Braier-Chouela, con las modificaciones anteriormente citadas. El método de Braier-Chouela(1) fué realizado como han indicado sus autores; el método indicado como (2) lo realizamos llevando a un volumen de 25 ml. después de filtrar.-

<u>Grigaut</u>	<u>Braier-Chouela(1)</u>	<u>Braier-Chouela(2)</u>
1,58	1,64	1,62
2,54	2,62	2,60
1,50	1,63	1,62
1,64	1,74	1,72
1,80	1,93	1,92
2,44	2,58	2,55
2,02	2,15	2,14
1,55	1,64	1,63
1,82	1,94	1,92
2,10	2,20	2,19

-----o-----

Observamos, a través de estas 30 determinaciones, que las diferencias encontradas entre ambas técnicas de Braier-Chouela son insignificantes y que subsisten las halladas con el método de Grigaut.-

El método de Grigaut no suele aplicarse a la determinación del colesterol en sangre entera,. Hemos empleado las técnicas de Sackett y de Braier-Chouela para la determinación del colesterol en el plasma y en la sangre entera de una misma persona, obteniendo resultados muy concordantes, como se observa en el siguiente cuadro:

C U A D R O 7

Comparación entre las determinaciones efectuadas siguiendo las técnicas de Sackett y Braier-Chouela, en plasma y sangre entera de una misma persona:

<u>En plasma</u>		<u>En sangre entera</u>	
<u>Sackett</u>	<u>Braier-Chouela</u>	<u>Sackett</u>	<u>Braier-Chouela</u>
1,55	1,60	1,53	1,61
2,21	2,25	2,20	2,22
1,49	1,51	1,50	1,53
1,68	1,73	1,66	1,74
2,02	2,08	2,03	2,07

<u>En plasma</u>		<u>En sangre entera</u>	
<u>Sackett</u>	<u>Braier-Chouela</u>	<u>Sackett</u>	<u>Braier-Chouela</u>
2,44	2,47	2,44	2,49
1,50	1,54	1,48	1,55
1,89	1,94	1,89	1,95
2,06	2,10	2,07	2,11
1,39	1,44	1,40	1,44
1,87	1,90	1,88	1,91
2,55	2,60	2,53	2,61

-----o-----

Respecto al método de Sackett digamos que hemos obtenido, en muchas determinaciones, un color verde distinto al que presentaban las soluciones testigo especialmente cuando trabajamos con sangre entera; obtuvimos una tonalidad llamada de "hoja seca" que es atribuida al hecho de que los disolventes que se utilizan para la extracción, separan: el alcohol, todos los lípidos y el éter sulfúrico todos menos la esfingomielina y posiblemente en los fosfolípidos que extraen debe buscarse la causa de esa tonalidad. Por otra parte, siendo sencillo y de ejecución rápida, es un micrométodo y por el pequeño volumen de material que se usa los colores resultantes son muy pálidos; hemos observado, también, que existe un retardo en el desarrollo de la reacción de Liebermann-Burchard comparado con el desarrollo que se observa al practicar la reacción según el método de Braier-Chouela, lo que posiblemente ocurra por la presencia de los fosfolípidos. Con el objeto de verificar esto último hemos realizado la valoración del colesterol en dos porciones de un mismo suero en la siguiente forma: una porción del suero fué analizada por el método de Braier-Chouela como indican sus autores y la otra porción por el método de Sackett modificado en esta forma: partimos de 2 ml. de suero y utilizamos el alcohol-éter en una cantidad que luego nos permitiera obtener, al efectuar la reacción de Liebermann-Burchard, lecturas fotocolorimétricas cercanas a las que obteníamos con el método de Braier-Chouela, para evitar la palidez de los colores obtenibles con

el micrométodo.

C U A D R O 8

Desarrollo del color verde en la reacción de Liebermann-Burchard, según las técnicas de Sackett y Braier-Chouela. Las cifras expresan las desviaciones del fotocolorímetro o sea - log .T.

Tiempo de lectura después de añadir el ácido sulfúrico.

	4'	6'	8'	10'	12'	14'	16'	18'	20'	22'
B-Chouela	290	340	440	501	502	495	490	485	480	480
Sackett	270	330	370	395	455	485	490	495	500	495

-----0-----

Observamos que con el método de Sackett obtenemos el máximo en la intensidad de la coloración a los 20', mientras que con el método de Braier-Chouela se obtiene entre los 12' y los 14'.

Recordemos, además, que la técnica de Braier-Chouela es aplicable, indistintamente, a suero, plasma o sangre entera; esto lo hemos verificado tomando sangre de 28 pacientes del Policlínico Rawson y realizando la determinación en plasma y en sangre entera, obteniendo los siguientes resultados:

C U A D R O 9

Comparación entre las determinaciones efectuadas en plasma y sangre entera siguiendo la técnica de Braier-Chouela. Las cifras expresan el colesterol en grs. 0/00.-

<u>Plasma</u>	<u>Sangre entera</u>	<u>Plasma</u>	<u>Sangre entera</u>
1,75	1,77	2,15	2,15
2,04	2,05	1,58	1,60
1,39	1,39	2,55	2,57
1,68	1,65	1,84	1,87
2,80	2,82	1,19	1,21
1,54	1,53	1,86	1,84
1,18	1,19	1,95	1,97

<u>Plasma</u>	<u>Sangre entera</u>		<u>Plasma</u>	<u>Sangre entera</u>
1,82	1,84		2,00	2,02
1,37	1,36		1,45	1,46
2,15	2,17		2,10	2,09
2,10	2,11		1,56	1,58
2,01	2,00		1,90	1,92
1,53	1,54		2,08	2,10
1,66	1,68		1,80	1,80

---o---

Observamos que los resultados son muy concordantes y las variaciones pequeñas.-

Estimamos , en conclusión, que con el método de Braier-Chouela hemos obtenido los mejores resultados; recordemos que la acetona que se utiliza para la extracción tiene la ventaja, sobre los disolventes usados en los otros métodos, de no disolver los fosfolípidos, lo que traería aparejado el desarrollo del color verde de la reacción en menos tiempo que con otras técnicas; digamos, también, que la acetona disuelve las grasas, los ácidos grasos y el colesterol, pero los primeros no molestan en el desarrollo de la reacción final, ni la tonalidad ni la intensidad del color; el color verde obtenido es tan puro como el que obtenemos con la solución testigo.-

El método de Braier-Chouela presenta, además, la ventaja de la rapidez con que se puede realizar las determinaciones: la preparación y filtración del extracto requieren aproximadamente 10'; la evaporación y el dosaje colorimétrico 35', es decir que, en total, una determinación de colesterol por este método nos requiere aproximadamente 45'. En nuestras determinaciones, con el objeto de evitarnos el uso del matríz de 25 cc. que aconsejan los autores, hemos utilizado tubos cilíndricos, largos, de 75 cc. de capacidad lo que nos ponía a resguardo de las proyecciones de la acetona y nos ha permitido, contando con varios de ellos, realizar más de un dosaje a la vez, cuando los fines del trabajo así lo requería.-

#### ESTUDIO ESTADISTICO

Con las 168 determinaciones efectuadas siguiendo las técnicas de Gri-

gaut, Sackett y Braier-Chouela y comparadas en los cuadros 3, 4 y 5 hemos realizado un estudio estadístico para dilucidar si las diferencias halladas tenían, desde este punto de vista significación. Para realizar este estudio hemos seguido el planteo que los doctores: Murtagh, Castro Videla, Ferro R. y Ferro H. indican en su libro "Ensayo estadístico sobre valores sanguíneos en lactantes sanos y enfermos". Las expresiones y fórmulas estadísticas empleadas son las siguientes: Promedio Aritmético: P. A.  $= \frac{S(x)}{n}$  donde n representa el número de determinaciones y S(x) la suma de los n valores individuales.-  
Desviación Simple: dx es la diferencia de cada uno de los términos de la serie con respecto al P.A.-

Desviación Media:  $\frac{S(dx)}{n}$  es el promedio de las desviaciones simples.

Desviación Tipo, Normal, Cuadrática Media o Standard:  $D.S. = \sqrt{\frac{S(dx)^2}{n}}$

y para n menor de 30 es  $D.S. = \sqrt{\frac{S(dx)^2}{n-1}}$ . Una D.S. grande indica que la distribución en frecuencia está ampliamente extendida hacia ambos lados del P.A.-

Error Tipo, Normal o Standard:  $E.S. = \frac{D.S.}{\sqrt{n}}$  señala la dispersión de los promedios aritméticos de series semejantes a la estudiada y pertenecientes a una misma población. La comparación de dos promedios se realiza calculando el Error Tipo o Standard de la diferencia de los dos promedios:  $E.S.D. = \sqrt{(E.S_1)^2 + (E.S_2)^2}$  para aquellos casos en que  $n_1 \neq n_2 = 2$  es mayor de 30. Decimos que una diferencia entre dos promedios es "significativa", para series numerosas, cuando la diferencia de los promedios es igual o mayor que dos veces el error tipo (standard) de la diferencia de promedios, o sea cuando

$\frac{P_1 - P_2}{E.S.D.}$  es igual o mayor de 2; a esta relación se le designa con la letra t y, por lo tanto, podemos concluir que para series numerosas, la diferencia de promedios es significativa cuando t es igual o mayor de 2.-

El estudio que expondremos a continuación nos permitió concluir que las diferencias encontradas no tienen "significación estadística", ya que t siempre ha resultado menor de 2 y justamente

ese valor se ha hecho mas pequeño al realizar la comparación de las determinaciones efectuadas según los métodos de Sackett y Braier-Chouela. Debemos indicar, además, que el objetivo de nuestro trabajo no ha sido determinar promedios, ni zonas normales y patológicas, sino establecer la comparación estadística de los valores obtenidos con las técnicas mencionadas :

C U A D R O 10

Exámen estadístico de las determinaciones efectuadas según los métodos de Sackett y Braier-Chouela.

<u>Sackett</u>			<u>Braier-Chouela</u>		
$n_1$	dx	$(dx)^2$	$n_1$	dx	$(dx)^2$
190	3	9	192	2	4
250	63	969	254	64	4096
210	23	529	215	25	625
285	98	9604	291	101	10201
126	61	3721	128	62	3844
159	28	784	164	26	676
132	55	3025	133	57	3249
187	0	0	189	1	1
228	41	1681	230	40	1600
202	15	225	205	15	225
146	41	1681	148	42	1764
140	47	2209	144	46	2116
159	28	784	161	29	841
172	15	225	174	16	256
195	8	64	199	9	81
191	4	16	195	5	25
209	22	404	211	21	441
166	21	441	169	21	441
178	9	81	182	8	64
204	17	289	206	16	256
214	27	729	217	27	729
145	42	1764	150	40	1600

<u>Sackett</u>			<u>Braier-Chouela</u>		
$n_i$	dx	$(dx)^2$	$n_i$	dx	$(dx)^2$
189	2	4	193	3	9
170	17	289	172	18	324
145	42	1764	150	40	1600
214	27	729	216	26	676
256	69	4761	259	69	4761
178	9	81	183	7	49
P.A. = 18,7 ; D.S. = 38			P.A. = 190 ; D.S. = 38,70		
E.S. <sub>1</sub> = 7,20			E.S. <sub>2</sub> = 7,30		
E.S. <sub>D</sub> = 10,20					
$t = \frac{190 - 187}{10,20} = 0,29.$ No tiene, pues, "significación estadística".					

C U A D R O 11

Exámen estadístico de las determinaciones efectuadas según los métodos de Grigaut y Sackett.-

<u>Grigaut</u>			<u>Sackett</u>		
$n_i$	dx	$(dx)^2$	$n_i$	dx	$(dx)^2$
160	32	1024	180	20	400
194	2	4	202	2	4
230	38	1444	235	35	1225
240	48	2306	250	50	2500
169	23	529	178	22	484
148	44	1936	150	50	2500
200	8	64	204	4	16
150	42	1764	166	34	1156
250	58	3364	275	75	5625
179	13	169	180	20	400
200	8	64	210	10	100
148	44	1936	155	45	2025
286	94	8836	300	100	10000
179	13	169	185	15	225
145	47	2209	149	51	2605

<u>Grigaut</u>			<u>Sackett</u>		
$n_i$	dx	$(dx)^2$	$n_1$	dx	$(dx)^2$
180	12	144	192	8	64
204	12	144	215	15	225
170	22	484	185	15	225
176	16	256	180	20	400
216	24	576	220	20	400
157	35	1225	160	40	1600
197	5	25	200	0	0
230	38	1444	235	35	1225
116	76	5776	120	80	6400
152	40	1600	160	40	1600
174	18	324	180	20	400
182	10	100	190	10	100
240	48	2306	250	50	2500

P.A. = 192

P.A. = 200

D.S. = 38,50

D.S. = 40

E.S.<sub>1</sub> = 7,25

E.S.<sub>2</sub> = 7,50

E.S.<sub>D</sub> = 10,30

$t = \frac{200 - 192}{10,30} = 0,70$

No tiene, pues, "significación estadística"

C U A D R O 12

Exámen estadístico de las determinaciones efectuadas según los métodos de Grigaut y Braier-Chouela.-

<u>Grigaut</u>			<u>Braier-Chouela</u>		
$n_i$	dx	$(dx)^2$	$n_i$	dx	$(dx)^2$
150	30	900	168	27	729
180	0	0	200	5	25
146	34	1156	164	31	961
155	25	625	177	18	324

<u>Grigaut</u>			<u>Braier-Chouela</u>		
$n_i$	dx	$(dx)^2$	$n_i$	dx	$(dx)^2$
197	17	289	212	17	289
226	46	2116	240	45	2025
378	198	39204	396	201	40401
162	18	324	172	23	529
190	10	100	204	9	81
146	34	1156	160	35	1225
129	51	2601	143	52	2704
151	29	841	162	33	1089
198	18	324	211	16	256
204	24	576	215	20	400
156	24	576	170	25	625
178	2	4	189	6	36
145	35	1225	158	37	1369
163	17	289	173	22	484
132	2	4	194	1	1
201	21	441	215	20	400
156	24	576	169	26	676
234	54	2916	249	46	2116
187	7	49	201	6	36
156	24	576	169	26	676
190	10	100	207	12	144
157	23	529	171	24	576
190	10	100	215	20	400
145	35	1225	160	35	1225

P.A. = 180

D.S. = 46,60

E.S.<sub>1</sub> = 8,79

E.S.<sub>D</sub> = 12,40

$t = \frac{195 - 180}{12,40} = 1,20$

P.A. = 195

D.S. = 47

E.S.<sub>2</sub> = 8,86

No tiene, pues, "significación estadística."

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

- (1) MYERS V., WARDELL E. J. Biol Chem. 36, 157 (1918).
- (2) REINHOLD J., SHIELS W. Am. J. Clin. Path. 6, 22 (1936).
- (3) LEIBOFF J. J. Biol. Chem. 61, 177 (1924).
- (4) LEIBOFF J. J. Biol. Chem. 10, 857 (1925).
- (5) LEIBOFF J. J. Biol. Chem. 11, 777 (1926).
- (6) LEIBOFF J. J. Biol. Chem. 15, 776 (1930).
- (7) BLOOR W.R. J. Biol Chem. 24, 227 (1916).
- (8) MUÑOZ J. M. Rev. Soc. Arg. Biol. 8, 467 (1931).
- (9) SCHOENHEIMER R., SPERRY W. J. Biol. Chem. 106, 745 (1934).
- (10) GRIGAUT A. Le cycle de la cholestérimie. Tesis, París (1913).
- (11) SACKETT R. J. Biol. Chem. 64, 203 (1929).-
- (12) BRAIER B., CHOUELA A. Rev. Soc. Arg. Biol. 15, 42 (1939).
- (13) BRAIER B. La Semana Médica (1940).-
- (14) MURTAGH R., CASTRO VIDELA?, FERRO R., FERRO H. Ensayo Estadístico sobre Valores Sanguíneos en Lactantes Sanos y Enfermos. Buenos Aires (1947).-

-----o-----

C A P I T U L O    I I I

Estudio de los factores que pueden influenciar  
el desarrollo de la reacción de Liebermann-Burchard.

Desde que Autenrieth y Funk (1) y Weston llamaron la atención sobre sus inexactitudes, el método colorimétrico para la estimación del colesterol basado en la reacción de Liebermann-Burchard, ha experimentado muchas modificaciones. Con la mayoría de los modernos colorímetros fotoeléctricos, el color producido en la solución de prueba sola es lo que se mide y los resultados requeridos se obtienen consultando un gráfico de calibración previamente dibujado, y no por comparación del color con el de un testigo simultáneamente preparado. Con esta idea en la mente J.B. Ireland (2) efectuó un estudio de los métodos existentes para el desarrollo del color, con la idea de adaptarlos para el uso con el colorímetro fotoeléctrico; observó, de esta manera, que:

Bloor (3), (4), (5) y (6) deja 15' en la oscuridad o a la luz a la cual se va a efectuar la comparación; no indica temperatura.-

Autenrieth y Funk (1913), deja 15' a 35°C.

Weston (1917), añade ácido sulfúrico, mezcla, deja en la oscuridad 30'; luego agrega el anhídrido acético y lee a los 15'.

Cornell (1928), deja 15' en la oscuridad, a la temperatura del laboratorio.-

Schoenheimer y Sperry (1934), calientan el extracto cloroformico a 25°C antes de añadir los reactivos, desarrollando el color en baño de agua a 25°C y leen entre los 27' y los 37'. La cantidad de ácido sulfúrico añadida se describe como 0,10 ml. (ó 4 gotas).

Reinhold y Sheils (7), dejan 30' a 25°C en la misma luz a la cual van a efectuar la comparación. La solución no se calienta sino que se agrega una mezcla tibia de los reactivos.-

Kelsey (8), coloca en un baño de agua a 23°C durante 15' en condiciones moderadas de iluminación.-

Ireland usó una solución tipo de colesterol en cloroformo; ninguno de estos métodos le dió resultados satisfactorios y cuando la solución testigo fué reemplazada por una solución de colesterol preparada de una muestra de sangre, las variaciones se acentuaron en todos los casos. Por tal motivo y visto tales discordancias nos propusimos el siguiente estudio.-

Los factores concernientes al desarrollo del color son:

temperatura, tiempo de lectura, luz, concentración o cantidad de los reactivos, forma de añadir estos, estados del colesterol: libre o combinado. A ellos hemos dedicado nuestra atención, utilizando para la extracción del colesterol de la sangre el método de Braier-Chouela. Recordemos, a tal efecto, que los autores mencionados luego de añadir 2 ml. de anhídrido acético y 0,20 ml. de ácido sulfúrico, dejan las muestras "fuera de la luz directa". Hemos seguido las indicaciones dadas por esos autores, efectuando lecturas en el colorímetro fotoeléctrico cada dos minutos, obteniendo los siguientes resultados:

C U A D R O 13

Desarrollo de la reacción de Liebermann-Burchard, siguiendo la técnica de Braier-Chouela. Las cifras expresan las desviaciones del fotocolorímetro o sea - log T.-

Tiempo de lectura después de añadir el ácido sulfúrico.

	4'	6'	8'	10'	12'	14'	16'	18'	20'	22'
-log. T	442	482	459	441	423	409	397	376	370	358

----o----

Se comprueba que se obtiene el máximo en la intensidad de la coloración a los 6' de haber añadido el ácido sulfúrico, y que a partir de ese instante la coloración decrece paulatinamente en su intensidad. Es, entonces, evidente que al efectuar la lectura a los 15' no obtenemos el máximo en la intensidad de la coloración; se puede objetar que al realizar el testigo en análogas condiciones nos ponemos a resguardo de cualquier contingencia de esta índole, pues se supone que pasa lo mismo con esta solución. Efectivamente hemos verificado que una solución tipo de colesterol atraviesa un máximo en su intensidad de coloración a los 6' , para ir luego decreciendo.-

Sin embargo, al efectuar la misma determinación sobre varias porciones de un mismo suero, hemos comprobado que no se obtiene uniformidad en los resultados, lo que nos trajo aparejado el obtener valores distintos y contradictorios ;he aquí los resultados obtenidos aplicando la técnica de Braier-Chouela a distintas porciones de un mismo suero.

C U A D R O 14

Desarrollo de la reacción de Liebermann-Burchard en 5 extractos clorofórmicos distintos correspondientes a un mismo suero. Las cifras expresan las desviaciones del fotocolorímetro.-

Tiempo de lectura después de añadir el ácido sulfúrico.

	2'	4'	6'	8'	10'	12'	14'	16'	18'	20'
Porción 1°	-	-	460	440	426	412	400	391	380	368
Porción 2°	-	-	465	462	455	445	435	423	413	403
Porción 3°	-	480	460	438	417	405	396	384	372	361
Porción 4°	442	482	459	441	423	409	397	376	370	358
Porción 5°	-	470	480	475	465	454	440	430	420	410

-----o-----

Influencia de la temperatura; Procuramos, entonces, trabajar a temperatura uniforme; para ello colocamos las cubetas del fotocolorímetro, en el que se desarrollarán las reacciones, en un termóstato a 22°C, contando el tiempo a partir del instante de añadir el ácido sulfúrico:

C U A D R O 15

Desarrollo de la reacción de Liebermann-Burchard en 5 extractos clorofórmicos distintos correspondientes a un mismo suero, trabajando a una temperatura de 22°C. Las cifras expresan las desviaciones del fotocolorímetro.-

Tiempo de lectura después de añadir el ácido sulfúrico.

	2'	4'	6'	8'	10'	12'	14'	16'	18'	20'
Porción 1°	-	435	465	485	490	485	480	475	470	465
Porción 2°	-	420	460	475	480	482	480	475	465	460
Porción 3°	-	440	470	480	476	476	475	472	470	467
Porción 4°	-	414	455	480	483	486	485	479	475	465
Porción 5°	-	450	475	486	495	493	489	483	478	470

Se observa en el cuadro anterior, que a pesar de trabajar sobre una misma de suero, no obtuvimos la uniformidad en los resultados que esperábamos; además es notable la diferencia que existe en relación a las anteriores determinaciones, pues el máximo en la intensidad de la coloración se obtiene entre los 12' - 14'.-

Influencia de la cantidad de ácido sulfúrico añadida: Para ello trabajamos con una solución tipo de colesterol al 2,00 grs. 0/00 en cloroformo, en las condiciones descriptas por Braier-Chouela, salvo el hecho que utilizamos un termóstato a 22°C, añadiendo el ácido sulfúrico y efectuando lecturas cada dos minutos:

C U A D R O 16

Desarrollo de la reacción de Liebermann-Burchard en una solución tipo de colesterol, Se ha añadido 0,10 ml. de ácido sulfúrico y trabajado a temperatura uniforme de 22°C.

Tiempo de lectura después de añadir el ácido sulfúrico.

	4'	6'	8'	10'	12'	14'	16'	18'	20'
- log. T	274	380	445	470	485	495	494	490	480

---o---

C U A D R O 17

Desarrollo de la reacción de Liebermann-Burchard en una solución tipo de colesterol. Se ha añadido 0,15 ml. de ácido sulfúrico y trabajado a temperatura uniforme de 22°C.

Tiempo de lectura después de añadir el ácido sulfúrico.

	4'	6'	8'	10'	12'	14'	16'	18'	20'
-log. T	310	415	455	472	484	486	480	470	460

---o---

C U A D R O 18

Desarrollo de la reacción de Liebermann-Burchard en una solución tipo de colesterol. Se ha añadido 0,20 ml. de ácido sulfúrico y trabajado a temperatura uniforme de 22°C.-

Tiempo de lectura después de añadir el ácido sulfúrico.

	4'	6'	8'	10'	12'	14'	16'	18'	20'
-log. T	420	460	475	480	482	480	475	465	480

-----o-----

Observamos que la cantidad de ácido sulfúrico añadida ejerce marcada influencia en el resultado final, y el hecho de ser una pequeña cantidad difícil de medir con suma exactitud aumenta las dificultades. Hemos logrado salvar estos inconvenientes realizando la determinación en la siguiente forma: efectuamos la extracción acetónica del plasma como indican Braier-Chouela; el extracto lo hemos tomado con 5 ml. de cloroformo y lo colocamos en un termóstato que se encontraba a 22°C; mientras tanto preparamos el reactivo así: en un tubo de ensayo seco y limpio colocamos 20 ml. de anhídrido acético puro y lo dejamos en la heladera por espacio de 10'; le agregamos, luego, 1 ml. de ácido sulfúrico puro, gota a gota y agitando continuamente, quedando así listo el reactivo para usar; de este reactivo añadimos 2 ml. a tres porciones de un mismo suero que habían sido tratadas en análoga forma, efectuando lecturas cada dos minutos (recordemos que Shapiro, Lerner y Posen (11) en 1935 emplean una mezcla conjunta de anhídrido acético y ácido sulfúrico en la proporción de 15:1 "por la dificultad de medir pequeños volúmenes de ácido sulfúrico con exactitud").

C U A D R O 19

Desarrollo de la reacción de Liebermann-Burchard en 3 porciones distintas correspondientes a un mismo plasma, trabajando en las condiciones antedichas. Las cifras expresan las desviaciones del fotocolorímetro.

Tiempo de lectura después de añadir el ácido sulfúrico.

	4'	6'	8'	10'	12'	14'	16'	18'	20'
Porción 1 <sup>o</sup>	360	400	469	482	487	480	469	464	460
Porción 2 <sup>o</sup>	362	401	468	480	487	480	469	465	459
Porción 3 <sup>o</sup>	361	398	469	482	488	481	468	464	460

Comprobamos, así, que la uniformidad de nuestros resultados son concluyentes. Tratamos de verificar si ésta uniformidad se mantenía añadiendo el reactivo después de pasado un tiempo de efectuada la mezcla de sus componentes, para demostrar si éste mantenía su poder reactivo; efectuamos la reacción añadiendo el reactivo después de 15', 25', 35', 45' y 60' de verificada la mezcla con los siguientes resultados; recordemos que hemos trabajado sobre 5 ml. de una solución tipo de colesterol al 2,00 grs. 0/00.-

C U A D R O 20

Desarrollo de la reacción de Liebermann-Burchard en una solución tipo de colesterol, añadiendo la mezcla de los reactivos a los 15' de efectuada la misma.-

	Tiempo de lectura después de añadir el reactivo.							
	6'	8'	10'	12'	14'	16'	18'	20'
- log. T	420	490	502	508	500	490	485	480

---o---

C U A D R O 21

Desarrollo de la reacción de Liebermann-Burchard en una solución tipo de colesterol, añadiendo la mezcla de los reactivos a los 25' de efectuada la misma.-

	Tiempo de lectura después de añadir el reactivo.							
	6'	8'	10'	12'	14'	16'	18'	20'
- log. T	420	489	503	508	500	490	485	480

---o---

C U A D R O 22

Desarrollo de la reacción de Liebermann-Burchard en una solución tipo de colesterol, añadiendo la mezcla de los reactivos a los 35' de efectuada la misma.-

Tiempo de lectura después de añadir el reactivo.

	6'	8'	10'	12'	14'	16'	18'	20'
-log. T	420	490	502	508	500	490	485	480

---o---

C U A D R O 23

Desarrollo de la reacción de Liebermann-Burchard en una solución tipo de colesterol, añadiendo la mezcla de los reactivos a los 45' de efectuada la misma.

Tiempo de lectura después de añadir el reactivo.

	6'	8'	10'	12'	14'	16'	18'	20'
- log. T	420	489	502	507	500	489	484	480

---o---

C U A D R O 24

Desarrollo de la reacción de Liebermann-Burchard en una solución tipo de colesterol, añadiendo la mezcla de los reactivos a los 60' de efectuada la misma.

Tiempo de lectura después de añadir el reactivo.

	6'	8'	10'	12'	14'	16'	18'	20'
- log. T	345	405	440	452	450	447	445	440

---o---

Verificamos , de esta forma, que recién a los 60' de la mezcla de sus componentes, el reactivo no resulta útil para la determinación y debe ser desechado.-

Influencia de la luz: Hemos trabajado sobre una muestra de suero separada en dos porciones, determinando en ambas la cantidad de colesterol por el método de Braier-Chouela, con la modificación de añadir los reactivos mezclados en la proporción 20:1 y colocando las cubetas del fotocolorímetro en las que se desarrolla la reacción en un termóstato a 22°C; una de las cubetas se ha dejado en la oscuridad, la otra a la luz del día, obteniendo estos resultados:

C U A D R O 25

Desarrollo de la reacción de Liebermann-Burchard en la oscuridad.

Tiempo de lectura después de añadir el reactivo.

	6'	8'	10'	12'	14'	16'	18'	20'
-log. T	420	490	502	508	500	490	485	480

---o---

C U A D R O 26

Desarrollo de la reacción de Liebermann-Burchard a la luz directa.

Tiempo de lectura después de añadir el reactivo.

	6'	8'	10'	12'	14'	16'	18'	20'	22'
-log. T	-	365	430	465	480	485	490	495	492

---o---

Verificamos de esta forma que las muestras dejadas a la luz directa dan soluciones más pálidas, que varían en intensidad, debido probablemente a desigual iluminación. Por tal motivo las determinaciones siguientes se realizaron colocando las cubetas en la oscuridad.-

Influencia de la temperatura: Hemos realizado la determinación del colesterol en tres porciones de un mismo suero, siguiendo el método de Braier-Chouela y trabajando en las condiciones que, de acuerdo con lo anteriormente expuesto, nos aseguraba la mayor exactitud, es decir: reactivos mezclados en la proporción 20:1, colocando las cubetas en distintos baños de agua que se encontraban a 15°C, 22°C, 30°C y dejando las mismas en la oscuridad: a 15°C no desarrolló el color verde característico de la reacción de Liebermann-Burchard, sino un color azul-verdoso distinto al obtenido normalmente.-

C U A D R O 28

Desarrollo de la reacción de Liebermann-Burchard a 22°C.

Tiempo de lectura después de añadir el reactivo.

	6'	8'	10'	12'	14'	16'	18'	20'
- log. T	460	475	480	482	480	475	465	460

---o---

C U A D R O 29

Desarrollo de la reacción de Liebermann-Burchard a 30°C.

Tiempo de lectura después de añadir el reactivo.

	6'	8'	10'	12'	14'	16'	18'	20'
-log. T	502	480	470	460	450	440	430	420

---o---

Verificamos, así, que el aumento de la temperatura en el baño de agua acelera en tal forma la velocidad de la reacción que se obtiene el máximo de intensidad de coloración a los 6', para ir luego decreciendo en forma bastante apreciable, sobre todo cuando se trabaja a 30°C.

Influencia del estado del colesterol: Preparamos a tal efecto, el acetato de colesterol; 100 mgrs. de colesterol fueron disueltos en 200 ml. de anhídrido acético y hervido a reflujo durante una hora; al enfriar cuaja una masa blanca de acetato de colesterol y se filtró al vacío exprimiendo bien el precipitado blanco. Para librarlo del anhídrido acético que retiene, hicimos una papilla con alcohol en un mortero y volvimos a filtrar exprimiendo y lavando con mas alcohol; el producto sin secar se cristalizó en alcohol. El producto obtenido tenía un punto de fusión de 114°C; era una sustancia blanca, insoluble en agua, poco soluble en alcohol y muy soluble en cloroformo y éter. Hemos trabajado en dos cubetas del fotocolorímetro: una de ellas contenía 5 ml. de solución clorofórmica de colesterol y la otra 5 ml. de solución clorofórmica de acetato de colesterol ( contenía la misma concentración de colesterol que la anterior); colocadas ambas cubetas en un baño de agua a 22°C, se les añadió 2 ml. de la mezcla de los reactivos (anhídrido acético-ácido sulfúrico); se colocaron ambas cubetas en la oscuridad y se efectuaron lecturas cada dos minutos en el fotocolorímetro. Es posible así verificar, que la diferencia entre las reac-

ciones dadas por ambas soluciones es mayor en la región del desarrollo de la máxima coloración y disminuye cuando los colores se aclaran tendiendo a hacerse constantes; por otra parte el máximo en la intensidad de la coloración se obtiene antes con la solución clorofórmica de acetato de colesterol, como comprobamos con los siguientes cuadros:

C U A D R O 30

Desarrollo de la reacción de Liebermann-Burchard en una solución tipo de colesterol.-

Tiempo de lectura después de añadir el reactivo.

	4'	6'	8'	10'	12'	14'	16'	18'	20'	22'	24'	26'
-log.T	290	370	440	456	475	488	485	480	475	465	460	455

---o---

C U A D R O 31

Desarrollo de la reacción de Liebermann-Burchard en una solución tipo de acetato de colesterol.

Tiempo de lectura después de añadir el reactivo.

	4'	6'	8'	10'	12'	14'	16'	18'	20'	22'	24'	26'
-log.T	390	460	490	500	510	505	500	495	490	485	480	475

---o---

Estas experiencias fueron repetidas a otras temperaturas, sin poderse encontrar condiciones en las cuales la misma cantidad de colesterol diera idéntico color en las dos formas o estados.-

Experiencias de Reinhold para valoración de ambos estados del colesterol: Justamente este hecho que los ésteres del colesterol reaccionan más rápidamente que el colesterol libre en la reacción de Liebermann-Burchard, indujo a John Reinhold (7), que había verificado lo mismo para el palmitato de colesterol, a efectuar la reacción a 0° - 2°C diciendo que a tal temperatura "sólo los ésteres desarrollan color, mientras que el colesterol libre permanece prácticamente incoloro", permitiendo la determinación de ambas formas

del colesterol; el procedimiento evita el uso de la digitonina y se realiza así: el autor ha seguido en la extracción del colesterol y para preparar el filtrado, la técnica de Bloor; al extracto se añade cloroformo anhidro colocando el testigo y el desconocido en un refrigerador a  $0^{\circ} - 2^{\circ}\text{C}$ ; el anhídrido acético y el ácido sulfúrico se mezclan en la proporción de 1:0,025, enfriándolos a  $0^{\circ} - 2^{\circ}\text{C}$  y de esta mezcla añade 1 ml. al desconocido y 1 ml. al testigo, colocando los tubos en un refrigerador a  $0^{\circ} - 2^{\circ}\text{C}$ . Después de 40' - 50' se compara con un testigo artificial consistente en una solución acuosa de Naphtil verde B al 0,0025 %. El color que aparece en las condiciones descriptas es el originado por el colesterol esterificado; aunque un poco de color se desarrolla por el colesterol libre, según indica el autor; las soluciones, posteriormente, son calentadas hasta  $38^{\circ}\text{C}$  durante 40' a efecto de realizar la lectura del colesterol total.-

Hemos procurado verificar tales resultados y para ello trabajamos en la siguiente forma: en dos cubetas del fotocolorímetro colocamos, en una 5 ml. de solución clorofórmica de colesterol, y en la otra 5 ml. de solución clorofórmica de acetato de colesterol, equivalente a la anterior en colesterol y las hemos dejado durante 30' en un baño de agua, hielo y sal que se encontraba entre  $0^{\circ} - 2^{\circ}\text{C}$ ; al mismo tiempo hemos mezclado el anhídrido acético y el ácido sulfúrico en la proporción 20:1 y lo colocamos en un baño a  $0^{\circ} - 2^{\circ}\text{C}$ ; de esta mezcla hemos añadido 2 ml. a cada cubeta, mezclamos, conservando las cubetas en el baño refrigerante y efectuamos lecturas cada 15' con los siguientes resultados:

A los 15': no observamos ninguna reacción manifiesta por medio de color.

A los 30': un leve color azul claro se insinuó en la cubeta que contenía la solución de acetato de colesterol.

A los 45': se acentuó el color azul claro anteriormente citado, observándose un leve color azul claro en la cubeta que contenía la solución clorofórmica de colesterol.-

A los 60': el color aumentó levemente en su intensidad en ambas cubetas, pero sin alcanzar un color verde que nos permitiera efectuar lecturas en el fotocolorímetro.-

Por consiguiente, nuestros ensayos indican que trabajan-

do en las condiciones especificadas por Reinhold no hemos logrado reproducir los resultados de sus experiencias.-

#### METODO PARA LA DETERMINACION DIRECTA DEL COLESTEROL EN EL SUERO

Con el objeto de valorar el colesterol de la sangre en menos tiempo que lo que se requiere con los métodos más usados actualmente, Zlatkis, Zak y Boyle propusieron en 1953 una técnica que "obvia las etapas no deseables que consumen tiempo en los métodos "ahora existentes, presentando un cromógeno estable y de una sensibilidad mucho mayor que la ofrecida por todos los otros procedimientos publicados". El método consiste en añadir un volumen fijo de ácido sulfúrico concentrado, ácido acético glacial y solución de cloruro férrico a 0,10 ml. de suero en 3,00 ml. de ácido acético glacial; el desarrollo total de la reacción requiere aproximadamente un minuto; el color resultante, que es púrpura, obedece la ley de Beer y permanece constante durante un período de varias horas.-

Método de Zlatkis, Zak y Boyle: reactivos necesarios:

- 1) Solución tipo de colesterol: disolver 100 mgrs. de colesterol seco, libre de cenizas en 100 ml. de ácido acético glacial al 100%.
- 2) Solución de cloruro de hierro: disolver 10 grs. de cloruro de hierro "pro-análisis" en 100 ml. de ácido acético glacial al 100%.
- 3) Reactivo de coloración: diluir 2,00 ml. de la solución de cloruro de hierro a 200 ml. con ácido sulfúrico concentrado.-
- 4) Acido acético glacial al 100 %.

Preparación de la curva tipo: pipetear 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, y 0.50 ml. de la solución tipo en tubos de ensayo limpios y secos y diluir en cada uno de ellos a 3,00 ml. con ácido acético glacial al 100 %; agregar 0,10 ml. de agua destilada a cada tubo y mezclar; añadir 2,00 ml. del reactivo de coloración, dejándolo caer cuidadosamente por las paredes del tubo y mezclando suavemente. Aparece una suave coloración parda, que cambia a un intenso púrpura dentro de un minuto; cuando el tubo se ha enfriado a la temperatura ambiente, medir la absorción en un espectrofotómetro a 560 mu.

Técnica para el suero sanguíneo: Pipetear 0,10 ml. de suero en 3 ml. de ácido acético glacial contenida en un tubo de en-

sayo limpio y seco; agregar 2,00 ml. del reactivo de coloración y mezclar cuidadosamente; medir la absorción de la solución después que alcance la temperatura ambiente y determinar el colesterol total por la curva de calibración.-

PARTE EXPERIMENTAL

Hemos comenzado por realizar la calibración de nuestro fotocolorímetro para la valoración del colesterol según el método antedicho; para ello procedimos en la forma indicada anteriormente, obteniendo estos resultados:

C U A D R O 32

Calibración del fotocolorímetro "Cromoión", para la valoración del colesterol según el método de Zlatkis, Zak y Boyle.-

<u>Extinción</u>	<u>Colesterol</u>
-log.T	grs.0/00
132	1,00
200	1,50
262	2,00
328	2,50
398	3,00
462	3,50
528	4,00

---o---

Procedimos, posteriormente, a la valoración del colesterol en distintos sueros según esta técnica y comparamos estos valores con los obtenidos aplicando a los mismos sueros las técnicas de Grigaut, Sackett y Braier-Choqela, con los siguientes resultados:

C U A D R O 33

Comparación entre las determinaciones efectuadas en suero sanguíneo (humano), según las técnicas de Grigaut y de Zlatkis, Zak y Boyle. Las cifras expresan el colesterol en grs. 0/00.

<u>Grigaut</u>	<u>Zlatkis, Zak y Boyle</u>	<u>Grigaut</u>	<u>Zlatkis, Zek y Boyle</u>
1,60	1,85	1,45	1,50
1,94	2,10	1,88	1,99
2,30	2,43	2,04	2,21
2,40	2,65	2,70	2,91
1,69	1,82	1,57	1,64
1,48	1,57	1,97	2,05
2,00	2,15	2,30	2,42
1,50	1,68	1,16	1,23
1,79	1,90	1,52	1,66
2,00	2,15	2,40	2,60
1,48	1,60	2,29	2,35
2,86	3,15	1,86	2,01
1,79	1,90	2,24	2,40

---o---

C U A D R O 34

Comparación entre las determinaciones efectuadas en suero sanguíneo (humano), según las técnicas de Sackett y de Zlatkis, Zak y Boyle.

Las cifras expresan el colesterol en grs.0/00.

<u>Sackett</u>	<u>Zlatkis, Zek y Boyle</u>	<u>Sackett</u>	<u>Zlatkis, Zak y Boyle</u>
1,80	1,85	1,49	1,50
2,02	2,10	1,92	1,99
2,35	2,43	2,15	2,21
2,50	2,65	2,85	2,91
1,78	1,82	1,60	1,64
1,50	1,57	2,00	2,05
2,04	2,15	2,35	2,42
1,66	1,68	1,20	1,23
1,80	1,90	1,60	1,66
2,10	2,15	2,50	2,60
1,55	1,60	2,35	2,35
3,00	3,15	1,90	2,01
1,85	1,90	2,30	2,40

C U A D R O 35

Comparación entre las determinaciones efectuadas en suero sanguíneo (humano), según las técnicas de Braier-Chouela y de Zlatkis, Zak y Boyle. Las cifras expresan el colesterol en grs. 0/00.

<u>B.-Chouela</u>	<u>Zlatkis,Zak y Boyle</u>	<u>B.-Chouela</u>	<u>Zlatkis,Zak y Boyle</u>
1,82	1,85	1,50	1,50
2,04	2,10	1,93	1,99
2,37	2,43	2,15	2,21
2,55	2,65	2,87	2,91
1,79	1,82	1,61	1,64
1,51	1,57	2,01	2,05
2,08	2,15	2,38	2,42
1,66	1,68	1,20	1,23
1,82	1,90	1,62	1,66
2,10	2,15	2,51	2,60

---o---

Observamos, a través de las anteriores determinaciones, que el método de Zlatkis, Zak y Boyle da resultados más altos que los otros métodos; recordemos que todos los sueros utilizados tenían concentración normal de bilirrubina (estos valores, determinados según el método de Malloy-Evelyn, oscilaron entre 2 y 8 mgrs. 0/00).

Decidimos, luego, verificar la influencia que podía tener la presencia de una concentración anormal de bilirrubina, en la determinación de colesterol según esta técnica; para ello hemos utilizado sueros ictéricos y determinamos el colesterol siguiendo las técnicas de Grigaut, Sackett, Braier-Chouela y Zlatkis, Zak y Boyle, con los siguientes resultados:

C U A D R O 36

Comparación entre las determinaciones efectuadas en suero sanguíneo (humano), según las técnicas de Grigaut, Sackett, Braier-Chouela y Zlatkis, Zak y Boyle. Se añade el valor de la bilirrubinemia de los mismos sueros, determinada con el método de Malloy-Evelyn.

grs. 0/00 de colesterol según:

<u>Grigaut</u>	<u>Sackett</u>	<u>B.-Chouela</u>	<u>Zlatkis, Zak y Boyle</u>	<u>Bilirrubinemia mgs.0/00 según Malloy-Evelyn</u>
1,49	1,60	1,64	1,80	46,50
1,60	1,65	1,66	1,89	52,00
1,30	1,40	1,42	1,69	36,00
1,74	1,80	1,82	1,93	37,00
1,82	1,90	1,91	2,15	106,00
2,16	2,20	2,21	2,38	81,00
1,76	1,80	1,83	2,00	66,00
1,50	1,55	1,56	1,74	64,50
1,90	1,97	1,98	2,15	78,00
1,48	1,55	1,56	1,68	91,00
1,95	2,02	2,04	2,20	105,50

-----o-----

Se comprueba que es aún mayor la divergencia entre los resultados obtenidos según el método de Zlatkis, Zak y Boyle y los que dan los métodos de Grigaut, Sackett y Braier-Chouela.-

En nuestras posteriores determinaciones y al utilizar ácido acético glacial no suficientemente puro, obtuvimos resultados muy altos debido a la presencia de una turbiedad que atribuimos a la droga mencionada.-

====o====

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

- (1) AUTENRIENTH W., FUNK A. Munch. Med. Wech. 60, 1245 (1913).
- (2) IRELAND J. B. Biochem. J. 31, 285 (1941).
- (3) BLOOR W.R. J. Biol. Chem. 23, 317 (1915).
- (4) BLOOR W. R. J. Biol. Chem. 77, 53 (1928).
- (5) BLOOR W. R. J. Biol. Chem. 24, 222 (1916).
- (6) BLOOR W.R. J. Biol. Chem. 27, 437 (1917).
- (7) REINHOLD J. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 32, 614 (1935).
- (8) KELSEY F. J. Biol. Chem. 127, 15 (1939).
- (9) SPERRY W., BRAND A. J. Biol. Chem. 150, 315 (1943).
- (10) BLOOR W., PELKAN K., ALLEN D. J. Biol. Chem. 52, 191 (1922).
- (11) SHAPIRO J., LERNER W., POSEN A. Proc. Soc. Exp. Biol. And Med. 32, 1300 (1935).
- (12) JASUDA M. J. Biol. Chem. Japan. 24, 429 (1936).
- (13) BRAIER B., CHOUELA A. Rev. Soc. Arg. Biol. 15, 45 (1939).
- (14) PLIMMER J. Practical Organic and Biochemistry. 380 (1920).
- (15) ROJAHN D. Preparación de Productos Químicos y Químicos-Farmacéuticos. 738 (1942).
- (16) BLATT A. H. Síntesis Orgánica 193 (1950).
- (17) ZLATKIS A., ZAK B., BOYLE A. J. Lab. Clin. Med. 41, 486 (1953).

-----

C A P I T U L O   I V

El colesterol en el líquido de sondeo duodenal

La determinación del colesterol en el líquido de sondeo duodenal, constituye conjuntamente con la valoración de la bilirrubina, de la urobilina y de los ácidos biliares, la parte más importante realizable desde el punto de vista químico en dichos líquidos orgánicos. El análisis puede realizarse en forma exacta por el clásico método gravimétrico de Windaus (1), que ha sido empleado con tal fin por algunos investigadores, pero el método es muy laborioso y por tal motivo se ha procurado utilizar otros métodos.-

Los investigadores probaron las técnicas usadas para la valoración del colesterol en la sangre; preferentemente usaron la de Grigaut, con distintas modificaciones. Encontramos, así, las realizadas por Labbé, Moor y Nepvreux que precipitan los pigmentos biliares con agua de barita saturada y continúan con la técnica utilizada por Grigaut en la sangre; y la de Chiray, Mileschertch y Vasilescu que realizan la extracción con éter sulfúrico y prosiguen en forma análoga. Existen, además, otros métodos colorimétricos que dan buenos resultados, pero de técnica de larga duración: Mac Clure (2), Mac Clure y Hunteiger (3), Mac Master (4).-

En 1932 Deulofeu y Espinel Bavio (5) proponen una técnica de determinación del colesterol que consiste en secar la bilis con yeso de parís, extraer con éter, evaporar y realizar la reacción de Liebermann-Burchard. De acuerdo con estos autores el yeso parece colaborar en la fijación de ciertas sustancias que molestan y además se evita la formación de emulsiones que siempre se producen cuando se agita la bilis en un embudo de decantación. A pesar de que normalmente la bilis es de reacción alcalina, se le alcaliniza fuertemente antes de la extracción para evitar que diversas sustancias sean extraídas por el éter. La técnica detallada es la siguiente: reactivos:

- 1) Solución madre de colesterol: se disuelven 0,160 grs. de colesterol en 100 ml. de cloroformo puro.-
- 2) Soluciones testigos: a) se diluyen 5 ml. de la solución madre hasta 100 ml. con cloroformo ; b) se diluyen 10 ml. de la solución madre hasta 100 ml. con cloroformo.
- 3) Solución de hidróxido de sodio al 30 %.

- 4) Cloroformo anhidro.
- 5) Eter sulfúrico.
- 6) Acido sulfúrico.
- 7) Anhidrido acético.

Técnica: a unos 5 grs. de yeso de París colocados en un vaso de precipitación de unos 20 cc. de capacidad, se añaden 2 ml. de líquido duodenal y se mezclan bien, pudiendo emplearse mayor cantidad de yeso si fuese necesario. Se agregan 0,30 ml. de la solución de hidróxido de sodio y se mezcla bien nuevamente; luego se coloca el vasito en una estufa regulada a 105°C - 110°C y se seca durante una hora; después de secada la mezcla, se pulveriza bien y se pasa el polvo a un extractor de los empleados por Myers para dosar el colesterol en sangre, realizándose la extracción con éter sulfúrico durante 90'. Terminada la extracción, se evapora el éter a baja temperatura y el residuo se disuelve en 5 ml. de cloroformo; se añade 1 ml. de anhidrido acético y 0,20 ml. de ácido sulfúrico concentrado, realizándose la comparación con testigos que se preparan a partir de 5 ml. de las soluciones testigos, procediendo en análoga forma; el cálculo se realiza de esta manera:

$$\text{Para el testigo II : } \frac{T. 0,0008 \text{ d } 1000}{D. 5} = \text{ grs. 0/00 de colesterol.}$$

$$\text{Para el testigo I : } \frac{T. 0,0004 \text{ d } 1000}{D. 5} = \text{ grs 0/00 de colesterol}$$

T.= lectura colorimétrica de la solución testigo..

D.= lectura colorimétrica de la solución problema..

d = dilución clorofórmica de desconocido para 1 ml. de bilis.

Los autores usan dos testigos pues la principal dificultad consiste en la imposibilidad material de determinar a priori, ni aún en forma aproximada, la cantidad de colesterol que puede contener la bilis.-

Recordemos que el colesterol en la bilis se mantiene en solución por medio de los ácidos biliares; que es necesario trabajar con bilis sin filtrar, pues el examen microscópico ha demostrado la presencia de cristales de colesterol en el líquido de sondeo duodenal; además se ha verificado que los líquidos conservados en la cámara fría se enturbian y dejan depositar una gran parte de colesterol.

PARTE EXPERIMENTAL

Comenzamos por aplicar a las distintas bilis las técnicas de determinación de colesterol usadas en la sangre; trabajamos previamente con bilis A y C que son las menos pigmentadas, obteniendo estos resultados:

C U A D R O 37

Comparación entre las determinaciones efectuadas en Bilis A, según las técnicas de Grigaut y de Braier-Chouela. Las cifras expresan el colesterol en grs. 0/00.

<u>Grigaut</u>	<u>Braier-Chouela</u>
0,58	0,52
0,70	0,78
0,35	0,41
0,27	0,31
0,50	0,55
0,29	0,30
0,49	0,65
0,48	0,52
0,50	0,60
0,50	0,58

-----o-----

C U A D R O 38

Comparación entre las determinaciones efectuadas en Bilis C, según las técnicas de Grigaut y de Braier -Chouela. Las cifras expresan el colesterol en grs. 0/00.

<u>Grigaut</u>	<u>Braier-Chouela</u>
0,91	0,95
0,80	0,84
0,71	0,76
0,70	0,75
0,80	0,84
0,70	0,74

<u>Grigaut</u>	<u>Braier-Chouela</u>
0,81	0,98
0,68	0,72
0,70	0,80
0,82	0,90

---0---

Verificamos así que se obtienen, con ambas técnicas, resultados aceptables y semejantes.

Trabajando con Bilis B, determinamos el colesterol siguiendo las técnicas de Grigaut, Braier-Chouela, Deulofeu-Bavio y Bloor. Siguiendo los métodos de Grigaut y de Braier-Chouela se obtuvieron coloraciones débiles o de tonalidades distintas a las de los testigos, causas por las que no pudimos efectuar las comparaciones colorimétricas. Con las técnicas de Deulofeu-Bavio y de Bloor se obtuvieron buenas coloraciones y resultados comparables.-

C U A D R O 39

Comparación entre las determinaciones efectuadas en Bilis B, según las técnicas de Grigaut, Braier-Chouela, Deulofeu-Bavio y Bloor, . Las cifras expresan el colesterol en grs. 0/00.-

<u>Grigaut</u>	<u>Braier-Chouela</u>	<u>Deulofeu-Bavio</u>	<u>Bloor</u>
d	d	1,30	1,27
d	1,50	1,60	1,56
d	d	1,70	1,67
d	d	1,83	1,81
d	d	1,90	1,88
d	d	n	1,55
d	d	n	1,66
n	d	n	1,72
n	d	n	1,68
n	d	n	1,70

d = se obtuvo coloración débil, o de tonalidad distinta a las soluciones testigos que no permitieron la comparación.

n = no se efectuó la determinación.

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

- (1) AGGASE D., LAFONT W. Les applications pratiques de laboratoire a la clinique. Paris (1920).
- (2) MAC CLURE. Boston Med. Surg. Jour. 633 (1923).
- (3) MAC CLURE, HUNTEIGER A. Boston Med. Surg. Jour. 812 (1926).
- (4) MAC MASTER. Jour. Exp. Med. 25, 40 (1924).
- (5) DEULOFEU V., Bavio E. Rev. Soc. Arg. Biol. 8, 102 (1932).
- (6) WINDAUS A. Z. Physiol. Chem. 65, 110 (1910).-



C A P I T U L O    V

El colesterol en el líquido cefalorraquídeo

Fué motivo de numerosas discusiones entre los autores el establecer las cifras normales de colesterol en el líquido cefalorraquídeo, pues mientras algunos negaban la existencia del mismo en los casos normales, otros como Pighini, Motty y Escuchen aceptaban la presencia de rastros en el líquido normal; en igual forma opinaban Mestrezat y Roncati. Posteriormente, otros investigadores señalan que el colesterol se halla en cantidades que varían entre: 0,007 y 0,014 grs./0/00. Valores más altos han encontrado Knauer y Heindrich: 0,0592 grs. 0/00, hallando datos mayores en los procesos destructivos mas diversos. Parece que el colesterol pasa a los líquidos meningeos en los procesos destructivos mas variados como tumores, traumatismos del cerebro y enfermedades parecidas; en estos casos se libera el lipóide de las estructuras preformadas por destrucción del complejo "albúmina-lipóide". Plaut y Rudy encontraron un aumento de el colesterol en casos de poliomeilitis, ciática paquimeningitis, abscesos del cerebro y tumores; es bastante notable el hecho que Holtzhaus y Wichmann han comprobado también aumentos de accidentes eléctricos. Leevay y Mosony han notado una disminución a valores medios de 0,00066 grs.0/00 en casos de hidrocefalia; se cree que se trata de una disminución debido a una dilución del líquido cefalorraquídeo.-

Respecto del valor que tiene la determinación del colesterol en el líquido cefalorraquídeo digamos que puede llegar a tener importancia diagnóstica; por ejemplo: en un caso de parálisis tipo sección transversal, el encontrar alto contenido de colesterol indica un tumor y está en contra de una esclerosis múltiple. Se puede observar un comportamiento semejante en caso de aracnoiditis medular, pues el líquido extraído suboccipitalmente muestra una cifra de células y una cantidad de albúmina normal, estando el colesterol tres veces aumentado respecto del valor normal.-

Métodos para la valoración: La mayor parte de ellos no eran, antiguamente, apropiados para fines clínicos debido principalmente a la gran cantidad de material que requerían. Knauer y Heindrich necesitaban 100 ml. para hacer la comprobación segura del lipóide y solamente en casos muy raros se dispone de tales cantidades

Es el mérito de Plaut y Rudy el haber elaborado un procedimiento simple para la extracción del colesterol; se procede así: con una pipeta controlada se mide 1 ml. de líquido centrifugado y se le vuelca en un tubo de centrifuga de 10 ml; se seca a 37°C en desecador al vacío en general el líquido estará seco a las 24 hs., pero es conveniente esperar 48 hs. para garantizar un trabajo más uniforme ya que la cantidad de humedad es de gran importancia en la extracción siguiente; se disuelve el residuo seco en 3 ml. de una mezcla en partes iguales de cloroformo y alcohol absoluto y se raspa cuidadosamente con una espátula la pared del tubo. Plaut sostiene que usa la mezcla mencionada pues admite que en general las mezclas de solventes disuelven mejor que los componentes por sí sólo. Se ponen los tubos de centrifuga en un matraz de vidrio de 100 ml. llenando hasta la mitad con la mezcla y se pone a hervir suavemente; hay que agregar a veces algo de la mezcla disolvente porque ésta se evapora. La extracción dura una hora; luego se vuelve a extraer con cloroformo puro haciendo con este extracto la reacción de Liebermann-Burchard; se deja a oscuras a 30°C durante 10' y se compara con una serie de tubos "standard" cuyo contenido en colesterol es conocido.

En una de sus publicaciones posteriores Plaut compara los resultados de las lecturas obtenidas mediante tubos "standard" con aquellos que se obtenían mediante el fotómetro de Pulfrich, observando que no existen diferencias apreciables entre ambos modos de obtener el valor final; deducimos de las experiencias de Plaut, que indica como límite superior en casos normales la cifra de: 0,003, expresado en grs. 0/00, y que el colesterol se eleva considerablemente en casos anormales.-

Hemos realizado determinaciones del colesterol en líquidos cefalorraquídeos normales y patológicos, siguiendo los métodos usados anteriormente en sangre, es decir: Grigaut, Sackett y Braier-Chouela, con ligeras modificaciones a las técnicas originales; nos guió a ello, como siempre, verificar que método daba los mejores resultados y nos ponía a resguardo de posibles errores. Las modificaciones que hemos realizado y los motivos que nos indujeron fueron los siguientes: trabajamos en todos los casos con 4 ml. de líquido, es decir con el doble de la cantidad indicada por los autores de los

métodos, para salvar el inconveniente de la intensidad de la coloración obtenida como consecuencia de la escasa cantidad de colesterol; los extractos, en cada caso se han tomado con 2,50 ml. de cloroformo y hemos utilizado para efectuar las lecturas microcubetas cuya capacidad es de 3 ml. y que nos permitía la determinación en el colorímetro fotoeléctrico de la casa Crudo-Caamaño; utilizamos la curva de calibración de dicho colorímetro para esta determinación; los resultados obtenidos se detallan en el Cuadro 40, y a través de esas determinaciones es posible concluir que las cifras normales varían entre 0,0020 y 0,0045 grs.0/00, encontrándose cifras mayores en caso de líquidos cefalorraquídeos que presenten alteraciones patológicas.

Observamos que nuestros valores de colesterol en líquidos normales son superiores a los encontrados por otros autores; el método de Grigaut nos ha dado los resultados más bajos, obteniéndose los más altos con el método de Braier-Chouela.-

C U A D R O 40

Comparación entre las determinaciones efectuadas en Líquido Cefalorraquídeo, según las técnicas de Grigaut, Sackett y Braier-Chouela. Las cifras expresan el colesterol en grs. 0/00.

<u>Grigaut</u>	<u>Sackett</u>	<u>Braier-Chouela</u>	<u>Otros datos del L.C.R.</u>
0,022	0,025	0,026	Líquido xantocrómico. Albúmina: 0,98 grs.0/00. Citología: 3,30 elementos. Nonne-Appelt: positiva ++. Pandy: positiva ++.
0,009	0,010	0,011	Líquido lig: xantocrómico. Albúmina: 0,18 grs.0/00. Nonne-Appelt: positiva +. Pandy: positiva +.
0,0025	0,003	0,003	Albúmina: 0,20 grs.0/00. Citología: 1 elemento.
0,0040	0,0042	0,0045	Normal.
0,0035	0,0034	0,0038	Normal.
0,0240	0,0260	0,0296	Meningitis meningocócica.
0,0020	0,0025	0,0026	Normal.
0,0032	0,0034	0,0037	Normal.

<u>Grigaut</u>	<u>Sackett</u>	<u>Braier-Chouela</u>	<u>Otros datos del L.C.R.</u>
0,0029	0,0030	0,0032	Normal.
0,0038	0,0039	0,0040	Normal.
0,0075	0,0084	0,0085	Albúmina: 0,40 grs. 0/00. Citología: 1,90 elementos. Nonne-Appelt: positiva ++. Pandy: positiva +++.
0,0025	0,0028	0,0030	Normal.
0,0035	0,0037	0,0037	Normal.
0,0031	0,0039	0,0042	Albúmina: 0,38 grs. 0/00. Citología: 2,60 elementos. Nonne-Appelt: positiva +. Pandy: positiva +.
0,0025	0,0029	0,0030	Normal.
0,0037	0,0039	0,0040	Normal.
0,0026	0,0030	0,0035	Normal.
0,0018	0,0020	0,0022	Normal.
0,0029	0,0029	0,0034	Normal.
0,0035	0,0036	0,0040	Normal.

-----o-----

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

- (1) BRUNO C. El líquido cefalorraquídeo Normal y Patológico.  
Rosario (1940):
- (2) TODD C., SANFORD H. Diagnóstico Clínico para el Laboratorio.  
Madrid (1943):
- (3) HAWK P., OSER B., SUMMERSON W. Química Fisiológica Práctica.  
México (1940):



## C O N C L U S I O N E S

1.) Se realizó un estudio comparativo de varias técnicas (especialmente las de Grigaut, Sackett y Braier-Chouela), para la determinación del colesterol en sangre, líquido de sondeo duodenal y líquido cefalorraquídeo.-

2.) Las determinaciones realizadas mediante la técnica de Grigaut en suero y plasma humanos, acusaron resultados ligeramente inferiores a los obtenidos con las otras técnicas.-

3.) Siguiendo la técnica descrita por Braier-Chouela, se obtuvieron valores más elevados que con las de Grigaut y Sackett, lo que indica posiblemente una mejor extracción.-

4.) El método de Braier-Chouela presentó la ventaja de ser de ejecución rápida, y permitió obtener una coloración verde perfectamente comparable con las de las soluciones testigos, cuando se trabajó en suero, en plasma o en sangre entera.-

5.) Empleando la técnica de Sackett se obtuvo con frecuencia una coloración verde, que cuando se observó a simple vista presentó una tonalidad denominada de "hoja seca" distinta a las obtenidas con las soluciones testigos.-

6.) Trabajando con extractos acetónicos de sangre, se estudiaron los siguientes factores que pueden influenciar el desarrollo de la coloración verde en la reacción de Liebermann-Burchard: a) Temperatura; b) Tiempo; c) Luz; d) Cantidad de los reactivos y forma de añadir los mismos; e) Estado del colesterol (libre o combinado). Como resultados de estos ensayos se aconseja:

- a) Realizar la extracción del colesterol siguiendo la técnica descrita por Braier-Chouela.-
- b) Efectuar la reacción de Liebermann-Burchard a una temperatura lo más próxima posible a 22°C.
- c) Realizar la lectura de la reacción entre los 12' y los 14', pues es este el lapso óptimo para el desarrollo de la coloración.-
- d) Mantener los tubos en la oscuridad durante el desarrollo de la coloración en la reacción de Liebermann-Burchard.
- e) Los reactivos (20 ml. de anhídrido acético-1 ml. de ácido

sulfúrico) deben mezclarse antes de añadirlos a la solución clorofórmica de colesterol; la mezcla mencionada, conservada en la heladera, puede utilizarse hasta 60' después de haber sido efectuada.-

7.) No hemos podido reproducir los resultados de las experiencias realizadas por Reinhold en 1935, que le permitieron valorar el colesterol libre y el combinado trabajando a bajas temperaturas; hemos realizado las determinaciones entre 0°C y 2°C, como indica el autor citado anteriormente, no habiendo obtenido coloración verde aún después de 60' de iniciada la reacción.-

8.) Además de los métodos indicados en el párrafo 1., se efectuó un estudio comparativo del método de Zlatkis, Zak y Boyle, habiendo obtenido los siguientes resultados:

- a) El método nos ha dado resultados más altos que los métodos de Grigaut, Sackett y Braier-Chouela.-
- b) Cuando en los sueros examinados el valor de la bilirrubinemia sobrepasó los 10 mgrs. por mil, se observó que se obtenían datos aún más elevados, lo cual aumentó la divergencia de los resultados obtenidos con este método y con los de Grigaut, Sackett y Braier-Chouela.-
- c) Cuando no se empleó ácido acético "pro-análisis", se produjo una turbiedad que impidió la comparación.-

9.) Se efectuaron determinaciones en líquidos de sondeo duodenal. En Bilis A y Bilis C se efectuó una comparación entre las técnicas de Grigaut y de Braier-Chouela, obteniéndose resultados aceptables y semejantes con ambas técnicas.-

10.) Con Bilis B se compararon las técnicas de Grigaut, Braier-Chouela, Deulofeu-Bavio y Bloor. Siguiendo las técnicas descritas por Grigaut y Braier-Chouela se obtuvieron coloraciones débiles o de tonalidades distintas a las de los testigos. Con las técnicas de Deulofeu-Bavio y de Bloor se obtuvieron buenas coloraciones y resultados comparables. El método de Bloor resultó más rápido y simple que el de Deulofeu-Bavio.

11.) Se efectuaron determinaciones en líquido cefalorraquídeo siguiendo las técnicas de Grigaut, Sackett y Braier-Chouela, habiendo encontrado en líquidos normales cifras comprendidas entre

0,0020 y 0,0045 grs. por mil.-

12.) En líquidos cefalorraquídeos patológicos se encontraron en todos los casos cifras superiores a las encontradas en líquidos normales.-

13.) Al comparar las diferentes técnicas en líquidos cefalorraquídeos, se observó que al igual a lo encontrado en sangre el método de Grigaut acusó resultados más bajos que con los otros métodos; los valores más altos se obtuvieron siguiendo la técnica de Braier-Chouela.-

-----0-----

