6.3

La Crónica Médica

APARTADO POSTAL 2563 LIMA - PERU

Universidad Nac. May. de San Marcos
INGRESADO EN
- 1 SET. 1960
BIBLIOTECA CENTRAL
LIMA - PERU

COMITE DE REDACCION

CARLOS A. BAMBAREN
Director

REDACTORES

EDMUNDO ESCOMEL
LUIS D. ESPEJO — RAFAEL M. ALZAMORA — JOSE MARROQUIN
ERNESTO EGO-AGUIRRE — JORGE AVENDAÑO HUBNER
LUIS QUIROGA QUIÑONES — HUMBERTO PORTILLO
JOSE B. JIMENEZ CAMACHO
GUILLERMO KUON CABELLO

Año 74.- Núm. 1131 Setiembre 1957

SUMARIO

Espectrofotometría de hormonas esteroides y metabolitos hormonales en orina, por el Dr. Antonio Muñoz Armestar.

Introducción, pág. 197
Consideraciones físico-químicas sobre absorción espectral, pág. 199
Microespectrofotometría cuantitativa de hormonas y estereoides hormonales de la orina, pág. 203
Microdeterminación espectral cuantitativa de estrógenos totales en orina y ensayo de partición de estriol de la fracción estrona-estradiol, pág. . 205
Microdeterminación espectral de 17 hidroxicorticoides andrógenos urinarios, por absorción ultravioleta, pág. 216
Discusión, pág. 225
Conclusiones, pág. 226
Bibliografía, pág. 227

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

el más poderoso de los biocatalizadores conocidos

DOCEMINA

INYECTABLE*

(vitamina B_{12})

INDICACIONES

anemia de Biermer, anemias macrocíticas, anemias hemolíticas secundarias, síndromes neuroanémicos, neuralgias diversas, polineuritis diabéticas y alcohólicas, herpes zona, esclerosis en placas, enfermedad de Parkinson, síndrome espinocerebeloso, fases aguda y de recuperación de la poliomielitis, prematurez, distrofia, retardos estaturales y ponderales en la infancia, embarazo, delgadez constitucional, procesos de reparación tisular, convalecencia, astenia física e intelectual de la senectud, cirrosis hepática, hepatitis a virus, insuficiencia hepática, enterocolitis, manifestaciones cutáneas alérgicas, etc.

12

2 dosificaciones : 100 y 1,000 mcg. por cc.

2 presentaciones: cajas de 1 y de 3 ampollas de 1 cc.

****Para administración por vía oral: DOCEMINA GOTAS 1500 mcg., en frascos de 10 cc.***

ROUSSEL

LABORATORIOS ROUSSEL PERU S.A.

Av. Bolívar 795, Pueblo Libre - Telf. 47620

LIMA - PERU

Espectrofotometría de hormonas esteroides y metabolitos hormonales en orina

Por ANTONIO MUÑOZ ARMESTAR

Las técnicas analíticas han progresado por el uso de aparatos que cuantifican con exactitud y rapidez y la Bioquímica ha abierto nuevos horizontes al análisis químico, que si originalmente se apoyó en los principios de Química-analítica general, después incorporó técnicas físico-químicas, que se ponen en práctica con la fotocolorimetría, espectrofotometría, polarografía, electroforesis, etc.

En la actualidad se aplican procedimientos físico-químicos al análisis bioquímico, que extrae primero, la substancia química, para luego cuantificarla directamente. En ambas etapas se evita la transformación, alteración o destrucción parcial del metabolito que se trata de identificar.

Al estudiar la espectrofotometría de absorción no característica y su adaptación en el análisis bioquímico, se deben exponer los fundamentos físico-químicos y las reglas para su aplicación en la determinación cuantitativa de sustancias químicas, hormonas y esteroides hormonales, que contiene la orina u otros ca en la región ultravioladа no se ha estudiado aún definitivamenlíquidos biológicos.

Doy preferencia al estudio de las hormonas y esteroides hormonales de la orina, porque su valoración espectrofotométrite y porque en su mayor parte pierden sus reacciones características en el análisis espectral, porque experimentan modificaciones en su estructura química durante su circulación en el organismo e interfieren metabolitos de otra procedencia endocrínica.

Algunos disolventes muy específicos, extraen la sustancia química que se desea caracterizar en tal estado de pureza, que se encuentran las líneas espectrales características; pero en la mayoría de los casos, esta posibilidad no se consigue, siendo necesario, como en el caso de las hormonas y esteroides hormonales, aplicar la técnica espectrofotométrica de absorción ultravioladа no característica.

Surgió este procedimiento de determinación cuantitativa, por haber comprobado que existen compuestos químicos en es-

Universidad del Perú. Decana de América

tado puro, que registran absorción espectral, pero sin líneas o curvas características, no pudiendo la espectrofotometría clásica, realizar su análisis cuantitativo. Esto sucede aún con sustancias que poseyendo absorción espectral característica, la pierden al ingresar en el organismo, debiendo entonces extraerlas y purificarlas, según procedimientos no específicos.

En el Perú se han efectuado numerosos e importantes trabajos sobre cuantificación de esteroides hormonales y hormonas esteroides, siendo el primero el de Gladys Oliva que determinó en la orina 17 cetoesteroides neutros totales utilizando técnica colorimétrica; luego Luz Azabache Aguilar hizo la determinación fraccionada de 17 cetoesteroides neutros de la orina; Victoria Salazar Bustamante estudió los corticoides urinarios en estado normal y después de intervención quirúrgica; Elena Naupary Mosquitto estudió los variaciones en la concentración de 17 cetoesteroides en la orina de gestantes con hiperemesis gravídica; Nelly Rosales Pizarro determinó también 17 hidroxicorticoides urinarios en gestantes con hiperemesis gravídca; Haydée Linares Coloma cuantificó 17 cetoesteroides neutros en mujeres, antes y después del parto; Consuelo Sazieta estudió la eliminación de 17 cetoesteroides para determinar el probable sexo del feto y Manuel Morante Miranda estudió el funcionamiento de la suprarrenal, determinando 17 hidroxicorticoides en la orina.

El estudio de la eliminación de estrógenos por la orina, la inició en el Perú N. M. Naveda quien utilizó la técnica biológica de Allen-Curtis; enseguida Luisa Tipian Valenzuela extrajo esterona de orina de mujer embarazada; Jacquelin Calderón Delgado efectuó la determinación cuantitativa de estrógenos en orina de mujer; Laura Bermedo A., empleando la técnica colorimétrica de Gutterman y la gravimétrica de Venning y Browne, cuantificó pregnandiol en orina; Fernando Fuentes y Fuentes estudió la eliminación de estrógenos por la orina de homosexuales; María Ibáñez T. determinó cuantitativamente estrogenuria en la mujer aparentemente sana; Rodrigo Vargas Cobeña realizó la determinación cuantitativa de estrogenuria en embarazada aparentemente sana y con toxemia de la gestación; A. Medina D. estudió el diagnóstico del embarazo a base de 3 inyecciones de estrona en aceite; L. Ortega efectuó la determinación de estrógenos relacionándolos con la acción dinámico-específica de las proteínas; Franz Ticona Romero estudió los estrógenos y la progesterona en relación con el diagnóstico precoz del embarazo; G. A. Cáceres investigó las variaciones cuantitativas de los estrógenos y su rol protector; C. F. León estudió la eliminación de estrógenos por la orina en embarazadas con amenaza de aborto y Eliseo Reátegui Reátegui estudió la insuficiencia ovárica estrogénica. Estos investigadores peruanos emplearon técnicas fotocolorimétricas y espectrofotométricas, para cuantificar hormonas esteroides y estrógenos.

La técnica, condiciones y forma como deben hacerse las determinaciones espectrofotométricas de absorción espectral no

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú, Decana de América

característica, en la región ultraviolada, es materia de este trabajo, que consta de las siguientes partes: En la primera, enuncio conceptos físico-químicos sobre absorción espectral y estudio con detención la absorción no característica, con sus aplicaciones al análisis bioquímico; en la segunda parte describo la microdeterminación espectral cuantitativa de estrógenos totales en orina y los ensayos de partición del estriol en la fracción Estrona-Estradiol, exponiendo los resultados obtenidos al cuantificar estrogenuria en embarazadas aparentemente sanas, con preeclampsia, eclampsia y virilismo; en la tercera relato las investigaciones determinando 17 hidroxicorticoides urinarios en hipermesis gravídica, exponiendo los fundamentos de la técnica de cuantificación y la de 17 cetoesteroides urinarios androgénicos, llevada a cabo antes y después del parto y en hiperemesis gravídica, para terminar con la discusión, conclusiones y bibliografía consultada.

CONSIDERACIONES FISICO-QUIMICAS SOBRE ABSORCION ESPECTRAL

Es propiedad físico-química inherente de la materia, absorber determinado número de radiaciones electromagnéticas, de longitud de onda definida y estrecha y cercana a la radiación monocromática.

La absorción depende de la longitud de onda, que suele ser característica, según la composición o estructura de la substancia química que se investiga; por lo tanto las mediciones a varias longitudes de onda permitirán identificar la sustancia disuelta y determinarla cuantitativamente.

Los principios fundamentales de la espectrofotometría, permiten entrever sus vastos alcances y proyecciones. Efectivamente se ha comprobado que existen muchas sustancias químicas que absorben radiaciones electromagnéticas en forma característica, pero otras, no menos numerosas, registran absorción no característica; por tanto, no se relacionan con su composición o estructura química. Sinembargo, dicha absorción es proporcional, en determinadas longitudes de onda, a la concentración, permitiendo su determinación cuantitativa.

Si las absorciones a diferentes longitudes de onda, permiten la identificación, cuando las absorciones no son características, es imposible tal identificación. Pero como la longitud de onda, de la parte donde la banda de absorción se extingue o desaparece, es característica del material absorbente, es posible realizar la identificación. Estos dos aspectos físico-químicos de la absorción espectral, tienen aplicación directa en el análisis cualitativo y cuantitativo, porque ambas absorciones características, son específicas de la concentración a determinadas longitudes de onda.

Características de las absorciones espectrales.— Si se investiga la absorción espectral de una solución a diferentes longitudes de onda, pueden presentarse dos casos:

1º.— Que la substancia a determinada concentración, registre una curva característica con la cima o cimas respectivas de absorción máxima y mínima.

2º.— Que solo registre absorción y ninguna curva o línea característica.

El estudio analítico espectral de las sustancias que registran absorción del primer tipo, es bastante conocido, así como los fundamentos y leyes fotométricas que lo rigen. Respecto al segundo caso, rigen para ellas los mismos fundamentos y leyes, pero asimilando para el caso del análisis cuantitativo el concepto de la especificidad de la absorción a determinadas longitudes de onda, respecto de la concentración. Es interesante tener presente que la absorción a determinadas longitudes de onda, característica o no, solo conserva linearidad dentro de determinada concentración, es decir, que si se observa estrictamente la aplicación de las leyes fotométricas, solo en ciertos puntos se encuentran cifras reales para determinada concentración. El hecho de apreciar la absorción característica a determinada longitud de onda y usando los puntos de máxima y de mínima absorción, no elimina la posibilidad de estar haciendo apreciaciones erróneas, si no se tiene en cuenta la concentración ideal o sea donde debe existir la linearidad deseada, es decir, el logaritmo de la fracción de luz transmitida I/I^o, trazado conjuntamente con la concentración, da una línea recta. Estos principios dan la idea de poder elegir otros puntos que no sean precisamente los característicos, siempre que se tenga presente la linearidad respectiva, o que la ecuación sea tal que se obtenga una línea recta. Log. I/I^o = Elc.

Efectivamente se pueden hacer apreciaciones de sustancias con absorción espectral característica, con fines analíticos cuantitativos en otros puntos que no son los acostumbrados picos de máxima absorción, siempre que se compruebe el principio de la linearidad y especificidad de la absorción, respecto de la concentración.

Con esto se prueba que las lecturas de absorción espectral de una substancia, pueden tomarse en la longitud de onda característica o en otra, donde haya proporcionalidad entre la lectura y la concentración, es decir, 2-Log.G=K que es la expresión matemática más simple, deducida de la combinación de ambas leyes fotométricas (Lambert y Beer) usadas en Espectrofotometría.

Especificidad de la absorción espectral respecto de la concentración.— La absorción es siempre específica con la concentración a determinadas longitudes de onda. Este postulado se halla corroborado por el hecho de no poder realizar análisis cuantitativos, si determinada concentración de una sustancia X registra diferentes absorciones cada vez, esto es, que la absorción espectral no es específica de dicha concentración.

La absorción espectral no característica, amplía enormemente el panorama cuantitativo de la espectrofotometría, pudiendo aplicarse en Bioquímica, donde se trabaja con líquidos

Universidad del Perú. Decana de América

de constitución compleja o poco conocida, por lo menos en su totalidad.

Igualmente puede mostrar los cambios de una sustancia, si se trata de aquellas inestables o mezclas complejas, que requieren el control espectrofotométrico.

Espectrofotometría de absorción característica y no característica.— La absorción espectral, característica o no de una sustancia a determinada longitud de onda, es específica de la concentración y a veces suele ser característica de la composición o estructura química del soluto. Este postulado resume los fundamentos de la Espectrofotometría de absorción cualitativa, incluyendo ambos tipos de absorción.

La absorción espectral característica o no de una sustancia que se halla interferida e impurificada pr trazas de otras sustancias extrañas, no identificadas a determinadas longitudes de onda, es también proporcional a la concentración. Este principio es alterable, solo por la inestabilidad de los extractos o sustancias, haciendo alterar, también, el principio de la especificidad.

La definición clásica de Espectrofotometría considera que es la medición de la absorción de radiaciones electromagnéticas de longitud de onda definida y estrecha, cercana a la radiación monocromática, producida por sustancias químicas. Su ampliación y aplicación al análisis cualitativo y cuantitativo, teniendo en cuenta los dos tipos de absorción espectral, característica y no característica, haría definir la Espectrofotometría, como la absorción espectral de una sustancia o soluto a determinada longitud de onda, específica de la concentración y a veces característica de la composición o estructura química del soluto.

Sistema de patrones.— En todo tipo de análisis son necesarios los tipos de referencia o patrones de comparación. Dos son los tipos o formas de patrones principales: 1º) La sustancia química pura, standard internacional etc. para las sustancias, con o sin absorción característica, sin extraer o no interferidas; 2º) El extracto purificado, mediante la técnica que se va a emplear en las respectivas determinaciones.

Este segundo tipo proporciona, sin duda, patrones más reales que aquéllos que generalmente se usan en el análisis bioquímico. Se ha comprobado, tanto en el análisis colorimétrico en la zona visible, cuanto en la zona invisible o ultraviolada, enormes diferencias con los patrones químicamente puros o standard internacional, deduciendo que no deben ni pueden tomarse como tales, si se quiere hacer análisis que se aproximen a la realidad.

Los análisis en líquidos biológicos que se efectuaron con espectrofotómetro. se refirieron a patrones constituídos por "pools" obtenidos con la misma técnica que se empleó para la muestra desconocida; solo así se consiguió más exactitud y pueden hacerse pruebas de recuperación.

Obtenido el "pool" de las respectivas sustancias, fue necesario casi siempre purificarlo o controlar por lo menos su com-

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

posición, comprobando por medios químicos o físico-químicos, que está puro o si contiene sustancias extrañas.

Son dos los procedimientos usados para tal fin, que han dado resultados bastante satisfactorios: 1º) Luego de obtener el extracto, se hacen diluciones de peso conocido y se lleva al espectrofotómetro o se desarrolla la técnica colorimétrica o volumétrica, etc. Estas operaciones dan cifras; luego se purifica más hasta llegar a establecer un máximo de pureza controlada por el peso y la absorción espectral y por la relación C/L = K. encontrando cifras para k menores cada vez y más constante entre una y otra purificación. Esto es fácil de realizar si se tiene un extracto abundante y pueden hacerse varias pesadas sucesivas. 2º) Cuando no se tiene la posibilidad de obtener abundante extracto, solo se llega a estado de pureza con determinada dilución, controlada por la respectiva absorción espectral u otro método conveniente; entonces lo que se controla es la solución y no el peso de los extractos y al final lo que se pesa es el extracto a peso constante de esa solución y por una vez.

Selección de la longitud de onda.— Existen diferentes sustancias, desde el punto de vista de su absorción en diferentes bandas o longitudes de onda. En la zona ultraviolada se absorben algunas, independiente de la concentración, entre 220 y 250 milimicrones; otras entre 250 y 270 y finalmente unas entre 270 y 300. Estas delimitaciones, desde luego, no son rígidas.

Las apreciaciones se hacen, como en los casos conocidos, en diferntes solventes, a través de todo el dial de la densidad óptica o eje de trasmisiones de 0 a 100 y de todas las longitudes de onda, encontrando el medio ideal o solvente aparente.

Para seleccionar la banda adecuada se toman las indicaciones siguientes: 1º) Se observa casos en que dos o tres longitudes de onda continuas, la absorción permanece inalterada, para después ofrecer grandes saltos. Estos puntos que pueden llamarse conjugados, son efectivamente un medio de orientación, para después comprobar la proporcionalidad, linearidad o la especificidad requerida. 2º) La absorción varía en cantidades constantes de una a otra banda o longitud de onda, pero de pronto este ritmo se rompe y comienzan, como en el caso anterior, los grandes saltos.

Absorción espectral no característica.— Las sustancias que solo registran absorción y que al inscribir las cifras en el sistema de coordenadas se presentan en líneas paralelas, cuando se varía la concentración, es teórica y prácticamente imposible la determinación cualitativa.

Para estos casos de sustancias imposibles de identificar, puesto que no registran picos de máxima o mínima absorción (que suelen ser características de la composición química), cabe la posibilidad de identificarlas o determinarlas cualitativamente, teniendo presente que la longitud de la onda de la última parte, donde la banda de absorción desaparece, es característica del material absorbente.

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

Experimentalmente se ha comprobado esta aseveración, determinando las respectivas absorciones en diferentes longitudes de onda de una serie de sustancias químicas puras, cuya absorción no característica, imposibilita con los medios comunes conocidos, su identificación; tal sucede con la Metionina y Acido Pantoténico.

Este concepto es importante, además, para los casos de mezclas o para comprobar la pureza de una substancia, como podría verse por la longitud de onda característica; así si existe un compuesto cuya banda de absorción al estado puro desaparece a los 300 milimicrones y cuando está impurificada o mezclada con otra, su banda desaparece a los 320 mu, se puede concluír que dicha sustancia, según el análisis espectral, es impura.

Absorción espectral no característica y análisis bioquímico.— Las sustancias o especies químicas en líquidos biológicos, pierden parcial o totalmente sus características espectrales. Al extraérseles y purificarse aún con solventes muy específicos o investigarlas directamente en el líquido respectivo, ofrecen alteraciones de órden físico-químico que no es posible encontrar cuando se hallan en estado de pureza.

Al hacer la aplicación del método espectral en la región ultraviolada, pueden presentarse los casos siguientes:

1º) Sustancias que poseen absorción espectral característica, interrumpidas o interferidas por otras no identificadas o extrañas, etc., pero que no están en la concentración suficiente como para eliminar los "picos" o líneas características de la primera. En este caso, puede perfectamente leerse la absorción en la longitud de onda determinada y hacer el análisis cuali-cuantitativo respectivo.

2º) La sustancia de absorción característica, se halla interferida o interrumpida por otras extrañas, con la suficiente absorción como para no permitir ver las líneas características. Entonces, debe purificiarse y apreciar la absorción total y después del estudio respectivo, elegir o seleccionar la banda aparente.

3º) Las sustancias de absorción no característica, al estado puro, puede estar o no interferidas; se le purifica y después se aprecia la absorción total. Estos dos últimos casos se presentan ante el análisis espectral, prácticamente con las mismas características y son los más comunes.

El análisis bioquímico de líquidos biológicos con el espectrofotómetro, ofrece generalmente estos últimos casos, es decir, absorción espectral no característica.

MICROESPECTROFOTOMETRIA CUANTITATIVA DE HORMONAS Y ESTEROIDES HORMONALES DE LA ORINA

Es fundamental conocer los métodos de extracción y partición de las fracciones esteroidales en líquidos biológicos, como la orina, pero es necesario describir antes ciertas características

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

y los pasos más importantes para obtener un extracto apto para la apreciación espectrofotométrica.

Los esteroides no se encuentran totalmente libres en los líquidos biológicos, por tanto, los sistemas de extracción deben contemplar el estado molecular, así como las propiedades físico-químicas comunes, que son factor importante para deducir dichas técnicas. Las diferencias existentes entre los procedimientos de extracción, generalmente se refieren a los solventes, adaptables unos más que otros. Cuando se trata de apreciaciones en el espectro, se debe cuidar de no usar los de gran absorción, sobre todo en la parte final.

La extracción puede ser simultánea o posterior a la hidrólisis y depende, desde luego, de la naturaleza del solvente, de las propiedades de los esteroides que se investigan y de la clase de líquido biológico. Referente a la cantidad de muestra, cada autor la hace variar, de acuerdo con su experiencia y sensibilidad de la técnica que usa. En cualquier caso y desde todo punto de vista, se aconseja disponer de procedimientos que proporcionen extractos puros, sobre todo si se desea normalizar la técnica, y en segundo lugar que permitan realizar las pruebas de recuperación. Finalmente, los procedimientos deben permitir manipular cantidades mayores de muestras para formar los "pools", con los cuales se harán también las pruebas de recuperación.

MICRO DETERMINACION ESPECTRAL CUANTITATIVA DE ESTROGENOS TOTALES EN ORINA Y ENSAYO DE PARTICION DE ESTRIOL DE LA FRACCION ESTRONA-ESTRADIOL

Los estrógenos que se investigan en la orina para determinación cuantitativa desde el punto de vista biológico analítico y clínico son, generalmente, estradiol, estrona y estriol.

Las técnicas propuestas los determinan total o parcialmente, tomando como patrón de comparación, casi siempre, la estrona o el estradiol químicamente puro o patrones internacionales. Al valorar total o parcialmente los estrógenos, los patrones de la orina, fueron "pools" propios, usando las mismas técnicas adaptadas para la extracción de la muestra.

Se recomienda usar los "pools" o extractos purificados propios, partiendo de los auténticos productos elaborados por el organismo, para poder controlar, mediante pesada directa, las cifras normales o patológicas, previa comprobación de la pureza del extracto por espectrofotometría, fotometría, colorimetría u otros procedimientos analíticos de valoración.

Extracción de los estrógenos de la orina.— Se realizó siguiendo tres técnicas. La primera consta de las siguientes partes:

1.— Reunión de la orina durante 24 horas.
2.— Hidrólisis ácida con ácidos fosfotúnsgtico y clorhídrico.
3.— Extracción.

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

4.— Lavado y recolección de los extractos.
5.— Purificación.
6.— Evaporación.
7.— Dilución para la titulación.

Este procedimiento se aplica cuando las orinas tienen menos de 1,000 gammas de estrógenos por litro. Se trabajó con orina de 24 horas; no fué necesario usar conservadores, bastando simplemente con guardar la orina en frío.

Para la hidrólisis se toma 10, 20, o 30 cc. de orina que solo hará variar el factor final en los cálculos respectivos.

Se añade 1.5 cc. de HCl concentrado y 0.2 de ácido fosfotúngstico al 10% por cada 10 cc. de orina.

Se lleva a ebullición y a reflujo por una hora.

Se refrigera con corriente de agua y se coloca en hielo una o dos horas. El precipitado formado (impurezas y substancias interferentes) se filtra y lava con 5 o 10 cc. de agua destilada, que se añade al filtrado. Para la extracción se coloca el filtrado en un embudo de decantación; se trata con 30 ml. de éter en forma fraccionada. Se hizo tres extracciones de 30 ml. cada una.

Se lavó dos veces la fase etérea con 15 cc. de solución de carbonato de sodio al 9% cada vez.

Se llevaron las soluciones acuosas alcalinas a pH 6 con HCl concentrado, primero, y diluído después, usando papel indicador universal. Salter Hum y Oesterling emplean el rojo-congo como indicador.

Se agregó bicarbonato de sodio para tamponear el pH a 8.5. Para purificar se extraen las porciones acuosas alcalinas, con éter sulfúrico, 30 cc. en cuatro fracciones.

Se lavan las fases etéreas dos veces con solución de carbonato de sodio al 10% y dos veces con 15 cc. de agua destilada. Por evaporación en Baño María se dejan secar las soluciones etéreas.

Dilución para titular.— Se disuelve el extracto en 1 cc. de alcohol de 95° o también llevando a 10 cc. la primera dilución y tomando 1 cc. para 5 cc. en la segunda. En esta última solución alcohólica, se hace la apreciación espectrofotométrica.

Se hace hidrólisis clorhídrica con orinas que provienen del cuarto mes de embarazo y que contienen más de 1.000 gammas por litro de estrógenos. La recolección se hace siguiendo el procedimiento anterior. La hidrólisis se efectuó con 1,5 ml. de HCl concentrado 37% por cada 10 ml. de orina problema y se sigue iguales pasos que para la hidrólisis anterior. Las operaciones siguientes fueron exactamente las mismas para ambos casos de hidrólisis.

El tercer procedimiento comienza con hidrólisis clorhídrica, como se efectúa para extraer 17 cetoesteroides.

El procedimiento que se sigue es el siguiente:

a) Extracción: Luego de la hidrólisis ácida, se extrae con éter sulfúrico tres veces, con porciones de 30 ml. cada vez.

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

b) Los extractos etéreos se reunen y se lavan tres veces con porciones de 10 ml. de NaOH al 10% cada vez.

c) Los extractos acuosos alcalinos se reunen y se les cambia de medio, mediante ácido clorhídrico diluído al 50% (el pH se determina con rojo congo) y se extraen nuevamente con éter sulfúrico, tres veces consecutivas, con 30 ml. cada vez.

d) Los extractos etéreos se reunen y evaporan, pudiéndoseles purificar según el primer procedimiento.

Las operaciones siguientes son las mismas que con la primera técnica, llegando a obtener la solución alcohólica para la apreciación. Este procedimiento de extracción de los extrógenos totales, da extracto bastante puro y por su rapidez y facilidad de hacer al mismo tiempo la determinación de los 17 cetoesteroides, resulta muy conveniente.

Los tres procedimientos necesitan tres patrones o extractos purificados diferentes, que resulta fácil obtener siguiendo el mismo procedimiento que los antecede.

Con ellos se estudian espectralmente sus características y se calcula la concentración.

Obtención de los patrones.— Usando el método primero de extracción de estrógenos, se manipula de 500 a 1,000 cc. de orina de mujer en gestación, sobre todo dentro del trimestre de mayor concentración.

Para estas operaciones se usan exactamente los mismos reactivos y se tienen en cuenta las indicaciones ya formuladas. Obtenido el extracto y purificado por el sistema expuesto, la substancias se presenta blanca, untuosa al tacto de aspecto graso, olor sui géneris, prácticamente incolora. Con ella pueden hacerse las diluciones respectivas para encontrar:

1.— La concentración ideal para las apreciaciones.

2.— La longitud de onda en que debe hacerse la apreciación.

3.— El factor, coeficiente de absorción o de extinción, primero por 1 cc. de solución alcohólica final, en donde se hace la apreciación y luego por cc. de orina. Este factor servirá para el cálculo final en la cantidad de orina en 24 horas.

Ensayo de partición de estriol de la fracción estrona-estradiol.— Para valorar la porción estradiol de los estrógenos totales, seguí el procedimiento de Bachman y Pettit (5).

El procedimiento comienza con hidrólisis de la orina con ácido clorhídrico, sigue con la extracción de las diferentes porciones esteroides, mediante los solventes selectivos y termina con la determinación de los estrógenos por diferentes vías, sea química o biológica.

Se ha usado para la extracción de estrógenos totales la técnica de M.F. Jayle y O. Crepy (27-28-29) con algunas modificaciones. El procedimento de Bachman y Pettit se sigue a partir de la separación del estriol, haciendo a partir del extracto de estrógenos totales una solución bencénica, que se disuelve previamente en pequeña cantidad de alcohol absoluto. El procedimiento es como sigue:

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

1.— Lavar tres veces la solución bencénica con pequeñas porciones de 20 cc. de solución de carbonato de sodio anhidro al 9% y una vez con agua destilada.

2.— Los extractos acuosos alcalinos se separan y se acidifican con HCl hasta pH 6 o menos y se extraen con éter por lo menos unas tres veces con 30 cc. de éter.

3.— Se lavan los extractos etéreos con una solución de bicarbonato de sodio al 9% y luego se evapora hasta sequedad el éter. Se puede purificar la porción extractiva, haciendo la solución bencénica y lavando con bicarbonato al 9% y luego con agua destilada, evaporando nuevamente.

4.— El extracto purificado se disuelve en 1 cc. de alcohol y de él se toma una décima (0. 1 cc.) y diluye a 5 cc., con esta cantidad se realiza la apreciación espectrofotométrica.

Este procedimiento rinde por lo menos el 50%, según Bachman y Pettit, de la porción estriol.

5.— La solución bencénica restante contiene la estrona y el estradiol. Se le purifica lavando una vez la solución con ácido sulfúrico al 45% y luego con agua dos veces.

6.— Extraer con soda normal, por lo menos cuatro veces, con 30 cc. quedando así la solución bencénica libre; luego a la solución acuosa alcalina cambiar el pH con ácido clorhídrico y volver a tomar con benceno los extrógenos para lavarlos y repurificarlos, si se quiere nuevamente con ácido sulfúrico al 45% y luego con carbonato de sodio al 9% dos veces.

La solución evaporada de benceno, proporciona la fracción estrona-estradiol prácticamente pura. Este extracto se disuelve en alcohol y está listo para la apreciación en el espectrofotómetro.

Nota.— Los tres estrógenos principales, tienen prácticamente las mismas absorciones espectrales y al estado puro igualmente tienen muy cercanas su absorción máxima, siendo por esto muy difícil hacer una separación por este procedimiento.

El factor que se encontró con los estrógenos totales, puede emplearse para las otras porciones. El error es despreciable y en clínica con mayor razón, no siendo necesario encontrar nuevos factores, a menos que el operador lo crea conveniente.

Se exponen a continuación los resultados obtenidos:

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

CURVAS DE ABS. ESPEC. DEL POOL DE ESTROGENOS

SOLV. $C_2 H_5 OH$ 95° GL
CONC. 5γ x c.c.
10γ x c.c.
15γ x c.c.
20γ x c.c.
25γ x c.c.

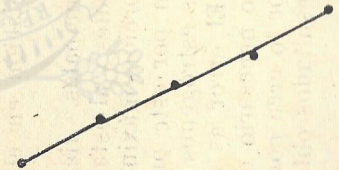
240 250 260 270 280 290 300
Mμ (LONG. DE ONDA)

CURVA DEL POOL A 260 Mμ

$\frac{c}{L} = K = 0.0001$

$$\frac{\text{LECT.} \times 0.0001 \times 5 \times 10 \times \text{Nº c.c. ORINA 24 H.}}{30 \text{ LECT.} \times 166 \text{ (FACT)}} = \frac{\text{MG. EST.} \times 24 \text{ H.}}{\text{MG. EST. } 24 \text{ H.}}$$

$$\frac{\text{LECTURA} \times 0.0001 \times 5 \times 10 \times \text{Nº c.c. ORINA 24 H.}}{10 \text{ LECT.} \times 500 \text{ (FACTOR)}} = \frac{\text{MG. EST.} \times 24 \text{ H.}}{\text{MG. EST. } 24 \text{ H.}}$$



5 10 15 20 25 30
CONC. γ x c.c.

ESTROGENOS

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

ESTROGENURIA EN EMBARAZADAS APARENTEMENTE SANAS

No.	Nombre	Raza	Edad	Meses Embarazo	Diuresis en 24 horas	Estrogenos Gammas/ 1000 cc.
1	F.M.O.	Mestiza	19	2	1,300	437
2	O.L.B.	Indígena	43	2,5	1,500	188
3	C.C.B.	"	33	2,5	1,800	530
4	A.L.G.	Mestiza	25	2,5	1,000	587
5	P.O.R.	"	23	3	1,500	600
6	T.P.A.	"	28	3	1,750	1,300
7	C.R.B.	Indígena	38	3	1,600	2,500
8	F.R.C.	Mestiza	27	3,5	1,800	5,180
9	R.R.A.	Indígena	26	4,5	1,500	5,700
10	M.M.A.	"	27	5	1,400	6.260
11	F.C.R.	Mestiza	30	5,5	2.000	6.819
12	J.N.P.	"	22	7	1.550	6.560
13	A.C.G.	Indígena	29	8	1.670	9.540
14	M.B.O.	"	31	8.5	1.800	9.880
15	J.T.F.	Blanca	27	8.5	1.700	10.330
16	P.A.M.	Indígena	19	8.5	1.900	10.570
17	A.M.R.	Blanca	25	9	1,650	10.050
18	M.C.R.	"	20	9	850	10.560
19	F.M.P.	"	27	9	880	10.850
20	N.O.C.	"	23	9	850	11.510
21	F.A.C.	"	22	9	1.500	11.600
22	A.S.S.	"	28	9	1.000	11.800
23	A.M.A.	"	30	9	600	12.500
24	C.P.S.	"	25	9	980	12.500
25	R.G.L.	"	20	9	800	12.600

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

ESTROGENURIA EN HIPEREMESIS GRAVIDICA

No.	Nombre	Raza	Edad	Meses Embarazo	Diuresis en 24 horas	Estrogenos Gammas/ 24 horas
1	A.P.S.	Indígena	30	1,5	1.400	140
2	C.G.P.	Blanca	28	1,5	1.500	280
3	N.O.P.	Mestiza	32	1,5	1.600	210
4	O.P.R.	"	30	1,5	1.800	350
5	A.P.R.	Indígena	31	1,5	1.700	430
6	N.O.R.	Mestiza	28	2	1.400	80
7	A.A.R.	"	28	2	1,750	130
8	O.L.J.	"	28	2	1.400	140
9	C.P.S.	Indígena	32	2	1.675	320
10	N.R.P.	Blanca	26	2	2.000	530
11	P.R.N.	Mestiza	37	2	1.500	1.240
12	C.P.S.	Indígena	26	2	1.100	1.460
13	A.P.S.	Mestiza	30	2,5	800	110
14	L.L.O.	"	30	2,5	1.500	130
15	N.O.R.	"	19	2,5	1.500	160
16	C.C.B.	Blanca	30	2,5	1.500	260
17	F.R.G.	Mestiza	22	2,5	1.650	280
18	A.B.V.	"	40	2,5	2.500	1.950
19	C.R.A.	"	34	2,5	800	2,500
20	B.B.O.	"	38	3	550	240
21	N.Z.A.	Indígena	29	3	1,490	282
22	A.C.R.	Blanca	20	3	1.600	380
23	R.B.O.	Mestiza	21	3	800	400
24	A.R.A.	"	25	3	2.000	540
25	M.R.P.	"	28	3	2.500	1.500

ESTROGENURIA EN PRE-ECLAMPSIA

No.	Nombre	Raza	Edad	Meses Embarazo	Diuresis en 24 horas	Estrogenos Gammas/ 24 horas
1	A.O.R.	Mestiza	32	8	800	310
2	M.D.O.	Blanca	25	8,5	1.000	190
3	C.F.J.	Mestiza	28	8,5	1.800	300
4	F.C.R.	"	31	8,5	1.600	360
5	R.V.R.	"	20	9	1,500	180
6	N.R.S.	"	26	9	1.000	210
7	L.A.P.	Indígena	28	9	950	290
8	A.S.S.	Mestiza	30	9	900	300
9	R.A.C.	Blanca	23	9	1.500	310
10	C.P.S.	Mestiza	25	9	1.600	400

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

ESTROGENURIA EN ECLAMPTICAS

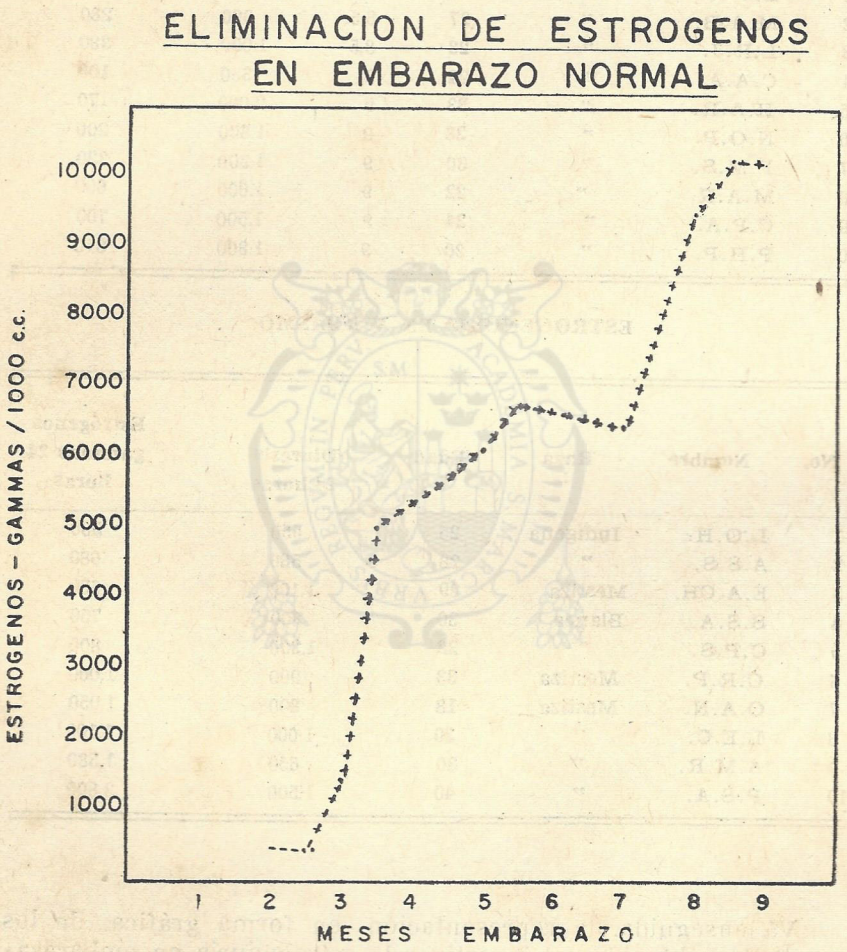
No.	Nombre	Raza	Edad	Meses Embarazo	Diuresis en 24 horas	Estrogenos Gammas/ 24 horas
1	Z.V.R.	Mestiza	23	8,5	1.500	260
2	M.A.B.	"	27	8,5	900	280
3	L.R.J.	"	28	8,5	1.000	380
4	C.A.A.	"	24	9	350	100
5	H.A.R.	"	33	9	2.000	170
6	N.O.P.	"	28	9	1.800	200
7	F.M.S.	"	30	9	1.900	320
8	M.A.R.	"	22	9	1.600	600
9	C.P.A.	"	24	9	1.500	700
10	P.H.P.	"	20	9	1.800	810

ESTROGENURIA EN VIRILISMO

No.	Nombre	Raza	Edad	Diuresis 24 horas	Estrógenos gammas 24 horas
1	L.O.H.	Indígena	25	550	560
2	A.S.S.	"	28	580	680
3	E.A.CH.	Mestiza	29	1.100	680
4	S.S.A.	Blanca	30	800	750
5	C.P.S.	"	38	1.200	800
6	C.R.P.	Mestiza	33	900	1,000
7	O.A.N.	Mestiza	18	800	1,050
8	L.E.C.	"	30	1.000	1.100
9	A.M.R.	"	30	650	1.580
10	P.S.A.	"	40	1.500	3.800

Vá enseguida, la representación, en forma gráfica, de los resultados obtenidos al investigar la estrogenuria en embarazadas aparentemente sanas, con hiperemesis gravídica. preeclampsia, eclampsia y virilismo.

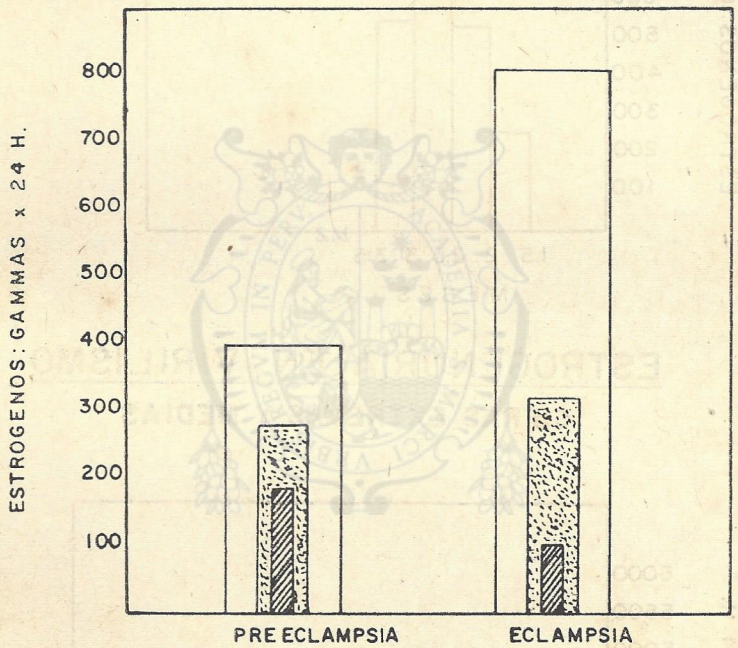
Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

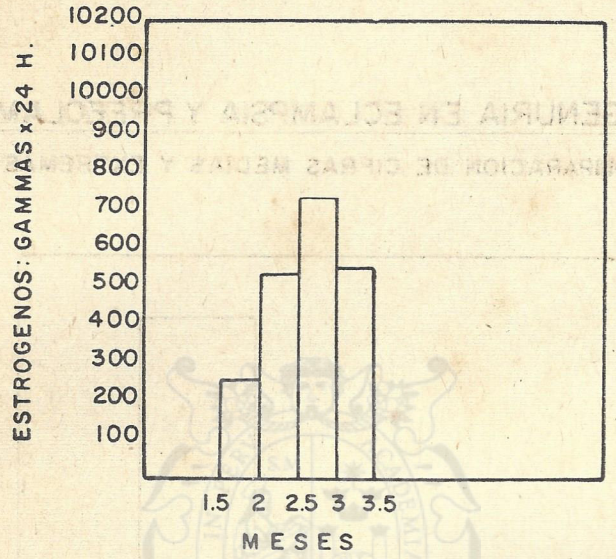
ESTROGENURIA EN ECLAMPSIA Y PREECLAMPSIA

COMPARACION DE CIFRAS MEDIAS Y EXTREMAS



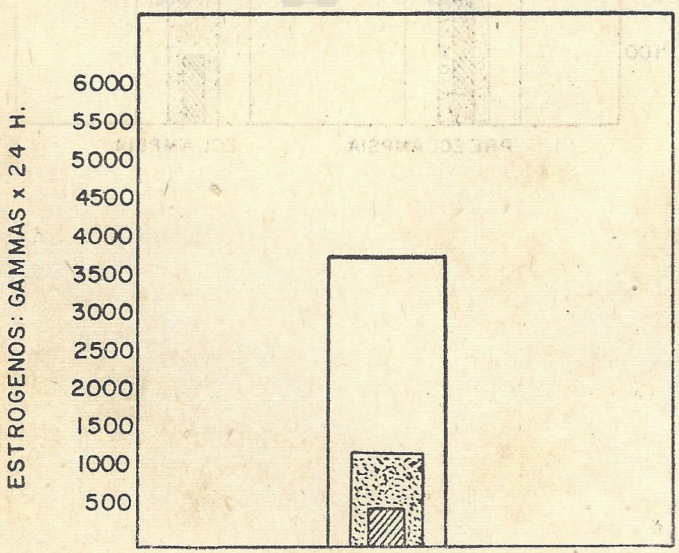
Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú, Decana de América

ESTROGENURIA EN HIPEREMESIS GRAVIDICA



ESTROGENURIA EN VIRILISMO

CIFRAS EXTREMAS Y MEDIAS



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

MICRODETERMINACION ESPECTRAL DE 17 HIDROXICORTICOESTEROIDES URINARIOS

De la corteza suprarrenal, se ha aislado, dice Armando Novelli (39) treinta esteroides cristalizados, de los cuales cinco se han encontrado en otros órganos.

Los esteroides obtenidos se reunen en tres grupos: Derivados del Allopregnano en C^{21}; derivados del 4 Pregneno en C^{21} y, por último, del 4 Androsteno en C^{19}. Sólo seis derivados del 4 Pregneno tienen actividad funcional y difieren por la presencia o no de oxígeno en C-11 y C-17. Es típico en todos una cadena lateral alfa-ketol (CO-CH_2OH) unida al C-17 y el grupo carbónico C-3 conjugado con doble enlace, característico de la progesterona y testosterona.

La estructura de estos compuestos la aclaró T. Reichstein (51 y 52). Los métodos de valoración de los 17 OH. C. S. son colorimétricos, basados en la reacción con fenilhidrazina sulfúrica, denominada de Porter-Silber (44). Las reacciones colorimétricas más recomendadas para la determinación cuantitativa, las sugirió Smith, Mellinger y Patti (50) y perfeccionaron Reddy, Jenkins y Thorn (47).

La técnica de extracción de los 17 OH.C.S. de la orina, procura obtener un extracto puro, exento de otras fracciones a fin de hacer más nítidas, tanto las reacciones colorimétricas como las apreciaciones espectrofotométricas en la zona ultraviolada. La extracción se hace usando el butanol como solvente, aunque también se emplea cloroformo.

La purificación debe hacerse con solventes apropiados para no alterar la integridad molecular de los 17 OH.C.S. bastante lábiles a las manipulaciones químicas.

El procedimiento de Smith, Mellinger y Patti (58) consta de las siguientes etapas:

1.— **Recolección.**— Orina de 24 horas, que se guarda en refrigeradora.

2.— **Toma de la muestra.**— Medir 10, 20 o 30 ml. de orina filtrada en papel duro; esta cantidad varía según el volumen de la micción o mejor de la concentración de los elementos. Una cifra adecuada y promedio es 20 ml. de orina.

3.— **Desproteinización.**— Con Kaolin activado 1, 5 g. más o menos con HCl concentrado (usar Adsormon) a pH 4 a 4, 5, conseguido con ácido acético.

Mezclar bien, pero suavamente y luego se separa por filtración o mejor por centrifugación a 1,500 r.p.m.

4.— **Extracción.**— La orina libre del Kaolin, se lleva a pH 1 con ácido sufúrico al 50 % y enseguida se procede a la extracción con alcohol butílico puro. Los extractos alcohólicos fraccionados, deben sumar la cantidad de orina que se trata, es decir, si se toma 20 cc. de orina, las dos o tres extracciones que se efectúan con el alcohol butílico normal deben sumar 20 cc.

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

5.— **Purificación.**— El extracto obtenido 1 a 1 se le deseca, primeramente con sulfato de sodio anhidro (1 gr. es suficiente) y después se le trata con carbonato de soda anhidro (0.5 gr. es suficiente). Se filtra finalmente, decanta o se lleva a centrifuga para separar el líquido alcohólico.

6.— **Apreciación.**— Sobre la solución butanólica de los Hidroxicorticoides, puede hacerse la apreciación espectrofotométrica, pero resulta muy concentrada; generalmente se opta por hacer una dilución de 0,1 (1 décima) para 5 cc. de alcohol N. butílico puro, usando como blanco el mismo alcohol puro.

Otros ensayos de purificación.— Se trató de purificar aún más el extracto obtenido anteriormente, con el fin de preparar el "pool" de Hidroxicorticoides lo más puro posible.

Ensayo A.— Se avaporó al vacío el extracto butanólico y se le extrajo con cloroformo normal. Los resultados fueron bastante satisfactorios (aproximadamente 5%).

Ensayo B.— Comenzó inmediatamente después de tomar la muestra de orina, que se desproteiniza después de absorción con Kaolin activado o Adsormon, que resulta incompleta, por lo cual debe tratársele con solución Clorhídrica de ácido fosfotúngstico.

La extracción de los 17 OH. C.S. continúa exactamente hasta el tratamiento con carbonato de sodio anhidro. A partir de aquí, se sigue la purificación como en el ensayo A para obtener el "pool". Esta última operación se repitió dos veces más.

Los resultados fueron satisfactorios, en términos de peso y absorción (aproximadamente 10%).

Extracción y purificación del "pool" de 17 Hidroxicorticoides.— Con la técnica descrita se llegó a obtener un extracto de color marrón, de fuerte olor desagradable y sui géneris. Se hicieron varias diluciones de este extracto, para observar y estudiar detenidamente sus características de absorción a la luz ultraviolada.

Con este extracto se practicó la reacción de Porter-Silber con clorhidrato de fenilhidrazina sulfúrica, comprobándose fuertes variaciones que no correspondían a los porcentajes tomados de 17 O H C S. del extracto. En cambio, las absorciones espectrales de esas diluciones marcharon paralelamente y podían interpolarse y dar cifras exactas. Se hicieron diferentes gráficas, escogiéndose la banda de absorción, no característica.

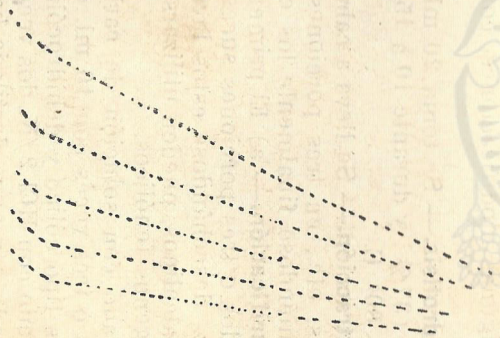
MICRODETERMINACION ESPECTRAL CUANTITATIVA DE CETOESTEROIDES ANDROGENOS URINARIOS, POR ABSORCION ULTRAVIOLADA

En el Perú determinó cuantitativamente 17 cetoesteroides neutros y las fracciones alfa y beta, Luz Azabache Aguilar (2) empleando la reacción colorimétrica de Zimmerman con el metadinitro-benceno, siendo Gladys Oliva (40) la primera que en el Perú llevó a cabo dicha investigación. Patterson y Pincus usan

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

CURVA DE ABS. ESP. DEL POOL DE 17 OH. CS

SOLVENTE – BUTANOL.- NORMAL
CONC. 0.05 γ x c.c.
0.10 γ x c.c.
0.15 γ x c.c.
0.20 γ x c.c.
0.25 γ x c.c.



260 270 280 290 300 310 320
Mμ (LONG. DE ONDA)

CURVA DEL POOL DE LOS 17 OH. CS A 270 Mμ

$\frac{c}{L} = K = 0.66$

$\frac{0.66 \times 5 \times 10}{10} = 33$

LECT. x 33 (FACTOR) = γ x c.c. DE ORINA

0.05 0.1 0.15 0.20 0.25 0.30 0.35
CONC. γ x c.c.

17 - OH - CORTICOIDES

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

el cromógeno que obtienen con ácido sulfúrico y tricloruro de estaño.

Se ha cuantificado 17 cetoesteroides urinarios por absorción espectral ultravioladá, con picos de máxima absorción, no obstante haber purificado mucho dichos extractos, con el fin de obtener mayor pureza de las especies químicas que constituyen la mezcla.

Las técnicas colorimétricas de valoración, frecuentemente tropiezan con la dificultad de la sensibilidad, cuando no alcanzan concentración por litro de material, sobre todo en ciertos estados patológicos.

Igualmente, las interferencias debidas a cromógenos, son factores que impiden la exactitud de los resultados. A esto se suma, como causa de error, el uso de reactivos muy delicados e inestables a la temperatura ambiente y el grado máximo de pureza constante que exige cada determinación colorimétrica.

Procedimientos de extracción de los 17 cetoesteroides neutros andrógenos urinarios.— Son bastante conocidos y los disolventes más comunmente usados para extraer los 17 C.S.N. de la orina son éter sulfúrico, tetracloruro de carbono, cloroformo, benceno, dioxano, etc. La extracción se hace en forma separada o simultánea con la hidrólisis ácida, variando en este caso el tipo de solvente.

La cantidad de muestra varía igualmente de una técnica a otra, habiéndose llegado hasta 1 litro. En la valoración espectrofotométrica, el volumen es 20 ml., pudiendo usarse cómodamente sin que dificulte la sensibilidad 10 ml.

Procedimiento de extracción.— La técnica de Dreckter (14), con algunas modificaciones, consta de las siguientes partes:

1.— **Hidrolisis.**— Se toma 20 ml. de la orina 6 ml. de HCl concentrado (37%) y durante 10 a 15 minutos se lleva a la temperatura de 80º C.

2.— **Extracción.**— Se lleva a cabo con éter sulfúrico exento de peróxidos, etc., en tres porciones sucesivas de 30 ml. cada una, reuniéndose finalmente los extractos etéreos.

3.— **Purificación.**— a) El primer lavado se efectúa con soda al 10% dos o tres porciones sucesivas de 10 ml. más o menos cada vez, desechándose estos lavados alcalinos. Los extractos acuosos alcalinos, pueden utilizarse cuando se trata de cuantificar estrógenos fenólicos.

b) Lavado con solución de carbonato de sodio saturada; también dos o tres veces con 10 ml. cada vez, con el fin de eliminar ácidos tipo cólico y dehidrocólico (biliares).

c) Lavado con HCl 2/N. dos veces o tres, 10 cc. cada vez, y

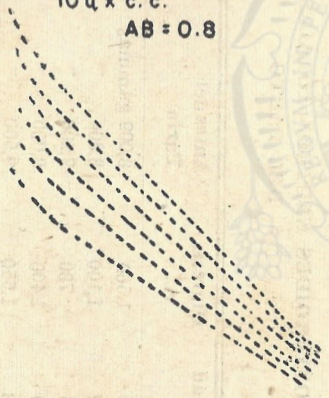
d) Lavado con agua destilada hasta reacción neutra al tornasol, siendo suficientes dos o tres veces.

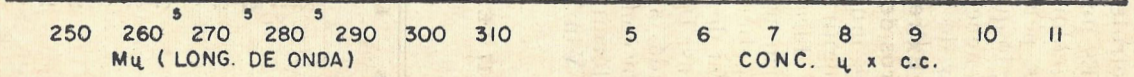
4.— **Secado.**— Los extractos etéreos así lavados consecutivamente se les seca con sulfato de sodio anhidro, siendo suficiente 1 gr.

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

CURVAS DE ABS. ESP. DE POOL DE LOS 17 - C.S. NEUTROS

SOLVEN. $C_2 H_5 OH$ 95° GL
CONC. = 5γ x c.c.
6γ x c.c.
7γ x c.c.
8γ x c.c.
9γ x c.c.
10γ x c.c.
AB = 0.8





CURVA DE LOS 17 C-S-N. A 275 Mμ

$\frac{C}{L} = K = 20$

$\frac{\text{LECT. x 20 x 10}}{20} = 10 = \text{FACTOR x 1 c.c. ORINA}$

17 - CETOSTEROIDES - NEUTROS

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

5.— Evaporación y preparación de la solución para la apreciación.— La evaporación se hace en un vaso de bohemia a 40º C. de temperatura máxima, hasta que quede seca completamente la solución; luego se disuelve el ligero precipitado en 10 ml. de alcohol corriente de 95º, quedando así lista la solución para la apreciación correspondiente en las celdas de sílice del Espectrofotómetro.

Es necsario anotar que el extracto final muchas veces resulta coloreado, con tinte rosado o violeta, debido a los cromógenos, pero no tiene influencia para el análisis espectrofotométrico, lo que no sucede con la determinación colorimétrica, donde sí es necesario la eliminación de cromógenos o un blanco para restar de las cantidades finales.

Extracción y purificación del "pool" de 17 cetoesteroides neutros de la orina.— Se trabaja 1 litro de orina o mezcla de varias muestras, con gran porcentaje en 17 C.S. con el fin de conseguir una mayor cantidad, que pueda fácilmente manipularse durante la purificación. Siguiendo el método descrito anteriormente, se procede a la purificación, haciendo hincapié en la repetición de la disolución en alcohol, filtración para la eliminación de residuos insolubles y por no menos tres veces consecutivas. De este extracto se estudió la absorción espectral ultravioleta, seleccionando la banda respectiva y obteniendo así el factor con una pesada conocida y una absorción también conocida a determinada longitud de onda.

Van enseguida los resultados que obtuve:

17 CETOSTEROIDES NEUTROS TOTALES ANTES Y DESPUES DEL PARTO

Casos	Edad	Diuresis cc.	Antes del Parto	Diuresis cc.	Después del Parto
1	23	1,560	8,009 gammas	1,450	5,210 gammas
2	27	1,100	8,906 "	1,400	8,150 "
3	25	780	9,200 "	1,500	7,319 "
4	20	1,400	9,000 "	1,900	6,000 "
5	18	1,550	9,500 "	1,950	7,500 "
6	30	800	9,550 "	1,450	5,880 "
7	22	1,600	9,900	2,000	6,750
8	35	1,280	10,011 "	1,620	7,026 "
9	29	1,700	10,100 "	1,550	9,800 "
10	28	1,810	10,200 "	1,150	6,500 "
11	28	900	10,250 "	1,500	7,550 "
12	34	2,000	10,300 "	1,600	6,820 "
13	25	800	10,500 "	1,500	9,218 "
14	27	1,500	10,500 "	1,810	9,100 "
15	18	1,000	10,500 "	1,700	6,500 "

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

Casos	Edad	Diuresis cc.	Antes del Parto	Diuresis cc.	Después del Parto
16	30	1,810	10,500 gammas	1,200	9,100 gammas
17	30	850	10,500 "	1,100	6,800 "
18	28	1,500	10,500 "	1,600	7,000 "
19	23	2,000	10,550 "	1,580	6,805 "
20	29	1,520	10,631 "	1,300	9,600 "
21	22	1,800	10,875 "	1,680	6,040 "
22	23	1,080	11,000 "	1,450	7,500 "
23	26	1,200	11,000 "	1,680	8,900 "
24	26	1,720	11,300 "	2,000	6,820 "
25	26	1,500	11,385 "	1,280	8,000 "
26	20	700	11,400 "	2,500	9,500 "
27	21	1,560	11,480 "	2,080	8,800 "
28	19	1,600	11,480 "	1,860	7,580 "
29	22	1,300	11,500 "	1,800	7,800 "
30	25	1,900	11,500 "	1,800	9,000 "
31	34	1,500	11,600 "	1,600	6,800 "
32	30	1,450	11,600 "	1,800	8,800 "
33	18	2,310	11,635 "	1,680	7,500 "
34	30	1,150	12,000 "	1,450	11,500 "
35	21	2,150	12,022 "	2,000	8,200 "
36	18	1,160	12,120 "	1,680	9,000 "
37	20	1,850	12,360 "	1,400	8,000 "
38	33	1,000	12,500 "	1,500	7,000 "
39	29	1,330	12,500 "	1,700	10,500 "
40	35	1,800	12,500 "	2,000	9,900 "
41	23	1,500	12,585 "	2,000	9,200 "
42	19	1,100	12,690 "	1,500	8,350 "
43	34	1,250	12,800 "	1,100	10,550 "
44	22	2,000	12,800 "	1,750	10,000 "
45	28	1,250	14,000 "	1,950	9,600 "
46	27	1,780	14,260 "	1,510	7,800 "
47	20	1,000	14,700 "	1,200	7,000 "
48	17	1,560	14,926 "	1,350	8,000 "
49	24	890	15,432 "	1,700	8,200 "
50	24	800	15,900 "	1,300	7,000 "

El análisis estadístico de los resultados, proporcionó las cifras siguientes:

	Media ± E. St.	Desv. St. ± E. St.	Coef. Varia.	Cifras extremas
Antes del Parto . .	11,52 ± 0,225	1,592 ± 0,159	13,81 %	8,009 - 15,900
Después del Parto .	8,12 ± 0,1914	1,354 ± 0,135	16,674 %	5,210 - 11,500

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

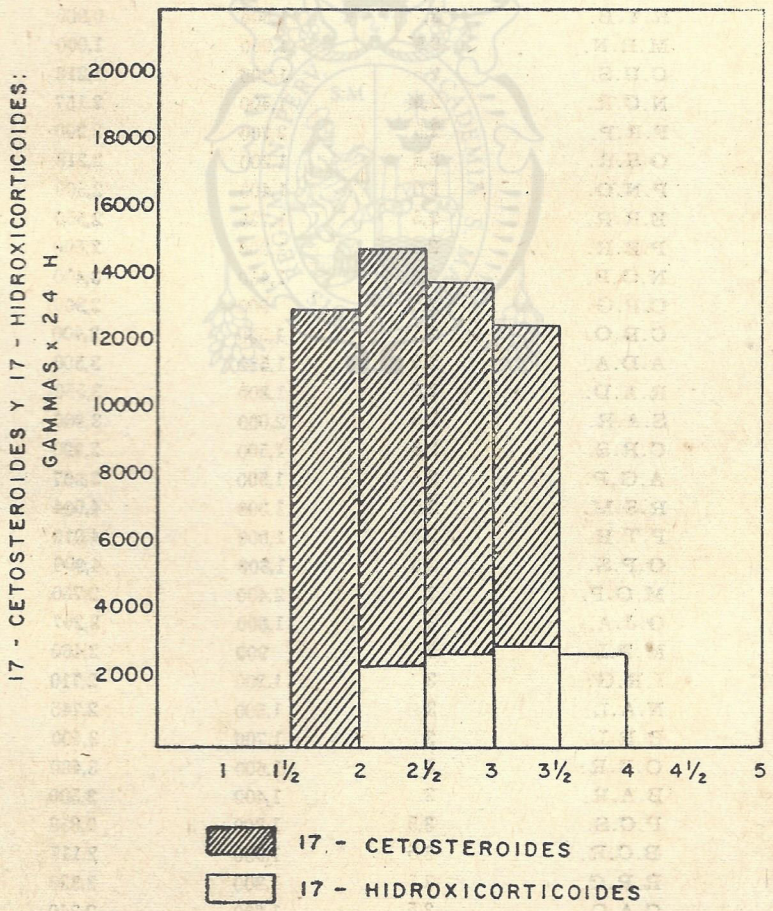
17 CETOESTEROIDES NEUTROS EN HIPEREMESIS GRAVIDICA

Caso No.	Nombre	Meses	Diuresis	Concentración mlgm.
1	C.P.O.	1,5	800 c.c.	8,6
2	H.A.B.	1,5	725	9,8
3	A.M.L.	1,5	100	9,8
4	H.V.C.	1,5	700	10,1
5	O.E.R.	1,5	1,880	10,1
6	E.D.A.	1,5	1,700	15,8
7	M.A.L.	1,5	1,000	17,3
8	B.S.R.	1,5	800	18
9	N.L.V.	1,5	2,000	20,5
10	A.P.S.	2	1,800	9,6
11	C.L.M.	2	1,000	10,7
12	P.N.L.	2	1,040	10,7
13	A.P.R.	2	1,750	10,8
14	P.R.E.	2	1,700	12,5
15	P.G.A.	2	1,000	12,6
16	H.S.L.	2	1,000	14,4
17	L.S.P.	2	1,350	14,9
18	C.D.A.	2	1,500	15,3
19	A.C.J.	2	1,800	15,3
20	R.M.A.	2	1,080	15,9
21	R.A.C.	2	1,500	16
22	A.B.C.	2	1,450	18
23	O.F.T.	2	1,000	19
24	A.C.L.	2	2,000	20
25	M.B.R.	2	1,550	20,9
26	O.P.R.	2,5	700	8
27	E.T.A.	2,5	900	9,1
28	O.P.R.	2,5	800	9,5
29	D.B.N.	2,5	650	10,5
30	D.M.A.	2,5	1,300	12,4
31	A.P.L.	2,5	1,040	12,4
32	G.T.P.	2,5	1,400	14,4
33	B.V.I.	2,5	1,720	16,1
34	M.O.C.	2,5	1,550	18
35	A.M.A.	2,5	1,850	18,2
36	P.B.P.	2,5	1,500	18,5
37	N.O.E.	2,5	1,200	19
38	S.O.S.	3	800	8,7
39	T.A.L.	3	1,650	8,7
40	M.G.L.	3	780	9,4
41	C.A.C.	3	1,580	9,8
42	B.R.D.	3	680	10,1
43	C.T.L.	3	880	10,6

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

Caso No.	Nombre	Meses	Diuresis	Concentración mlgm.
44	G.H.A.	3	1,300	12,2
45	R.O.V.	3	1,600	12,2
46	F.O.J.	3	1,200	13,8
47	J.A.P.	3	1,800	14,4
48	A.B.N.	3	1,225	16,5
49	T.V.A.	3	2,000	16,6
50	R.L.P.	3	1,600	18,4

17-CETOSTEROIDES Y 17-HIDROXICORTICOIDES EN HIPEREMESIS GRAVIDICA



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

17 HIDROXICORTICOIDES EN HIPEREMESIS GRAVIDICA

Caso No.	Nombre	Meses de Embarazo	Diuresis cc.	17-Hidroxicorticoides mg. en 24 horas
1	C.S.C.	2	1,800	1,322
2	L.V.F.	2	1,000	1,324
3	G.T.C.	2	1,700	1,500
4	N.R.C.	2	1,500	2,080
5	N.C.R.	2	1,000	2,101
6	R.V.P.	2	1,625	2,522
7	F.R.P.	2	1,450	2,575
8	A.R.C.	2	1,760	3,300
9	B.O.Y.	2	1,800	3,817
10	C.V.A.	2	1,500	3,905
11	L.B.C.	2	1,700	4,002
12	R.H.B.	2	1,500	4,020
13	M.F.P.	2,5	1,500	0,696
14	R.T.B.	2,5	1,600	0,985
15	M.R.N.	2,5	1,000	1,000
16	C.U.S.	2,5	1,200	1,218
17	N.C.R.	2,5	1,400	2,157
18	F.R.P.	2,5	2,700	2,200
19	O.S.R.	2,5	1,200	2,218
20	P.N.O.	2,5	1,400	2,500
21	E.R.R.	2,5	1,725	2,550
22	P.B.R.	2,5	1,200	2,600
23	N.O.P.	2,5	1,450	3,400
24	C.P.G.	2,5	900	2,900
25	C.B.O.	2,5	1,550	3,400
26	A.D.A.	2,5	1,550	3,500
27	R.A.D.	2,5	1,800	3,550
28	S.A.R.	2,5	2,000	3,860
29	C.R.S.	2,5	1,500	3,920
30	A.G.P.	2,5	1,500	3,967
31	R.S.M.	2,5	1,200	4,004
32	P.T.H.	2,5	1,800	4,012
33	O.P.S.	2,5	1,800	4,906
34	M.O.P.	3	2,400	2,700
35	O.J.A.	3	1,800	2,207
36	M.P.L.	3	900	2,460
37	I.R.G.	3	1,200	2,710
38	N.A.L.	3	1,500	2,745
39	R.R.L.	3	1,700	3,400
40	O.B.R.	3	1,600	3,480
41	B.A.R.	3	1,400	3,500
42	P.C.S.	3,5	1,800	0,858
43	B.C.R.	3,5	1,550	2,115
44	R.R.C.	3,5	1,800	2,320
45	C.A.O.	3,5	1,600	2,340

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

Caso No.	Nombre	Meses de Embarazo	Diuresis cc.	17-Hidroxicorticoides mg. en 24 horas
46	P.O.R.	3,5	1,500	2,570
47	C.P.A.	3,5	1,600	3,640
48	E.D.F.	3,5	1,100	3,650
49	C.B.A.	3,5	1,600	4,012
50	R.J.B.	3,5	1,420	4,410

DISCUSION

Un hecho fundamental. que muchas veces obliga al analista a desechar los métodos colorimétricos, es la falta de sensibilidad de las reacciones cromáticas, siendo necesario trabajar con grandes cantidades de material, que en muchos casos no es posible disponer; así, por ejemplo, al cuantificar estrógenos, 17 C.S.N.T. y 17 O H. C., existen estados patológicos en los que no se obtiene una cantidad de gammas por mil, suficiente para realizar la investigación cuantitativa por técnicas colorimétricos porque las reacciones no poseen suficiente sensibilidad, según expresión de Hawk, Osser y Summerson (22).

Otra razón, es la inespecificidad de las reacciones cromáticas. La Fenilhidrazina, la 2-4 Dinitrofenilhidrazina, en los 17 hidroxicorticoides; el metadinitrobenceno en medio alcalino, en los 17 Cetoesteroides neutros totales y androgénicos y el reactivo fenolsulfúrico en los estrógenos, por ejemplo, son excesivamente lábiles, sensibles a los agentes químicos y producen reacciones cromáticas secundarias, por la presencia de otras sustancias o metabolitos extraños y de cromógenos provenientes de la alimentación, que interfieren el color original.

Muchas modificaciones se han propuesto en las técnicas colorimétricas y todas permiten por diferentes artificios analíticos, eludir algunas de esas dificultades. El método espectral, en cambio, es general, no siendo necesario hacer cientos de apreciaciones para encontrar el factor colorimétrico; las técnicas de trabajo son standard y los patrones los fabrica el mismo operador si desea, usando el mismo método de extracción y apreciando el "pool" respectivo. Los factores puede emplearlos cualquier operador, siendo el error despreciable. En cambio, con el método colorimétrico, es necesario, en primer lugar, usar el mismo reactivo, los mismos solventes, ser acucioso en los tiempos de reacción y trabajar siempre exactamente igual.

En los diagramas presentados puede verse perfectamente, como a partir de 10, 20, o 30 cc. de orina se encuentran cifras de 0,1 a 10 gammas por cc. y que son suficientes para realizar el método espectral en la región ultraviolada. Los investigadores nacionales y extranjeros usan preferentemente para sus determinaciones, técnicas colorimétricas, empleando como patrones diferentes fracciones esteroides purificadas o sintéticas, químicamente puras, aunque la tendencia universal es el uso del "pool"

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

que recomiendo como el más conveniente. Las cifras encontradas permiten apreciar las cantidades extremas, los promedios y los coeficientes respectivos, así como el error standard de la media, dentro de las cifras estadísticas.

A continuación van las cifras encontradas por nacionales y extranjeros usando métodos colorimétricos, que servirán para una mejor apreciación de los resultados que proporciona la espectrofotometría.

Con técnica colorimétrica se han encontrado las cifras medias siguientes de estrógenos:

En preeclámpticas	272 gammas por 24 horas
En eclámpticas	416 gammas por 24 horas
En hiperemesis gravídica . .	545 gammas por 24 horas

En embarazadas aparentemente sanas desde 443 gammas para el primer mes, hasta 11.248 para el noveno mes por 1,000 cc. de orina.

Morante Miranda (36) y Nelly Rosales Pizarro (50) encontraron hidroxicorticoides en sujetos aparentemente sanos de 0,650 mg. a 4,020 mg.; la media fué de 2,335 mg.

Reddy, Jenkins y Thorn (47) empleando la técnica modificada por Reddy dan cifras de 1,10 a 10,7 mg. por 24 horas. Smith, Mellinger y Patti (58) dan cifras de 4 a 12 mg. por 24 hs. con media de 7.30, desviación standard ± 2,65 y error st. de la media de ± 0,68. Roman en el hombre encontró 5 mg. como media y 3,30 mg. en la mujer.

Los cetoesteroides neutros totales en casos de hiperemesis gravídica y antes y después del parto, no se investigaron, con técnicas colorimétricas en el Perú; sólo los cuantificaron con técnica espectrofotométrica Haydée Coloma (31) y Elma Naupary Mosquito (38).

CONCLUSIONES

1.— La absorción en el espectro de diversas substancias químicas es característica y no característica, pudiendo usárselas en espectrofotometría cuantitativa y cualitativa. Las leyes de Beer y Lambert, fundamento de la espectrofotometría, rigen igualmente en ambos tipos de absorción espectral.

2.— La absorción espectral sea característica o no, en determinadas longitudes de onda, es específica de la concentración. Esta especificidad respecto de la concentración permite realizar análisis cuantitativos aplicando las leyes fotométricas respectivas.

3.— Los estractos totales purificados o "pool" elaborados por los métodos de uso general, a partir de líquidos biológicos, no poseen generalmente absorción espectral característica, al igual que el extracto de una muestra obtenida por los mismos procedimientos. El "pool" puede servir de patrón en dichas de-

Universidad del Perú. Decana de América

terminaciones, más que la substancia pura o aislada y generalmente con absorción característica. En estos casos rigen los fundamentos y principios de la espectrofotometría de absorción no característica.

4.— Existen sustancias que no poseen absorción espectral característica, en tales casos se emplea la espectrofotometría de absorción no característica, como sucede con la Metionina y Acido Pantoténico, usando como patrones las mismas sustancias puras, standard o patrones internacionales.

5.— El estudio de las variaciones de la absorción espectral no característica de un extracto, sustancia pura o mezcla definida, permite deducir claramente las variaciones respectivas en su contenido.

6.— Se ha comprobado experimentalmente con diferentes sustancias químicamente puras, que la longitud de onda donde se extingue su banda de absorción, es característica de la composición o estructura química del soluto, haciendo posible su análisis o determinación cualitativa, usando absorción espectral no característica.

7.— Con la absorción espectral no característica en la región ultravioleta, se han determinado cuantitativamente estrógenos totales, 17 hidroxicorticoides y 17 cetoesteroides neutros en la orina.

8.— Se determinaron estrógenos totales en 25 embarazadas aparentemente sanas normales y 25 con hiperemesis gravídica: 10 con preelampsia; 10 con eclampsia y 10 con virilismo; 17 hidroxicorticoides en 50 casos con hiperemesis gravídica; 17 cetoesteroides neutros en 50 casos antes y después de parto y 50 con hiperemesis gravídica.

9.— Las cifras obtenidas en estas determinaciones se compararon con las obtenidas por colorimetría, encontrándolas muy similares.

BIBLIOGRAFIA

1.— Appleby J. and Colbs.— Analysis Corticosteroids.— Determination of the 17 Hidroxicorticoids.— Biochem, J. 1460.— London 1955.

2.— Azabache A. L.— Determination fraccionada de 17 Cetoesteroides neutros.— Tesis Bach. Fac. Farm. Bioq.— Lima 1953.

3.— Braga-Ubatuba F.— Valor actual des dosagem hormonais en Ginecología e Obstetricia.— Rev. Gynecol.— 98,203.— Río de Janciro 1955.

4.— Bates R. W.— Chemistry and Stimation of urinary oestrogen.— Ciba's Foundation Colloquia on Endocrinology.— 2,58.— London 1942.

5.— Bachman C. and Pettit D. S.— Photometric determination of estrogens.— J. Biol. Chem. 138, 889.— Baltimore 1941.

6.— Bernedo A. L.— Eliminación urinaria de Pregnandiol.— "La Crónica Médica".— 67, 73.— Lima 1950.

7.—Broyn J.H.B.— An imprevement of the Reddy method for determination of 17 Hidroxicorticoids in urine.— Metabolism.— 4,295.— 1955.

8.— Cruz Coke E.— Corteza suprarrenal.— Editorial Nascimento.— Santiago 1942.

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

9.— Colque M. C.— 17 Cetoesteroides neutros urinarios.— Sem. Med.— 102,287.— Buenos Aires 1953.

10.— Calderón D. J.— Determinación cuantitativa de Estrógenos en orina de mujer.— "La Crónica Médica".— 67, 59.— Lima 1950.

11.— Cáceres G. A.— Estrógenos y su rol protector.— Tesis Bach. Fac. Med.— Lima 1953.

12.— Cohen S., Marrian G. F. and Watson M. C.— Excretion of estrin female sex hormone.— Lancet.— 1,674.— London 1935.

13.— Corcoran A. C. and Page Irvine.— Method for the chemical determination of corticosteroids in urine and plasma.— J. Lab. and Clin. Med.— 33, 1326.— St. Louis 1943.

14.— Drekter I. J., Pearson S., Bertczak E. and Mac Gabac T. H.— A rapid method for the determination of total urinary 17 ketosteroids.— J. Clin. Endocr.— 7, 795.— Philadelphia 1947.

15.— De Giraude R. H.— Ensayos colorimétricos para la dosificación de la foliculina.— Arch. Farm. Bioquim. Tucumán.— 4,260.— 1948.

16.— Doughday and Colbs.— Chemical assay for cortin.— J. Clinic. Endocrinol.— 8, 166.— Philadelphia 1948.

17.— Emmens C. W.— Hormone Essay.— New York 1950.

18.— Fuentes F. O.— Determinación cuantitativa de estrógenos en orina de hombre normal y homosexual.— "La Crónica Médica".— 71, 197.— Lima 1954.

19.— Gomez Mont F.— Utilidad clínica de las dosificaciones de las hormonas.— Prens. Med. Mexicana.— 16,173.— 1951.

20.— Gribell Semahan E.— Estudio sobre dosificación de estrógenos.— Tesis de Químico-Farmacéutico.— 591.— Santiago de Chile 1949.

21.— Hamblen E. C.— Endocrinología de la mujer.— 214.— Buenos Aires 1950.

22.— Hawk P., Osser R. y Summerson W.— Química fisiológica práctica. 648.— México 1949.

23.— Herberh E. B. and Wolfe J. K.— A rapid extractor for urinary steroids.— J. Biol. Chem.— 133,667.— Baltimore 1940.

24.— Holtoff A. E. and Koch F. C.— The colorimetric estimation of 17 ketosteroids and their aplication to urine extractor.— J. Biol. Chem.— 135, 377.— Baltimore 1940.

25.— Hear R.H.D. and Sobel H.— A colorimetric method for the estimation of reducing steroids.— J. Biol. Chem.— 105,687.— Baltimore 1946.

26.— Ibáñez T. M.— Determinación cuantitativa de estrogenemia en la mujer aparentemente sana.— Tesis Bach. Fac. Far. Bioqui.— Lima 1955.

27.— Jayle M. F., Crepy O. et Judas O.— Dosaje des Phenolesteroides et de la Foliculine Urinaire.— Bull. Soc. Chim. Biol. 32,1067.— París 1950.

28.— Jayle M. F. et Crepy O.— Contribution au dosaje des phenolesteroides urinaires.— Bull. Soc. Chim. Biol.— 31,1952.— París 1949.

29.— Jayle M. E. and Crepy O.— Excretion and medid de urinary phenolesteroide.— Ciba's Foundation Colloquia en Endocrinology.— 2,84.— London 1952.

30.— Kober S.— Einekolorimetrische Bettisemmung des Brusthormones.— Bioch. Zeitsch.— 239,209.— Berlín 1931.

31.— Linares C. H.— Determinación de los 17 ceto-esteroides neutros en mujeres, antes y después del parto.— Tesis Bach. Fac. Far. Bioquim.— Lima 1955.

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

32.— León C. F.— Estrogenoterapia en la amenaza del aborto.— Tesis Bach. Fac. Med.— Lima 1953.

33.— Marrian G.— Estrin determination photoelectric.— J. Biol. Chem.— 139, 310.— Baltimore 1935.

34.— Marenzi A. D. y Bragger E. S.— Determinación de los cetosteroides totales y neutros de la orina.— Rev. Asoc. Bioquim. Argentina.— 73, 53.— Buenos Aires 1950.

35.— Medina J. C.— Nueva prueba para el diagnóstico del embarazo a base de tres inyecciones de estrona en aceite.— Tesis Bach. Fac. Med.— Lima 1949.

36.— Morante M. M.— El funcionamiento de la suprarrenal y la determinación de los 17 hidroxicorticosteroides en la orina.— Tesis Doctor Fac. Med.— Lima 1955.

37.— Naveda N. M.— Dosificación biológica de la hormona folicular en la orina.— Tesis Bach. Fac. Med.— Lima 1939.

38.— Naupary M. E.— Variaciones en la concentración de los 17 cetoesteroides neutros, urinarios totales, en gestantes con hiperemesis gravídica.— Tesis Bach. Fac. Far. Bioquím.— Lima 1956.

39.— Novelli A.— Química Orgánica.— 2, 78.— Buenos Aires 1954.

40.— Oliva G.— Determinación en la orina de 17 cetoesteroides neutros totales.— "La Crónica Médica".— 72, 105.— Lima 1955.

41.— Ortega G. L.— Los estrógenos y la acción dinámica específica de las proteínas.— Tesis Bach. Fac. Med.— Lima 1950.

42.— Pincus G., Wheeler S., Young G. and Zahl P. A.— The colorimetric determination of urinary estrin.— J. Biol. Chem.— 116, 253.— Baltimore 1936.

43.— Pincus G.— New reaction for certain urinary 17 ketosteroides.— Endocrinol.— 32, 176.— Springfield 1943.

44.— Porter C. C. and Silber R. H.— J. Biol. Chem.— 185, 201.— Baltimore 1950.

45.— Perrine F. e Cisternine A.— L'escrezione urinaria del 17 chetosteroide in gravidanza e puerperio.— Bolletino della Societá Italiana di Biologia Sprimentale.— 31-3, 290.— Nápoles 1955.

46.— Regueiro Castro J. G., Santos Ruiz A. y Gallegos Lucas.— Eliminación urinaria de 17 cetosteroides nuestros en embarazadas a término.— Acta Ginecol.— 1,183.— Madrid 1950.

47.— Reddy W. J., Jenkins D. and Thorn G. W.— Method for estimation of 17 hidroxicorticoides in urine.— Metabolism.— 1, 511.— New York 1952.

48.— Reddy W. J.— Modification of Reddy, Jenkins, Thorn method for estimation of 17 hidroxicorticosteroids in urine.— Metabolism. 3, 489.— 1954.

49.— Reátegui R. E.— Insuficiencia ovárica estrogénica.— Tesis Bach. Fac. Med.— Lima 1954.

50.— Rosales P. N.— Determinación de los 17 hidroxicorticoides de la orina en gestantes con hiperemesis gravídica.— Tesis. Fac. Farm. Bioquim.— Lima 1956.

51.— Reichstein T. and Reich H.— The Chemistry of the Steroids.— XV, 155-192.— 1946.

52.— Reichstein T. and Shoppee C. W.— The Hormones of the Adrenal Cortex.— I, 436.— 1943.

53.— Seesting R. D.— A colorimetric assay for male sex hormone in urine.— Pro. Exp. Biol. Med.— 36,524.— St. Louis 1937.

54.— Sacieta C.— Cuantificación de 17 cetoesteroides neutros en orina de

Universidad del Perú. Decana de América

mujeres gestantes y su relación con el sexo del feto.— Tesis Fac. Farm. Bioq.— Lima 1956.

55.— Salter W. T., Frances D. H. and Oesterling J. M.— Analogies between urinary 17 ketosteroid G. and urinary esteroids a determination microchemically.— J. Clin. Endocr. 8,295.— Philadelphia 1948.

56.— Salazar Bustamante V.— Corticoesteroides urinarios en estado normal y después de intervención quirúrgica.— "La Crónica Médica".— 73, 161.— Lima 1956.

57.— Stimmel B F.— The utilization of a color correction equation with the Kober reagent for the estimation of the strogens in human urine with low estrogens content.— J. Biol, Chem. 165,73.— Baltimore 1946.

58.— Smith, Mellinger and Patti.— J. Clin. Endocr. Metab.— 14,336.— Philadelphia 1954.

59.— Talbot N. B. and Colbs.— The colorimetric assay of urinary corticosteroids like sustances.— J. Biol. Chem.— 160,553.— Baltimore 1945.

60.— Talbot N. B., Butler A. M. and Maclacglan E.— The colorimetric assay of total alpha and beta 17 ketosteroids in extracts of human urine.— J. Biol. Chem.— Baltimore 1940.

61.— Tipian V. L.— Extracción de estrona a partir de orina de mujer grávida.— "La Crónica Médica".— 64, 264.— Lima 1945.

62.— Ticona R. F.— Los estrógenos y la progesterona en el diagnóstico precoz del embarazo.— Tesis Bach. Fac. Med.— Lima 1951.

63.— Vargas C. R.— Determinación cuantitativa de estrogenuria en embarazadas aparentemente snas y con toxemia de la gestación.— Tesis Bach. Fac. Far. Bioquim.— Lima 1956.

64.— Venning E. H., Eveling K. A., Harknes E. U. and Browne J.S.L.— Determination of estrin in urine with the photoclectric Colorimeter.— J. Biol. Chem.— 120,225.— Baltimore 1937.

65.— Wehrs S.— Excrecao urinaria de estrógenos e 17 cotosterois antes, durante e apos o trabalho do parto.— Rev. Gynec. Obstet. 1,133.— Río de Janeiro 1951.

66.— Zapata J.— Determinación de los 17 cetoesteroides neutros urinarios en mujeres grávidas.— Tesis de Bach. Fac. Med.— Lima 1955.

Sobre métodos de homogenización en el examen copro-parasitario

Por MANUEL MATA
Matanzas, Cuba

Muchas parasitosis intestinales dejan de ser diagnosticadas por el examen coprológico cuando por sistema, exceso de trabajo o desgano en el hacerlo, son abreviados estos exámenes limitándolos a la observación microscópica directa de una preparación. Este examen microscópico directo, por detenido y minucioso, que se haga, es a todas luces insuficiente, ya que solo

podrán descubrirse por él los elementos parasitarios que existan en abundancia y sólo por afortunada casualidad se encontrarán cuando estén escasos.

Para que la investigación de parásitos alcance un mínimo de satisfactoria eficiencia, el examen parasitario debe comprender los tiempos siguientes: examen microscópico directo de una pequeña gota de la muestra de heces recién exoneradas, líquidas y perfectamente mezcladas; examen por método de concentración o enriquecimiento; y finalmente, examen macroscópico del tamizado del resto de la muestra.

CONDICIONES DE LA MUESTRA

Salvo las escasas excepciones en que esté en absoluto contraindicado el estímulo peristáltico, recomiendo laxante salino para provocar deposición líquida y homogénea, rechazando sistemáticamente las muestras de consistencia dura y viejas. En las muestras blandas así obtenidas y conservadas en incubadora hasta el momento del examen, se sorprenden con facilidad y vivas las diversas variedades de protozoarios y minúsculas larvas, cuya clasificación facilitan sus movimientos y otros caracteres físicos. En cuanto a los huevos en general, su presencia se revela con fácil seguridad por homogenización.

METODOS DE CONCENTRACION

Los más empleados son: El de Telemenn, que corresponde al tipo de suspensión en líquidos de muy baja densidad y el de Willis que emplea soluciones de gran densidad. Ambos procedimientos se complementan.

Como la técnica de Telemenn se encuentra fácilmente en cualquier Manual de laboratorio, no haré aquí mención de ella. En cuanto a la de Willis, quizás menos conocida, vale la pena contribuir a su mayor divulgación, bien merecida por lo cómoda, práctica y valiosa.

PROCEDIMIENTO DE CONCENTRACION DE WILLIS

Originalmente se empleaban soluciones salinas saturadas de cloruro de sodio o sulfato de magnesio. Con el cloruro de sodio se logran soluciones a saturación, de 23 a 25 grados Baumé, superándose estas densidades con el sulfato de magnesio, con el cual se logran pesos de 30 a 32 Baumé.

Como el fundamento de este tipo de concentración se basa en el empleo de soluciones superdensas, se ha tratado de sobrepasar la densidad máxima obtenida con las soluciones salinas, sustituyendo éstas por soluciones azucaradas.

Ejemplo de éstas, es la propuesta por Basnuevo y Anido de la Habana en "Laboratorio Práctico".

Esta solución integrada por ácido acético, formol y azúcar, con una densidad de 32 a 33 grados Baumé, concentra muy bien.

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

pero tiene el inconveniente, por su reacción ácida, de producir efervescencia al desleír con ella las heces alcalinas, formando burbujas persistentes que dificultan la observación microscópica.

Tratando de obviar este inconveniente, he preparado una solución a base de azúcar y sal corriente, de reacción neutra y un gran peso específico de 38 grados Baumé, que hace tiempo empleó.

Dicha solución salina, siruposa, se prepara como sigue:

Solución saturada de sal común	100 c.c.
Azúcar blanca	150 grs.

Disolver el azúcar y filtrar por algodón.

Esta solución concentrada, salino-siruposa, se conserva inalterable por tiempo indefinido.

La solución saturada de sal común empleada para disolver el azúcar, se prepara disolviendo 35 gramos de sal corriente por 100 c.c. de agua, filtrándola al final. Es cómodo tenerla preparada previamente, ya que es inalterable y teniéndola facilita la rápida preparación de la solución concentrada salina, siruposa, en el momento que se desee.

MODUS OPERANDI

En copa pequeña de ensayo u otro recipiente apropiado, se deposita uno o dos gramos aproximadamente, de las heces por examinar por cada 5 c.c. de la capacidad del recipiente que se use. Se deslien las heces con la ayuda de una varilla de vidrio, comenzando con muy pequeña cantidad de la solución salina siruposa a medida que se va removiendo con la varilla para asegurar una solución homogénea, prosiguiendo en tal forma hasta llenar el recipiente.

Se deja en reposo diez o más minutos, y se cubre con un porta objetos que contacte con la superficie del líquido.

Hay que cuidar que el nivel de la dilución fecal alcance los bordes del recipiente sin que llegue a desbordarse, ya que si esto sucediese el líquido desbordado arrastraría consigo la mayor parte de los elementos parasitarios acumulados en su superficie, malográndose la operación, y si por el contrario el líquido fuese insuficiente no alcanzaría contacto con la laminilla.

Pasados diez minutos se retira el porta objetos levantándolo horizontalmente y distribuyendo con suaves movimientos el líquido colgante para evitar su desprendimiento al dar vuelta a la laminilla o pasándolo a otra laminilla, repitiendo entonces la maniobra para ampliar la preparación.

La preparación así obtenida se lleva al microscopio, sin cubrir, y se examina a pequeño aumento.

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América