

UNIVERSIDAD FEMENINA DE MÉXICO
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Micrométodo para la Determinación de Colesterol Hemático

T E S I S

que para obtener el Título de
Químico-Farmacéutico-Biólogo

presenta

MAGDALENA RIUS DE LA POLA

MÉXICO, D. F.

1958



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**A la Sra. *Adela Formoso de Obregón Santacilia*,
Directora de la Universidad Femenina de México,
como testimonio de agradecimiento y admiración.**

**A la Srita. Q. F. B.
M^o del Consuelo Hidalgo y Mondragón
y a todos mis Maestros, como un respetuo-
so homenaje de cariño y gratitud.**

Patentizo mi agradecimiento al señor
Bennie Zak, Ph. D.
por su valiosa ayuda.

A la Sra. Q. F. B.
M^o del Pilar Rius de Belausteguigoitia,
a mis Padres y Hermano, como manifiesto de
gran cariño, admiración y agradecimiento.

SUMARIO

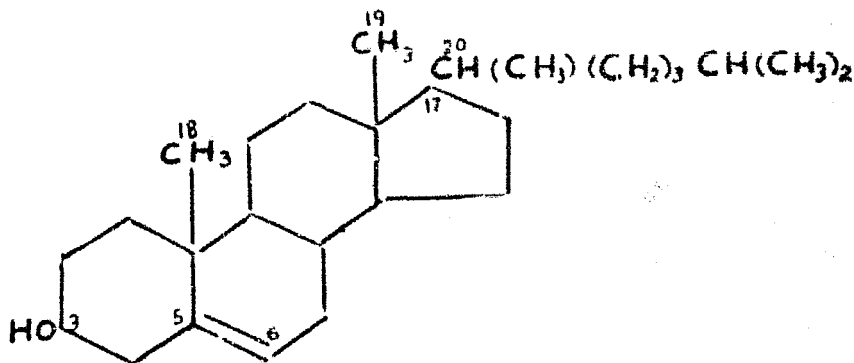
- I.* Introducción
- II.* Material y métodos
- III.* Resultados
- IV.* Resumen y conclusiones
- V.* Referencias bibliográficas

INTRODUCCIÓN

Las determinaciones de colesterol actualmente han alcanzado una importancia considerable; lo que ha ocasionado que gran número de científicos intenten encontrar un método de dosificación rápido y sencillo, ya que los métodos establecidos pecan de enorme laboriosidad y exigen gran número de manipulaciones (Pearson, 1953) que van en perjuicio de la exactitud, y en algunas ocasiones de la rapidez necesaria para las dosificaciones, especialmente clínicas.

Los detalles acerca de la constitución química y propiedades del colesterol, no son objeto del presente trabajo, en el cual se resumirán únicamente sus características más esenciales.

El colesterol es el mejor conocido de todos los esteroides (Harrow, 1957). Es un alcohol monoatómico que contiene una doble unión y cuya fórmula es $C_{27}H_{46}OH$ (Hawk, 1954); su estructura es la siguiente:



Los cuatro anillos forman el núcleo ciclo pentano perhidro fenantreno, el cual es característico no sólo del colesterol y de

otros esteroides vegetales y animales, sino también de una gran variedad de compuestos existentes en la naturaleza y cuyo significado fisiológico es en extremo diverso. Entre estos últimos se encuentran sales biliares, hormonas esteroideas, vitaminas esteroles, la porción aglicónica de los glucósidos cardiotónicos (digital, etc.), las saponinas, pudiéndose incluir también aquí los hidrocarburos carcinógenos del tipo del fenantreno.

El colesterol se encuentra constituyendo uno de los lípidos celulares primordiales en cantidades bastante grandes en el tejido nervioso (Hawk, 1954). Se le encuentra también en la bilis, siendo muy abundante en cierto tipo de cálculos biliares. Existe también en las heces y leche.

El colesterol se presenta en la sangre en forma de colesterol libre y de ésteres del colesterol. En el plasma se hallan a la vez colesterol libre y esterificado, en los glóbulos rojos solamente parece estar presente la forma libre. Para el análisis se prefiere el plasma a la sangre total, ya que en la fracción del plasma tienen lugar la mayor parte de las variaciones patológicas, en la cantidad total y distribución entre la forma libre y la esterificada.

El colesterol de la sangre normal parece mantenerse a un nivel constitucional que es característico para cada individuo, y con respecto al cual, se producen de ordinario desviaciones importantes. Con todo se encuentran variaciones considerables entre diferentes individuos siendo los límites normales aproximadamente de 110 a 390 mg. por 100 ml. de suero o plasma (estos datos dependen del método empleado). De esta cantidad, alrededor de un tercio está presente en forma de colesterol libre (sobre la base de la precipitación con digitonina que es generalmente aceptada como tipo) y el resto está esterificado correspondiendo a un 60-75% del total.

Si bien muchos de los datos que figuran en la literatura, son en función del colesterol total, la distribución de éste en

tre la forma libre y la esterificada está recibiendo mayor atención, en especial para el diagnóstico de las enfermedades del hígado. Según Sperry la determinación habitual del colesterol de la sangre total debería abandonarse, ya que los glóbulos contienen solamente colesterol libre y en cantidad bastante constante, no habiéndose observado variaciones en los estados patológicos. El colesterol del suero aumenta, y la determinación tiene valor clínico en: la nefrosis, lipèmia, diabetes azucarada, el hipotiroidismo y la obstrucción biliar debida a cálculos u otras causas.

Se encuentra aumentado también en el embarazo y después de una dieta alta en lípidos. La cantidad de colesterol en el suero es menor, en los casos de hipertiroidismo, anemia perniciosa y ciertos tipos de enfermedades del hígado; en estas últimas la proporción entre el colesterol esterificado y el total puede disminuir lo bastante para ser de importancia en el diagnóstico.

Los métodos adoptados para la determinación de colesterol se pueden dividir en dos grandes grupos (Kenny, 1952): 1º en el cual la principal variación está en la forma de extracción del colesterol, ya que la producción del color en todos ellos, se hace de acuerdo con la reacción de Liebermann y Burchard. Incluidos en estos están: el método de Myers y Wardell (1918), los métodos de Leiboff (1924) y Sheftel (1944), Sackett (1925) y Bloor (1928).

El método de Trinder (1952) utiliza potasa alcohólica para hidrolizar los ésteres del colesterol y el colesterol libre se extrae con petróleo, usando como disolvente dicloruro de etileno y desarrollando el color con una mezcla de acetilo y ácido sulfúrico.

Por lo general las sustancias empleadas para la extracción del colesterol en los métodos anteriormente citados son mezclas de: alcohol etil, alcohol acetona, etc., ya que Drecker y

colaboradores (1935), demostraron que el colesterol estaba presente en dos diferentes fracciones: una parte etér soluble y otra combinada con proteínas que requería la desnaturalización con alcohol.

También se han hecho intentos de estimar el colesterol directamente en cloroformo ácido, en los métodos de Solv (1947) y Zuckerman y Natchson (1948).

En el 2º grupo se incluyen todos los métodos que tengan como base la precipitación del colesterol como digitónido, el cual puede ser determinado gravimétricamente por los métodos de Gardner y Gainsborough (1927), Boyd (1933) y Man y Gildea (1933). También se ha determinado gasométricamente por Kirk, Page y Van Slyke (1928).

Los métodos citados anteriormente, pertenecientes al 2º grupo, no son adecuados para la clínica ya que se requiere una gran cantidad de sangre y un equipo especial.

El método estudiado en el presente trabajo se basa en las determinaciones de Pearson, Stern y McGavack (1952) (1953) y consiste en la precipitación de las proteínas por medio de un reactivo precipitante de cloruro férrico en ácido acético glacial, filtración y sobre una alícuota del filtrado desarrollo del color con ácido sulfúrico. El método de Bennie Zak (1957) para colesterol total y sus ésteres consiste en la extracción del colesterol con mezcla alcohol-acetona filtrando y dividiendo el filtrado en dos partes, determinado sobre una de ellas el colesterol total y sobre la otra el colesterol libre.

Las lecturas de la densidad óptica del color desarrollado se hacen en el fotocolorímetro de Leitz con filtro 550.

El mecanismo de la reacción que tiene lugar en el método de Bennie Zak no ha podido ser satisfactoriamente explicado (Bennie Zak, 1958), pero se cree que exista una fase de oxidación, ya que se forma una cantidad proporcional de ión ferroso. Aparte de esta oxidación, existe probablemente una

deshidratación del colesterol, puesto que la solución final no acuosa contiene ácido sulfúrico al 40 % (Bennie Zak, 1957). Esto podría ser cierto, ya que de acuerdo con los trabajos de Feigl (1954) y Nath (1924), (1946), el colesterol puede ser deshidratado y sulfonado por el ácido sulfúrico en ácido acético para formar un ácido sulfónico derivado del colesterileno. La solvación es un fenómeno reconocido en cualquier reacción en que se formen compuestos coloreados como producto de adición del ácido sulfúrico y depende de la posibilidad de coordinación de los átomos, o grupos de átomos del compuesto con el ácido sulfúrico. El color puede extraerse por dilución con agua; es posible que la forma oxidada del colesterol sea deshidratada por el ácido sulfúrico (o bien que se invierta el orden de los dos pasos de la reacción) y el compuesto formado se solvata con el ácido sulfúrico. Hay por lo tanto una posibilidad de sulfonación, solvación, deshidratación y condensación u oxidación en la producción del color.

II

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL.

1. Matraces volumétricos.
2. Matraces Erlenmeyer.
3. Pipetas.
4. Tubos de ensaye.
5. Embudos.
6. Tubos graduados de 10 y 25 ml.
7. Parrilla eléctrica.
8. Centrífuga.
9. Fotocolorímetro de Leitz.

REACTIVOS

a) Micrométodo de Bennie Zak

1. Solución patrón de colesterol.
2. Solución tipo de colesterol.
3. Solución patrón de cloruro férrico.
4. Blanco y reactivo diluyente de cloruro férrico.
5. Solución salina fisiológica.
6. Ácido sulfúrico q. p.
7. Solución de digitonina.
8. Mezcla alcohol-éter.
9. Acetona q. p.

b) Método de Bloor (modificado)

1. Solución patrón de colesterol.
2. Solución tipo de colesterol.

PROCEDIMIENTO

Obtención de la curva de calibración

1. Hacer diluciones mezclando: cero, 2.0, 4.0 y 6.0 ml. de solución tipo de colesterol, recientemente preparada, con 8.0 ml. del reactivo diluyente de cloruro férrico.
2. Añadir 0.2 ml. de solución salina fisiológica a cada tubo.
3. Tomar una parte alícuota de 6.0 ml. y estratificar 4.0 ml. de ácido sulfúrico concentrado.
4. Mezclar las soluciones vigorosamente y dejar que sus contenidos adquieran temperatura ambiente (aproximadamente 16°).
5. Leer al fotocolorímetro con filtro 530 comparando con el blanco y hacer la gráfica de porcentaje de transmitancia, en relación con concentración, en papel semilogarítmico; colocando como ordenadas los porcentajes de transmitancia y como abscisas la concentración del colesterol en miligramos por cien mililitros de suero.

Puede hacerse también la tabla en papel milimétrico poniendo en las ordenadas el logaritmo del porcentaje de la transmitancia o bien la densidad óptica, o sea $-\log$ de la transmitancia (Hawk, 1954).

Determinación de colesterol en suero

1. Medir 0.2 ml. de suero, añadir 8.0 ml. de reactivo precipitante de cloruro férrico. Mezclar perfectamente las soluciones.
2. Al cabo de 5 minutos filtrar la mezcla.
3. Tomar una parte alícuota de 6.0 ml. del filtrado amarillo claro y añadir estratificando 4.0 ml. de ácido sulfúrico. Mezclar los reactivos y dejar que la mezcla adquiera la temperatura ambiente.

3. Cloroformo q. p.
4. Reactivo de anhídrido acético y ácido sulfúrico.
5. Mezcla alcohol-éter.
6. Solución de digitonina.
7. Éter de petróleo.

MÉTODOS

1. *Micrométodo de Henne Zack para colesterol total.*

Reactivos

1. Solución patrón de cloruro férrico. — Pesar 850 mg. de cloruro férrico hexahidratado y disolver con ácido acético glacial; pasar a matraz volumétrico de 100 ml.; mezclar por inversión. Debe conservarse en el refrigerador para mayor estabilidad del reactivo.
2. Reactivo precipitante de cloruro férrico. — Diluir la solución patrón 1:10 con ácido acético glacial. Este reactivo también debe refrigerarse.
3. Blanco de cloruro férrico y reactivo diluyente. — Diluir 8,5 ml. de la solución patrón a 100 ml. con ácido acético glacial.
4. Solución patrón de colesterol. — Disolver 100 mg. de colesterol puro y seco en ácido acético glacial, pasarlo a un matraz volumétrico de 100 ml. y diluir hasta la marca con ácido acético glacial.
5. Solución tipo de colesterol. — Medir exactamente 1.0 ml. de la solución patrón de colesterol y 0.85 ml. de la solución patrón de cloruro férrico, llevar a un matraz volumétrico de 10 ml. y alonar con ácido acético glacial.

La preparación de estas soluciones se debe hacer inmediatamente antes de empezar la determinación.

PROCEDIMIENTO

Obtención de la curva de calibración

1. Hacer diluciones mezclando: cero, 2.0, 4.0 y 6.0 ml. de solución tipo de colesterol, recientemente preparada, con 8.0 ml. del reactivo diluyente de cloruro férrico.
2. Añadir 0.2 ml. de solución salina fisiológica a cada tubo.
3. Tomar una parte alícuota de 6.0 ml. y estratificar 4.0 ml. de ácido sulfúrico concentrado.
4. Mezclar las soluciones vigorosamente y dejar que sus contenidos adquieran temperatura ambiente (aproximadamente 10°).
5. Leer al fotocolorímetro con filtro 570 comparando con el blanco y hacer la gráfica de porcentaje de transmitancia, en relación con concentración, en papel semilogarítmico; colocando como ordenadas los porcentajes de transmitancia y como abscisa la concentración del colesterol en miligramos por cien mililitros de suero.

Puede hacerse también la tabla en papel milimétrico poniendo en las ordenadas el logaritmo del porcentaje de la transmitancia o bien la densidad óptica, o sea $-\log$ de la transmitancia (Hawk, 1954).

Determinación de colesterol en suero

1. Medir 0.2 ml. de suero, añadir 8.0 ml. de reactivo precipitante de cloruro férrico. Mezclar perfectamente las soluciones.
2. Al cabo de 5 minutos filtrar la mezcla.
3. Tomar una parte alícuota de 6.0 ml. del filtrado amarillo claro y añadir estratificando 4.0 ml. de ácido sulfúrico. Mezclar los reactivos y dejar que la mezcla adquiera la temperatura ambiente.

4. Leer al fotocolorímetro con filtro 550 comparando con el blanco y determinar la concentración de colesterol por 100 ml. de suero en la gráfica 1.

Nota: La técnica original con lectura en el espectrofotómetro de Coleman emplea únicamente 0.1 ml. de suero y cantidades proporcionales de los reactivos, pero se ha creído conveniente duplicar el volumen con objeto de que la celdilla del fotocolorímetro pueda llenarse totalmente.

II. Método de Bennie Zack para la determinación de colesterol libre y total.

REACTIVOS

1. Solución patrón de cloruro férrico.—Pesar exactamente 840 mg. de cloruro férrico hexahidratado, disolver en ácido acético glacial en matraz volumétrico de 100 ml. Diluir hasta la marca y mezclar por inversión.
2. Solución tipo de cloruro férrico.—Diluir la solución patrón 1 : 10 con ácido acético glacial.
3. Solución patrón de colesterol.—Disolver 100 mg. de colesterol q. p. seco en ácido acético glacial, en un matraz volumétrico de 100 ml. Atornillar con ácido acético glacial.
4. Solución de digitonina.—Disolver un gramo de digitonina en 50 ml. de etanol y diluir a 100 ml. con agua destilada.
5. Mezcla extractora alcohol-acetona.—Preparar la mezcla 1 : 1.
6. Acetona q. p.
7. Ácido sulfúrico q. p.

PROCEDIMIENTO

La preparación de las curvas de calibración se hace de igual manera que para el colesterol total.

TÉCNICA

1. Medir exactamente 0.4 ml. de suero; vaciarlos en un matraz volumétrico de 20 ml., al que previamente se le ha añadido 10 ml. de mezcla extractora de alcohol-acetona; diluir hasta la marca agitando vigorosamente.
2. Filtrar, manteniendo cubierto el embudo con un vidrio de reloj.
3. Tomar 10 ml. del filtrado y colocarlo en un tubo de centrifuga para la determinación de colesterol libre.
4. Medir 5 ml. del filtrado alcohol-acetona y pasarlos a un tubo de ensayo para determinar colesterol total.
5. Evaporar el contenido del tubo de ensayo a sequedad y el contenido del tubo de centrifuga a un volumen de 1.0—2.0 ml.
6. Añadir 6.0 ml. de la solución tipo de cloruro férrico al contenido del tubo de ensayo para disolver el residuo.
7. Estratificar 4.0 ml. de ácido sulfúrico concentrado y mezclar las soluciones vigorosamente.
8. Después de esperar 10 minutos (aproximadamente) leer al fotocolorímetro, comparando con el blanco, con filtro 550.
9. Añadir al contenido del tubo de centrifuga un ml. de solución de digitonina.
10. Dejar reposar 15 minutos y centrifugar por 10 minutos.
11. Decantar el líquido sobrenadante y añadir 8 ml. de acetona q. p., de tal manera que se logre dispersar el precipitado; agitar perfectamente hasta que la suspensión del precipitado sea homogénea.

12. Una vez que lo anterior ha sucedido, decantar y volver a centrifugar.
13. Invertir el tubo, y secar sus paredes con un papel absorbente. Añadir el reactivo de cloruro ferrico.
14. Estratificar 4 ml. de ácido sulfúrico.
15. Leer al fotocolorímetro de Leitz, comparando con el blanco con filtro 550.
16. Obtener en la gráfica la concentración de colesterol por 100 ml. de suero.

TÉCNICA DE BLOOD

REACTIVOS

1. Mezcla alcohol-éter. Mezclar tres volúmenes de alcohol de 95% con un volumen de éter q. p.
2. Reactivo de colesterol (se prepara justamente antes de ser usado). En un frasco con tapón, poner 2 ml. de anhídrido acético por cada problema, añadir 0.1 ml. de ácido sulfúrico concentrado por cada ml. de anhídrido que se haya puesto (mezclar y dejar enfriar).
3. Solución patrón de colesterol.—Pesar 10 mg. de colesterol y aforar a un litro con cloroformo.
4. Solución de digitonina.—Solución al 0.5% en alcohol de 95%.
5. Éter de petróleo q. p.

PROCEDIMIENTO

La curva de calibración se hace con diluciones de la solución patrón, correspondientes a las anteriormente hechas para el micrométodo de Bennie Zack y haciendo la gráfica en la misma forma.

Determinación de colesterol total

1. En un matraz o tubo aforados a 25 ml. colocar: 17 ml. de mezcla alcohol-éter; añadir lentamente y con constante agitación del recipiente 1.0 ml. de suero; diluir hasta la graduación con mezcla alcohol-éter; dejar reposar 30 minutos (agitando ocasionalmente) y filtrar.

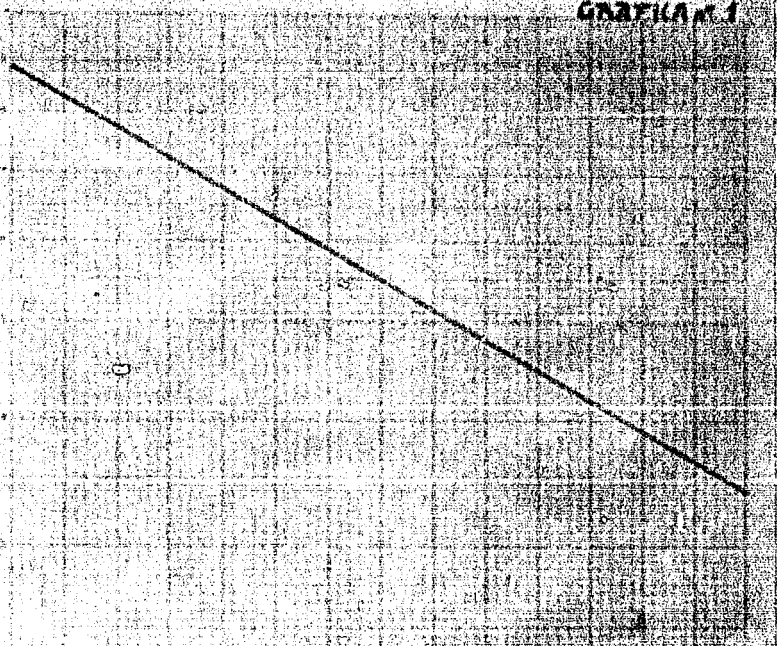
2. En un matraz Erlenmeyer de 50 ml. colocar 10 ml. del filtrado; evaporar a sequedad en parrilla eléctrica. Extraer el colesterol del residuo hirviendo tres veces sucesivas con 3 ml. de cloroformo cada vez.
3. Decantar a un tubo marcado en 10 ml. y el volumen de los diferentes extractos, diluirlos a 10 ml. con cloroformo.
4. Añadir 2 ml. de reactivo de colesterol; invertir varias veces. Dejar reposar en la obscuridad por 20 minutos.
5. Leer al fotocolorímetro con filtro 640.

Determinación de colesterol total y sus ésteres

1. Se colocan 10 ml. del filtrado alcohol-éter en un vaso de precipitados, se añade 1.0 ml. de solución de digitonina, se mezcla perfectamente y se evapora a sequedad a baño maría.
2. Añadir 10 ml. de éter de petróleo, llevar a baño maría hasta ebullición y decantar a un vaso de precipitados; repetir la extracción tres veces más.
3. Evaporar a baño maría los extractos combinados de éter de petróleo.
4. Extraer el residuo tres veces consecutivas con porciones de 3 ml. de cloroformo.
5. Añadir 2 ml. de reactivo de colesterol; agitar perfectamente.
6. Leer al fotocolorímetro con filtro 640.

GRAFICO N. 1

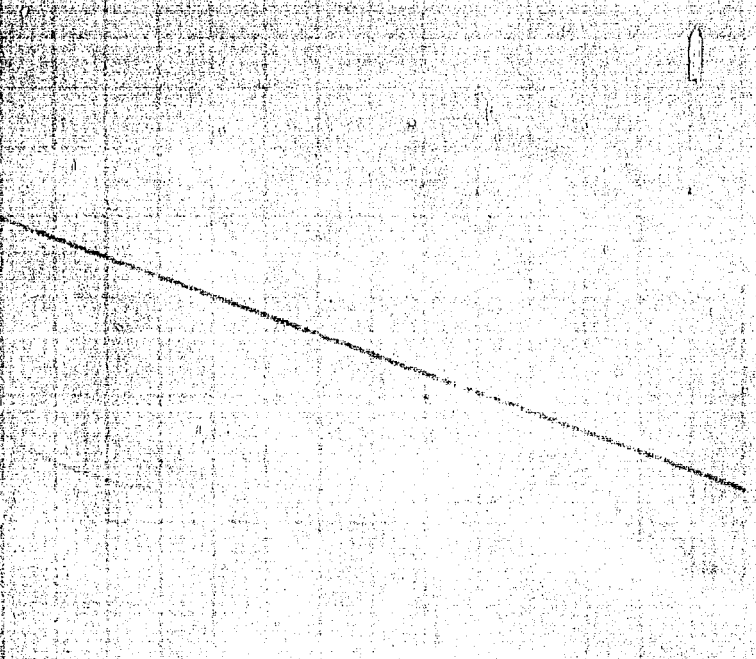
porcentaje de transmitancia



CURVA DE CALIBRACION
para el método
de
BENNIE ZACK

25 50 75 100 125 150 175 200 225 250 275 300 325 350
concentración de colesterol en mg x 100 ml de suero

porcentaje de absorción



CURVA DE CALIBRACION
 para el método
 de
 BLOOR (modificado)

CONCENTRACION de cafeína en mg. a 100 ml. de agua

III

RESULTADOS

CONVERSION TOTAL

Muestra	Mediamente tomada	Blanco	Dif. en mg.	% de dif.
	mg. / 100 ml.	mg. / 100 ml.		
1	130	125	+ 5	3.8
2	143	130	+ 13	9.1
3	155	148	+ 7	4.5
4	160	155	+ 5	3.1
5	174	160	+ 14	7.9
6	182	170	+ 12	6.6
7	187	180	+ 7	3.7
8	192	184	+ 8	4.2
9	195	188	+ 7	3.6
10	190	180	+ 10	5.3
11	200	190	+ 10	5.0
12	197	190	+ 7	3.5
13	197	190	+ 7	3.5
14	198	190	+ 8	4.0
15	173	173	0.0	0.0
16	148	148	0.0	0.0
17	150	145	+ 5	3.3
18	190	193	- 3	- 1.6
19	190	185	+ 5	2.6
20	117	114	+ 3	2.6
21	150	150	0.0	0.0
22	100	98	+ 2	2.0
23	160	145	+ 15	9.4
24	140	148	- 8	- 5.7
25	202	190	+ 12	5.9
26	175	175	0.0	0.0
27	190	193	- 3	- 1.6
28	190	190	0.0	0.0

CÓCERTEO TOTAL

Muestra	Micrometros mg/100 ml. 1000	Bloque mg/100 ml. 1000	Dif. en mg.	% de dif.
1	130	135	+ 5	3.8
2	148	150	+ 2	0.80
3	153	148	+ 7	4.5
4	140	135	+ 5	3.5
5	202	202	+ 2	0.99
6	290	290	0.0	0.0
7	327	320	+ 7	2.1
8	212	214	+ 3	1.3
9	153	146	+ 7	4.5
10	250	250	0.0	0.0
11	308	304	+ 6	1.9
12	257	250	+ 7	2.9
13	317	320	- 3	0.94
14	100	200	+ 2	0.99
15	273	273	0.0	0.0
16	208	212	+ 6	2.4
17	350	345	+ 5	1.4
18	190	193	- 3	1.5
19	130	135	- 5	3.8
20	217	214	+ 3	1.3
21	250	250	0.0	0.0
22	302	302	- 2	0.66
23	350	345	+ 5	1.4
24	240	242	- 2	0.83
25	202	200	+ 2	0.99
26	175	175	0.0	0.0
27	190	193	- 3	1.5
28	250	250	0.0	0.0

CONTENIDO TOTAL (continuación)

Muestra	Micrométodo mg/100 ml suelto	Blanco mg/100 ml suelto	Int. en mg	% de dos.
29	150	141	9.2	1.3
30	200	192	8.0	0.0
31	100	90	10.0	0.00
32	150	140	10.0	1.3
33	110	103	7.0	1.3
34	120	112	8.0	3.4
35	150	140	10.0	3.4
36	200	190	10.0	0.05
37	250	243	7.0	0.0
38	310	300	10.0	0.04
39	150	140	10.0	1.0
40	140	130	10.0	1.4
41	200	190	10.0	1.3
42	200	190	10.0	1.3
43	200	190	10.0	0.0
44	150	140	10.0	1.0
45	200	190	10.0	0.00
46	110	103	7.0	1.3
47	100	90	10.0	0.00
48	200	190	10.0	0.05
49	150	140	10.0	3.0
50	150	140	10.0	0.0

COLESTEROL TOTAL Y LIBRE

Micrométodo de Benie Zack

Método de Bloor

Muestras	Colesterol total	Colesterol libre	Colesterol esterificado (por diferencia)	Colesterol total	Colesterol libre (por diferencia)	1000 -2000 -3000 -4000 -5000 -6000 -7000 -8000 -9000 -10000 -11000 -12000 -13000 -14000 -15000 -16000 -17000 -18000 -19000 -20000	Diferencia en mg. (colesterol libre)	% de diferencia (colesterol libre)
1	202	72	130	200	74	116	-2	1.6
2	250	111	139	248	110	138	+1	0.9
3	155	53	100	148	49	99	+6	10.8
4	150	50	100	150	53	97	-3	6.0
5	290	125	165	290	123	165	0.0	0.0
6	217	72	145	214	72	142	0.0	0.0
7	155	70	85	160	77	83	-7	10.0
8	300	118	182	302	122	180	-4	3.3
9	215	85	130	214	81	130	+1	1.2
10	350	173	175	350	172	173	+3	2.0
11	273	108	165	273	108	165	0.0	0.0
12	237	87	150	230	85	145	+2	2.2
13	308	91	217	302	85	217	+6	8.3
14	290	120	164	290	125	165	+1	0.78
15	163	60	105	160	60	100	0.0	0.0
16	217	72	145	217	77	140	-5	6.7
17	300	120	180	300	122	178	-2	1.6
18	350	150	200	350	150	200	0.0	0.0
19	290	130	160	290	125	165	+5	3.8
20	250	110	140	242	102	140	+8	7.2

Las determinaciones anteriores se han hecho sobre individuos, supuestos normales, adultos y de ambos sexos.

IV

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se determinó colesterol total y esteres del colesterol según la técnica de Bennie Zack y colaboradores adaptada al foto-colorímetro en 50 sueros supuestos normales y se compararon los resultados con la técnica de Bloor.

CONCLUSIONES

1. El método es suficientemente exacto como para ser adoptado en el laboratorio clínico.
2. Las diferencias encontradas en la comparación con el método de Bloor no exceden 2.8 % y se ha observado que la mayor parte son diferencias por exceso, las cuales podrían atribuirse a una incompleta extracción en el método de Bloor.
3. En el 72 % de los resultados existe una diferencia no mayor de ± 2 . En el 20 % de los casos estudiados coinciden exactamente los resultados de los dos métodos efectuados.
4. Con respecto a la determinación de esteres, el máximo de diferencia encontrado fue del 10.8 %; el 20 % de los casos coincidieron. En el 2 % de los casos la diferencia no es mayor que 2.3 %. La diferencia es menor de uno en el 8 % de los casos.
5. Con la previa precipitación de las proteínas, en el método de Bennie Zack para colesterol total, se ha obviado la causa de error debida al triptóano, que se presentaba en el método original.
6. La pequeña cantidad de suero que requiere este procedimiento lo hace apto para las dosificaciones en recién nacidos, niños y animales de laboratorio.

7. El color es estable hasta por una hora.
8. El método es sencillo, rápido y económico.
9. La determinación tiene el inconveniente de la inestabilidad de los reactivos, a temperatura ambiente se conservan durante un mínimo de 8 días, en el refrigerador su tiempo de conservación se prolonga.
10. En el caso de que únicamente se trate de obtener colesterol total, se puede emplear el método número I que suprime las manipulaciones 1, 2, 5, del método número II.
11. No obstante la mayor complicación del método de B. Z. para colesterol libre y total con respecto a la determinación de colesterol total del mismo autor, resulta mucho más sencillo y rápido que cualquier otro método para determinar colesterol total y libre.

V

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BLOOR, W. R.

1928. *J. Biol. Chem.*, 77, 53. (Citado por Kenny, 1952.)

BOYD, E. M.

1933. *J. Biol. Chem.*, 101, 323. (Citado por Kenny, 1952.)

BREWSTER, R. Q.

1954. *Química Orgánica*. 4 ed., XVII + 971 pp. Editorial Médico Quirúrgica. Buenos Aires.

BROWN, H. H., A. ZLATKIS, B. ZAK y A. J. BOYLE.

1954. The rapid determination of free cholesterol in serum. *Anal. Chem.*, 26, 397-399.

DREKTER, I. S., A. BERNARD y S. S. LEOPOLD.

1935. *J. Biol. Chem.*, 110, 547. (Citado por Kenny, 1952.)

ERDOS, J. y M. SPIERA.

1944. *Métodos Clínico Químicos de Laboratorio*. 1ª ed. 279 pp. Editorial Atlante, S. A. México, D. F.

FEIGL, F.

1954. *Spot tests. Organic Applications*. 4ª ed., 2 vols., 13 + 184 pp. Elsevier Publishing Co. Nueva York. (Citado por Zak, 1957.)

FISHER, A.

1951. *Laboratorio (Análisis Clínicos)* 5ª ed. XVIII + 286 pp. Librería "El Ateneo" Editorial. Buenos Aires.

GARDNER, J. A. y M. GAINSBOROUGH.

1927. *Biochem. J.*, 21, 130. (Citado por Kenny, 1952.)

HARROW, B. y A. MAZUR.

1957. *Tratado de Bioquímica*. 6ª ed. en español, VII + 565 pp. Editorial Interamericana, S. A. México, D. F.

HAWK, P. B., B. L. OSSER y W. H. SEMMERSON.

1954. *Química Fisiológica Práctica*. 2ª ed. española, XIII + 1,289 pp. Editorial Interamericana, S. A. México, D. F.

HEDON, E.

1932. *Compendio de Fisiología*. 10ª ed., VII + 845 pp. Salvat Editores, S. A. Barcelona.

KENNY, A. P.

1952. The determination of cholesterol by the Liebermann-Burchard reaction. *J. Biol. Chem.* 52, 613-619.

KING, E. J. y I. D. P. WOOLTON.

1956. *Micro-Analysis in Medical Biochemistry*. 3ª ed., XI + 292 pp. J. & C. Churchill L. T. D., 304, Gloucester Place, Londres.

KIRK, E., J. H. PAGE y D. D. VAN SLYKE.

1934. *J. Biol. Chem.*, 106, 203. (Citado por Kenny, 1952.)

KOLMER, J. A. y F. BOERNER.

1948. *Diagnóstico Clínico para los Analistas de Laboratorio*. 1ª ed. española, XXXIII + 1,083 pp. Editorial Interamericana, S. A. México, D. F.

KOLMER, J. A.

1954. *Diagnóstico Clínico para los Analistas de Laboratorio*. 1ª ed. española, 2 vols., XXX + 623 pp. Editorial Interamericana, S. A. México, D. F.

LEIBOFF, P.

1924. *J. Biol. Chem.*, 61, 177. (Citado por Kenny, 1952.)

MAN, E. B. y E. F. GILDEA.

1933. *J. Biol. Chem.*, 101, 635. (Citado por Trinder, 1952.)

MYERS, V. C. y E. L. WARDELL.

1918. *J. Biol. Chem.*, 36, 147. (Citado por Kenny, 1952.)

NATH, M. C. y M. K. CHAKRABORTY.

1942. Colour Reactions of Steroids in Relation to their Structures. *Ann. Biochem. Exper. Med.* 27, 73.

PEARSON, S., S. STERN y T. H. MCGAVACK.

1952. A rapid procedure for the determination of total cholesterol in serum. *J. Clin. Endocrinol.*, 12, 1245-1246.

PEARSON, S., S. STERN y T. H. MCGAVACK.

1953. A rapid accurate method for the determination of cholesterol in serum. *Analyt. Chem.*, 25, 813-814.

SACKETT, G. E.

1925. *J. Biol. Chem.*, 64, 205. (Citado por Kenny, 1952.)

SHEFTEL, A. G.

1944. *J. Lab. Clin. Med.*, 29, 875.

TRINDER, P.

1952. Determination of cholesterol in serum. *Analyst*, 77, 321-325.

WINTROBE, M. M.

1943. *Clinical Hematology*. 2^a ed., XXIV + 703 pp. Lea and Febiger, Philadelphia.

ZAK, B.

1957. A microchemical rapid and simple method for the determination of total cholesterol in serum. *Amer. Clin. Path.*, 27, 583-588.

ZAK, B., A. DENNIS, M. D. LUZ y M. FISHER.

1957. Determination of serum cholesterol. *Amer. J. of Med. Techn.*, 283-187.

ZAK, B.

1958. Comunicacion Personal.

ZUCKERMAN, J. L. y S. NATIELSON.

1948. *J. Lab. Clin. Med.*, 33, 1,322.

GRÁFICA PANAMERICANA, S. DE R. L. PARROQUIA 911. MÉXICO 12, D. F.