

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

(A1)

**ANALISIS DE UN NUEVO
METODO PARA DETERMINAR
COLESTEROL SERICO**

T E S I S

para sustentar el examen de

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

p r e s e n t a

GLORIA CASALES ORTIZ

1973



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.

Tesis
1973
Vol 57



QUIMICA

A LA MEMORIA IMPERECEDERA DE MI ADORADO
PADRE; SR. ALBERTO CAZALES C. QUE CON -
SU INMENSO AMOR, Y EJEMPLAR VIDA DE HOM
BRE RECTO SUPO GUIARME POR EL CAMINO -
DEL SABER HASTA EL ULTIMO MOMENTO DE SU
VIDA.

A MI MADRECITA: TERESA ORTIZ VDA. DE C.
COMO UN HUMILDE HOMENAJE A QUIEN EN SI
LENCIO DE SUS LAGRIMAS, ME DIO VIDA Y -
NI CON MI VIDA PODRE PAGAR SUS SUFRIMIEN
TOS.

A MIS QUERIDOS HERMANOS: GABINO, JOSE,
ANTONIO, CON MI PROFUNDO AGRADECIMIEN
TO POR SU EJEMPLO, COMPRENSION Y RES--
PALDO MORAL, PARA HACER POSTIBLE LA REA
LIZACION DE MI CARRERA.

A LA SRITA. ALICIA CARDENAS CON FRATER
NAL CARINO.

A MI PADRINO SR. ARQ. PEDRO RAMIREZ VAZ
QUEZ CON MI ADMIRACION POR SU EXTRAORDI-
NARIA TRAYECTORIA COMO PROFESIONISTA, -
HOMBRE INTEGRO Y MAXIMO ORGANIZADOR DE
LOS JUEGOS OLIMPICOS MEXICO 68. MI AGRA-
DECIMIENTO POR EL APOYO QUE ME BRINDO -
PARA DESARROLLAR Y TERMINAR MI CARRERA-
PROFESIONAL.

A MI PADRINO SR. LIC. RAFAEL GARCIA GARZA
JOVEN Y ADMIRABLE PROFESIONISTA; CON MI -
SINCERO AGRADECIMIENTO POR SUS ATENCIONES
Y FINEZAS QUE ME BRINDO TANTO EN EL TRA--
YECTO DE MIS ESTUDIOS COMO EN LA CULMINA-
CION DE ELLOS.

A MI PADRINO PROF. ESTANISLAO POBURKA
WIECZNIE WODZIGCZNA ZA RZYKLAOD
CZLOWIEKA PROSTOLIJNEGO, ENERGIJNEGO
WYKSZLALCSNEGO I ZA DOSKONALENIEI NO
PWLU SPWRTOWYM Z ZALYM SZACUNKIEM.

A MI QUERIDO MAESTRO Y AMIGO SR. Q.F.B.
RAMON GUEVARA ESTRADA, PERSONA DOTADA -
DE MULTIPLES VIRTUDES, Y QUE A CUYA LUZ
Y BAJO SUS ATINADOS CONSEJOS SE ELABORO
ESTE TRABAJO. MI ETERNO AGRADECIMIENTO,
CARIÑO Y RESPETO, AL IGUAL QUE A SU QUE
RIDA ESPOSA SRA. EVANGELINA HERNANDEZ -
DE GUEVARA.

CON MI MAS PROFUNDO AGRADECIMIENTO A LA
QUERIDA MAESTRA ETELVINA M. DE JAIMES, -
QUE CON SUS CONOCIMIENTOS Y SABIOS CONSE
JOS SE AFANO PORQUE ADQUIRIERA, UNA AU-
TENTICA CONCIENCIA DE MI PROFESION.

AL DR. Y MAESTRO OSCAR AMOR D. CON MI
ADMIRACION, RESPETO Y AFECTO POR SU
AYUDA EN EL TRAYECTO Y CULMINACION DE
MIS ESTUDIOS.

A MIS MAESTROS CON INMENSA GRATITUD

A MIS COMPAÑEROS Y A TODAS AQUELLAS PERSONAS A QUIENES SOY DEUDORA DE AMISTAD Y CARINO.

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE.

PRESIDENTE: _____
Prof. Oscar Amor Dosero.

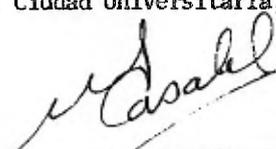
VOCAL: _____
Profa. Etelvina Medrano de Jaimes.

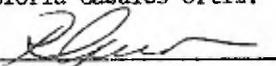
SECRETARIO:  _____
Prof. Ramón Guevara Estrada.

SUPLENTE: _____
Prof. Mario Miranda Castro.

SUPLENTE: _____
Profa. Ma. Elena Bustamente C.

Tema desarrollado en el Anexo del La
boratorio 3-B, de la Facultad de
Química, Ciudad Universitaria,
D. F.

SUSTENTANTE:  _____
Gloria Casales Ortíz.

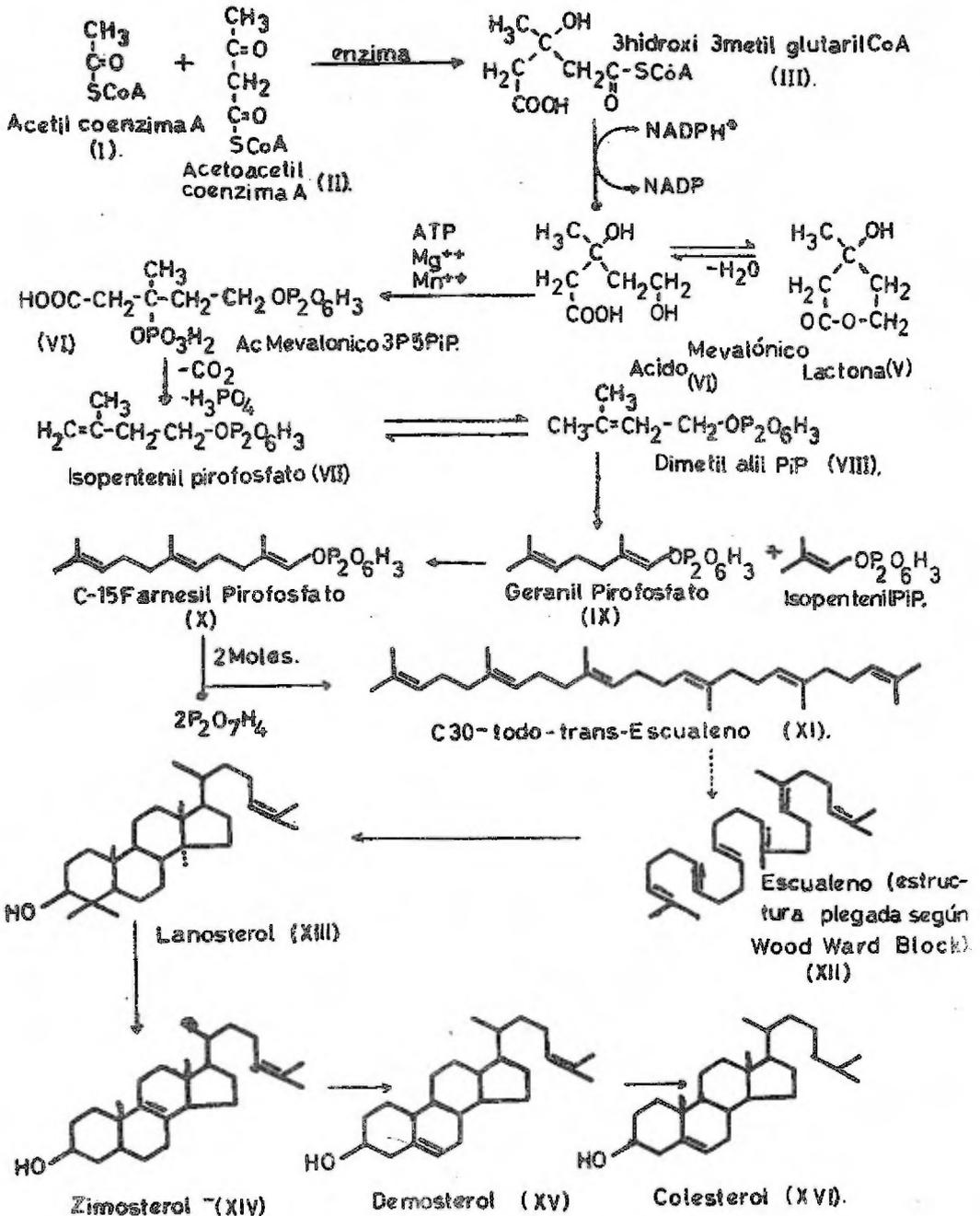
ASESOR:  _____
Prof. Ramón Guevara Estrada.

SUPERVISOR: _____
Profa. Etelvina M. de Jaimes.

C A P I T U L O S .

- I. - INTRODUCCION.
- II. - METODOS POR ESTUDIAR.
- III. - SELECCION DE PACIENTES.
- IV. - AGRUPACION ESTADISTICA Y RESULTADOS.
- V. - ESTUDIO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.
- VI. - RESUMEN Y CONCLUSIONES.
- VII. - BIBLIOGRAFIA.

PRINCIPALES ETAPAS DE LA BIOSINTESIS DEL COLESTEROL.



CAPITULO I .

I N T R O D U C C I O N .

RAZON DE ESTUDIO: La razón de éste trabajo es demostrar practicamente, si el método que proponemos para la determinación del Colesterol Total en Suero, dará resultados analíticos exactos y reproductibilidad, mayores a los métodos actualmente en uso en los trabajos rutinarios. Tomando en consideración que para elegir un nuevo procedimiento tenemos que basarnos en circunstancias tales como: la interferencia por sustancias extrañas, como la bilirrubina u otros - cromógenos; rapidez; medios disponibles, y manipulaciones necesarias para la preparación de las muestras y el desarrollo de la técnica.

Ya que la gama de procedimientos disponibles es tan grande, y el progreso se hace con tal rapidez, no debemos aceptar un procedimiento como bueno, hasta haberle evaluado cuidadosamente frente a un método de referencia reconocida.

Es por ello, que éste trabajo se enfocará a la determinación práctica de - Colesterol total en suero, tanto en la técnica que vamos a evaluar, como en las técnicas clásicas y sus modificaciones.

Los métodos estudiados son los siguientes:

1.- Métodos de referencia o comparativos:

- a).- Método de Bloor.
- b).- Método de Bennie Zak, de precipitación con cloruro férrico y de desarrollo de color con el mismo reactivo.
- c).- Método de Bennie Zak, de precipitación con mezcla Alcohol-Acetona y desarrollo de color con cloruro férrico amónico.

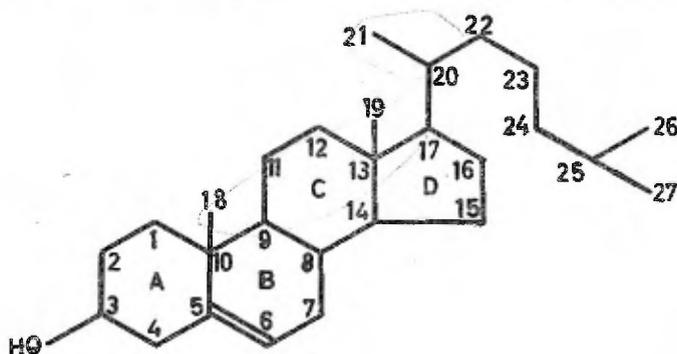
2.- Método propuesto:

Modificación al método c)., sin hacer previamente la precipitación - con la mezcla alcohol-acetona, usando únicamente el reactivo de cloruro férrico amónico, con una concentración diferente, para que actúe como precipitante y desarrollo del color.

ESTRUCTURA, CONSTANTES FISICAS Y QUIMICAS DEL COLESTEROL: Los análisis microanalíticos más modernos llevados a cabo con los procedimientos exactos de Pregl, han fijado definitivamente como la fórmula condensada del colesterol:

$C_{27}H_{46}O$.

Este nombre está en relación con el hecho de que el único átomo de oxígeno en su molécula, está formando parte de un grupo oxidrilo para quedar: $C_{27}H_{45}OH$, y consecuentemente es un alcohol superior, monovalente, secundario, no saturado, tetracíclico, con un hidroxilo en el carbón 3, y un doble enlace entre los carbonos 5 y 6 que pueden dar un gran número de derivados, y cuya fórmula es:



En la fórmula, como se acepta en la actualidad se pueden ver: el núcleo ciclopentanofenantreno con sus 3 anillos hexagonales y uno pentagonal, numerándose los átomos de carbono del 1 al 17; los carbonos 18 y 19 corresponden a los grupos metilos en posición 10 y 13; los carbonos del 20 al 27, corresponden a la cadena lateral; el grupo hidroxilo está ubicado en posición 3 y le dá el carácter de alcohol secundario mencionado anteriormente.

Los 4 anillos forman el núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno, característico de los esteranos, de donde se derivan los esteroides por el oxidrilo que tienen insertado en el carbono 3, éstos esteroides están desprovistos de actividad hormonal y se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza tanto animal como vegetal, formando una gran variedad de compuestos cuyo significado fisiológico es diverso. Además los esteroides tienen derivados entre los que se encuentran sales biliares; hormonas; esteroides; vitaminas; etc.

El nombre químico más aceptado para el colesterol es: Δ^5 -colesteno-3- β -ol. El símbolo Δ^5 indica la presencia y la posición de un doble enlace entre los carbonos 5 y 6, y el término 3- β -ol, indica la presencia, la posición y la dirección de orientación del grupo hidroxilo. En el colesterol, el grupo OH con orientación β formarán derivados insolubles con digitonina, un reactivo sumamente útil, para la separación analítica de colesterol del suero y otros esteroides con hidroxilos en orientación α .

PROPIEDADES FISICAS.- Sólido que cristaliza en placas r**ó**mbicas, pequeñas ó grandes, insaboras, inodoras, brillantes, con un vértice desprendido y la fractura semeja la forma de un escal**ó**n, $d = 1.067$, P.F. = 148.5°, sublima hacia los 350°C descomponiéndose en parte. Insoluble en agua, soluble en solventes orgánicos; éter, cloroformo, sulfuro de carbono, alcohol hirviente, aceites grasos ácidos grasos (oleico) y ciertos lipoides. Las soluciones cloroformicas del colesterol, al 2% tienen poder rotatorio levógiro de (-)37.1°.

No obstante que el colesterol es insoluble en agua, en el seno de ésta forma suspensiones coloidales, cuyas micelas electronegativas hacen del líquido - un coloide anódico, como tal se conduce como hidrófugo, siendo sus suspensiones precipitables por soluciones alcalinas.

PROPIEDADES QUIMICAS.- En 1891, OVERTON forma un grupo químico con el colesterol, las lecitinas, el protargol y la cerebrina que cataloga como lipoides.

Estos compuestos encierran radicales de ácidos contenidos en lípidos, cuando éstos no estén unidos a otros compuestos por ligadura éster.

El colesterol presenta diversas reacciones de coloración que lo caracterizan, entre las cuales tenemos las siguientes:

1.- Reacción de Salkowsky:

Formación de color rojo sangre que se desarrolla en solución cloroformica de colesterol, cuando se agita con igual volumen de H₂SO₄ concentrado. El H₂SO₄ muestra al mismo tiempo una fluorescencia verde en medio anhidro y en presencia de un ión metálico.

2.- Reacción de Windaus:

Una solución diluida de colesterol en alcohol caliente, se trata en solución con digitonina al 1% en alcohol de 90°. Aparece un precipitado blanco quecino insoluble.

3.- Reacción Microquímica:

El ácido ósmico es reducido parcialmente por el colesterol y sus ésteres formando un tinte café oscuro que pasa al negro.

4.- El Sudan III y la Ancusa:

En solución alcohólica (alcohol a 70°) dá color anaranjado a los ésteres del colesterol.

5.- Reacción de Liebermann-Bouchardat:

Imparte color verde a la solución cloroformica de colesterol, cuando se trata en medio anhidro con H₂SO₄ concentrado y anhídrido acético.

FISIOLOGIA.- El colesterol tiene varias funciones: Como regular la permeabilidad celular por modificación de la tensión superficial e interfacial de la membrana; transportados de lípidos en el organismo; poder antitóxico contra ciertos venenos, y participación en algunos procesos de inmunización. Es materia prima para la formación de ácidos biliares; hormonas; esteroides, tanto sexuales como corticosuprarrenales; y al parecer, también a su costa se forman ciertas sustancias cancerígenas.

El colesterol se encuentra en el grupo de las esterinas, y se incluyen entre los lipoides. De todas las esterinas, el colesterol, es el único que existe en los vertebrados como componente de las células del cuerpo. Está muy difundido en el organismo, cuyas células y líquidos la contienen en forma libre y en forma de éster de ácidos grasos superiores. Su esterificación se debe a su grupo alcohólico. La relación entre el colesterol libre y el combinado difiere bastante de un organismo a otro; depende además, según parece, de las condiciones funcionales del organismo.

Está perfectamente comprobado que el cuerpo no necesita depender del ingreso de colesterol con los alimentos, si no que puede sintetizarlo.

El colesterol que ingresa con la alimentación es absorbido por el intestino, al parecer de un modo análogo a los ácidos grasos y la colaboración de los ácidos biliares, numerosos experimentos en animales demuestran que no es éste el único medio de que dispone el organismo para procurarse su colesterol. Así, se ha observado con mucha frecuencia un balance de colesterol negativo, es decir que la eliminación de éste es mayor que el ingreso: se ha comprobado también que aumenta en el huevo de gallina durante la incubación, y que perros jóvenes alimentados por espacio de varias semanas con una dieta exenta de colesterol, tengan una cantidad mayor que los hermanos nacidos al mismo tiempo y sacrificados y examinados inmediatamente después de nacer (BEUMER). Estos hechos no pueden explicarse suponiendo que quizá tenga lugar una absorción y transformación de esterinas vegetales, pues se ha visto que ninguna de las fitosterinas estudiadas atraviesan la pared intestinal, si no que son eliminadas por las heces sin sufrir ninguna alteración (SCHONHEIMER).

El colesterol tomado en los alimentos es absorbido en su totalidad pasando a la sangre, (Laudat demostró que en ayunas y después de comida rica en colesterol, el aumento es breve, pero existe).

SOKOLIAFF hace notar que los carnívoros (hombre, perro, gato, etc.) apenas si presentan ligero aumento en la cifra del colesterol sanguíneo, cuando se so

meten a una dieta carente de colesterol. Para que sea absorbido requiere la presencia de bilis, que lo emulsiona, y se recoge por los quilíferos intestinales y es vertida en los ganglios mesentéricos, que la llevan a la cisterna de Pasquet; pasando luego al canal torácico que la vierte a la circulación sanguínea al desembocar en la vena subclavia izquierda, la que lo lleva a la vena cava superior y ésta al corazón, en donde pasa a la aorta para llevarlo a los tejidos.

Según THANNHAUSER es condición indispensable que el colesterol esté disuelto en alguna grasa, para que se realice su absorción.

WECKER-HUSCK aseveran que el colesterol en la sangre se encuentra exclusivamente al estado libre; en el plasma se halla en combinación, esterificado y accesoriamente en forma de complejos próteocolestericos.

FORMACION DEL COLESTEROL.- El origen en la sangre puede ser endógeno y exógeno. El exógeno es aquel que es absorbido diariamente del tubo digestivo, por ingerirlo con los alimentos.

El endógeno se forma en las células, prácticamente todo el colesterol endógeno circulante unido a lipoproteínas es sintetizado por el hígado; pero es probable que las demás células formen un poco, como parece demostrarlo el que muchas estructuras de membranas celulares estén compuestas en parte por esta sustancia, siendo la cantidad de colesterol del organismo es expresión de un equilibrio dinámico entre el absorbido y sintetizado.

Por lo que respecta al colesterol exógeno, sabemos que desde el momento en que todos los tejidos, especialmente los de origen animal, contienen colesterol, libre y esterificado, su ingestión es una fuente permanente de ingreso en el organismo. Así una dieta mixta común contiene alrededor de 0.5 g. de colesterol como mínimo, y éste contenido se incorpora como tal al organismo.

METABOLISMO DEL COLESTEROL.- Estrictamente hablando los organismos animales tienen prácticamente sólo dos esteroides: El colesterol, que forma la mayor parte de ellos, y el 7-deshidrocolesterol, que puede ser sintetizado por el organismo a partir de colesterol, por una reacción fotoquímica que se produce en la piel. Los demás esteroides existentes en el organismo: Acidos biliares, hormonas esteroides y vitamina D, se consideran productos del metabolismo del colesterol.

BIOSINTESIS DEL COLESTEROL.- Aunque la estructura del colesterol es compleja, se puede efectuar su biosíntesis a partir de precursores bioquímicamente muy simples. Los radicales de acetato, principalmente en forma de acetyl-CoA,

son lo que el organismo necesita como materia prima. Por consiguiente, muchos aminoácidos, carbohidratos y ácidos grasos ingeridos en exceso de otras necesidades metabólicas pueden contribuir al fondo común de colesterol.

El hígado es el lugar de síntesis principal, pero la piel, adrenales, gónadas, intestino e incluso la aorta pueden efectuar la biosíntesis del colesterol. Se estima que el hígado puede producir 1.5 g. diarios, y que los tejidos extrahepáticos pueden producir 0.5 g. por día. Por ello, la cantidad total de colesterol producido a partir de acetato ó de otras fuentes es aproximadamente 2 a 3 tantos la cantidad, que se consume preformada en una dieta representativa normal.

Esta síntesis ha sido estudiada particularmente en el hígado y en la levadura, y se realiza mediante un mecanismo casi idéntico en ambos casos, a partir de moléculas de acetato, las etapas entre éste y el colesterol, son muchas y se ennumerarán tan solo las de mayor importancia.

Existen gran número de sistemas enzimáticos que catalizan estas etapas, - las cuales requieren, según el caso, coenzimas; iones metálicos, etc. Puede considerarse como etapa inicial, la condensación del acetato (I) con el acetilacetato (II), ambos activados por unión con la HSCoA, y catalizada por una enzima condensante, se encuentra en los microsomas del hígado, al producirse la condensación, una de las moléculas de HSCoA se separa formándose 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA(III); ésta substancia puede producirse en el organismo a partir de la Leucina, que se reduce por acción de enzimas solubles que toman el hidrógeno de la NADPH₂, formando el ácido mevalónico(IV), que se usa habitualmente en forma de lactona(V), en éste proceso se separa del sustrato la otra molécula de HSCoA.

El mevalonato es fosforilado y pirofosforilado, por un sistema enzimático en presencia de iones Mg⁺⁺ y Mn⁺⁺, originándose el ácido mevalónico-3-fosfato-5-pirofosfato(VI), que por acción enzimática pierde ácido fosfórico, H₂O y un hidrógeno carbónico, formándose isopentenilpirofosfato(VII) que se isomeriza a dimetil-alil-pirofosfato(VIII), mediante una reacción reversible. Posteriormente éstos 2 isómeros de 5 átomos de carbono, se condensan entre sí, dando un compuesto de 10 carbonos, el geranyl-pirofosfato (IX) perdiendo una molécula de pirofosfato. Después se presenta una reacción de adición entre el geranyl-pirofosfato(IX) y el isopentenil-pirofosfato(VII), con pérdida de una molécula de pirofosfato, formándose el farnesil-pirofosfato(X), de 15 carbonos. Finalmente dos moléculas de éste se condensan por el extremo que contiene el radical pirofosfato, liberándose y formando así la molécula simétrica de 30 carbonos; de es-

cualeno(XI).

Mientras el escualeno es un hidrocarburo alifático de 30 átomos de carbono el colesterol, que deriva de él, es un compuesto alicíclico que tiene 4 ciclos, 27 átomos de carbono y una función alcohólica. En la lanolina se encontró un hidrocarburo alicíclico hidroxilado, el Lanosterol(XIII), que tiene estructura semejante a la del colesterol, y 30 átomos de carbono.

La etapa siguiente, consiste en una oxidación, que elimina 3 átomos de carbono que el Lanosterol(XIII) tiene en exceso con respecto al colesterol. Estos carbonos, constituyen grupos metilos, en la posición 4 y 14, se oxidan a anhídrido carbónico, posiblemente esta oxidación se realice en etapas. Se origina así un nuevo esterol con 27 átomos de carbono, con una doble ligadura entre los carbonos 8 y 9 (como el lanosterol). Además de la doble ligadura de la cadena lateral entre los carbonos 24 y 25, denominado Zimosterol(XIV).

Después por otro mecanismo enzimático se reduce la doble ligadura entre los carbonos 8 y 9 del Zimosterol, creando otra entre los carbonos 24 y 25, denominándose Demosterol, que se ha encontrado en pequeñas cantidades en los tejidos, los cuales pueden reducirlo con rapidez para formar Colesterol (XIII).

BIOSINTESIS DEL COLESTEROL EN LOS TEJIDOS.- El colesterol como ya se dijo, es sintetizado principalmente en el hígado, pero casi todos los órganos de los mamíferos son capaces de realizar la síntesis, siendo los más activos después del hígado la piel y el intestino.

En orden de actividad decreciente figuran las suprarrenales, ovario, testículo, riñón y el pulmón, en ellos el colesterol se encuentra combinado como lipoproteínas. La síntesis de colesterol en el hígado tiene una autoregulación de mecanismo desconocido y determinado por el propio colesterol de las células hepáticas. Cuando aumenta su contenido la síntesis disminuye, y si disminuye, la síntesis aumenta. El aumento ó disminución de la síntesis del colesterol repercute sobre la tasa de β -lipoproteínas sanguíneas y de su contenido en colesterol.

La síntesis del Colesterol es muy activa en el intestino. La piel sintetiza muy activamente colesterol y 7-Deshidrocolesterol, que es el precursor de la vitamina D. El cerebro muestra gran capacidad de síntesis durante el proceso de mielinización, pero cuando éste se ha cumplido, la síntesis disminuye ó se detiene. En casos de tumores cerebral-s la síntesis se mantiene activa. El tejido de la glándula suprarrenal, sintetiza los corticoesteroides y colesterol. El proceso se estimula por la administración de hormona adrenocorticotrófica (ACTH), del lóbulo anterior de la hipófisis. El tejido arterial ha sido -

estudiado intensamente desde el punto de vista experimental, especialmente la AORTA, y su capacidad de síntesis del colesterol es, en general, pequeña y va ria con la especie animal estudiada.

Las glándulas gonadales (testículo y ovario) son lugares de síntesis muy activa de colesterol; en ellas es precursor de hormonas andrógenas y estrógenas.

INHIBICION DE LA BIOSINTESIS DEL COLESTEROL. Se han preparado numerosas - sustancias que son capaces de inhibir la biosíntesis del colesterol, tanto - "in vivo" como "in vitro" , son importantes desde el punto de vista de las al teraciones del metabolismo del colesterol. Las más importantes son: El ácido - -metil- -fluorometilmevalónico (ácido fluorometilmevalónico); las sales de va nadio ej.: el sulfato de vanadilo; también la ingestión de ácido nicotínico en cantidad de 1 a 4 g. diarios, pero no de niconinamida, ésta reduce el colesterol sanguíneo en personas normales e hipercolesterolémicas.

CATABOLISMO DEL COLESTEROL.- No se sabe si el organismo es capaz de oxidar totalmente al colesterol, y aunque algunas experiencias por balance demuestran esta posibilidad, no tenemos ningún esquema que lo pueda explicar. El mecanismo más común del aprovechamiento del colesterol ingerido ó sintetizado, es su conversión en otras sustancias.

Tres transformaciones principales experimenta el colesterol:

- a).- La formación de ácidos biliares se hace en el hígado y representa el 75% del colesterol metabolizado diariamente;
- b).- Las hormonas esteroides que originan las glándulas suprarrenales, y
- c).- La de vitamina D presumiblemente sólo en la piel.

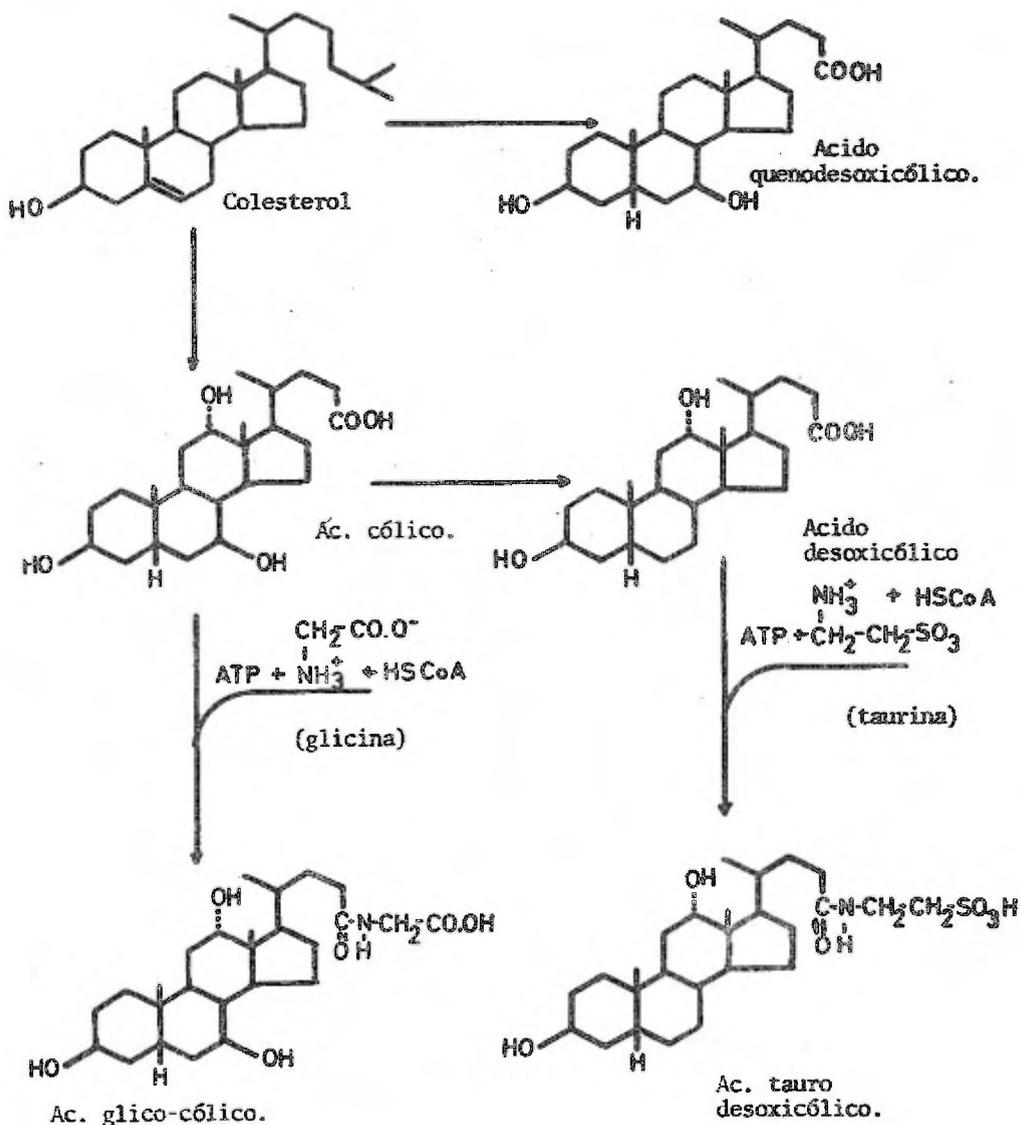
REGULACION ENDOCRINA METABOLISMO DEL COLESTEROL.- Las hormonas que regulan la producción de progesterona y de las corticosteroides desempeñan un papel en la regulación del metabolismo del colesterol, por ser un antecesor de esas - - sustancias, además de otras acciones de orden general. En la hiperactividad - de la tiroides, el colesterol de la sangre tiende a disminuir sin variar la re lación de colesterol libre/colesterol esterificado, mientras que en los esta dos de hipoactividad (mixedema), se presenta aumento de una o ambas fracciones en forma constante. Las hormonas sexuales femeninas, especialmente la estrona parecen vincularse con el metabolismo del colesterol.

Las relaciones que la hipófisis anterior guarda con el metabolismo del co lesterol dependen de la acción que ésta glándula tiene sobre las restantes - - glándulas endócrinas. La cortisona, hormona de la corteza suprarrenal, produ ce aumento del colesterol sanguíneo al sexo masculino, y lo mismo ocurre por

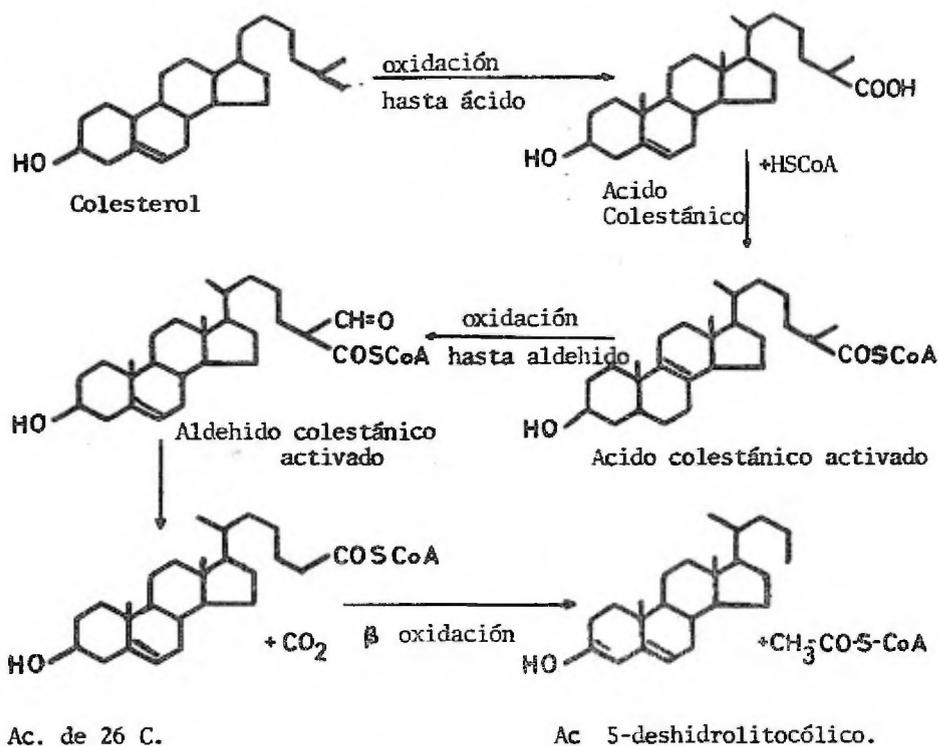
administración de adrenocorticotrofina del lóbulo anterior de la hipófisis, que estimula la secreción de la primera.

ELIMINACION DEL COLESTEROL.- El colesterol en circulación puede ser eliminado por el hígado en forma de ácidos biliares o de sus sales.

ESTRUCTURA DE LOS PRINCIPALES ACIDOS BILIARES HUMANOS.



DEGRADACION DE LA CADENA LATERAL DEL COLESTEROL.



La conversión del colesterol en cada uno de los ácidos biliares, supone la introducción de 1 ó 2 grupos hidroxilos, todos en la configuración alfa, y la oxidación parcial de la cadena lateral alifática para introducir un grupo carboxilo. Los ácidos biliares simples pueden experimentar más modificaciones por condensación con glicina o taurina, para formar los llamados ácidos biliares - conjugados. Estos ácidos no solo requieren colesterol para su propia formación sino que pueden formar complejos con colesterol no alterado, y al hacerlo facilitan su eliminación.

Si se descompone en la vesícula biliar el complejo ácidos biliares-colesterol, éste puede depositarse sobre algunos núcleos microscópicos y formar cálculos biliares que pueden crecer en diversos tamaños y que a menudo contienen - de 60 á 80% en peso de colesterol.

En el intestino, las sales biliares sirven para emulsionar las grasas inge

ridas y facilitar su digestión. Durante la fase de absorción, parte de las sales biliares son reabsorbidas con los ácidos grasos que resultan de la digestión de los lípidos. Las sales biliares forman complejos moleculares con los ácidos grasos y con los esteroides, así, los ácidos biliares producidos por el hígado pasan al intestino y regresan parcialmente al hígado.

Este proceso se llama circulación entero-hepática y es importante por facilitar la eliminación de esteroides y la absorción de los ácidos grasos.

EXCRECIÓN DEL COLESTEROL.- Se considera que la excreción de colesterol y sus derivados se hace principalmente por 2 vías: La piel y el Intestino. La orina no es conducto de excreción normal y solo eventualmente aparece colesterol en ella, cuando por alteración renal se eliminan lipoproteínas, o cuando por quíloria se excretan las mismas sustancias encontradas en la linfa.

La piel se considera una vía normal de excreción de esteroides por la secreción de grasas o cebo cutáneas, y se ha demostrado que contiene colesterol y aún algunos de sus precursores, como el escualeno, y aproximadamente la excreción cutánea de colesterol es 100 mg. por día.

El Intestino se considera la vía principal de excreción de colesterol y sus productos del catabolismo. Las heces siempre tienen colesterol, y varía de 0.5 a 1 g. por día su eliminación.

COLESTEROL LIBRE Y ESTERIFICADO.- Como alcohol, puede formar ésteres con muchos ácidos grasos de cadena larga, y normalmente existe dos tercios del colesterol total en circulación en esta forma. El hígado parece ser el lugar de mayor esterificación, aunque se encuentra también esterasa de colesterol en el páncreas, y en la mucosa intestinal. La reacción de esterasa parece ser reversible, pero el pH óptimo para la hidrólisis de ésteres es más bajo, de 4.7 a 6.1. Las sales biliares son esenciales para que la reacción transcurra en cualquiera de las dos direcciones.

En el plasma existe una segunda enzima que puede formar ésteres de colesterol a partir del alcohol libre en presencia de fosfatidilcolina. Esta enzima se describe mejor como una transferasa, por lo que parece tomar ácidos grasos insaturados en la posición fosfatidilcolina y transferirlos a la función alcohólica del esteroide. Las dos enzimas son de importancia analítica ya que su función sigue después de extraída la sangre.

Esto significa, que la relación entre colesterol libre y colesterol esterificado en las muestras de sangre recogidas cambiará con el tiempo, incluso a temperaturas bajas en refrigerados, hecho muy importante en el laboratorio para no retrasar su cuantificación.

En el pasado, se concedía gran interés a la distribución del colesterol total entre las dos formas, en los últimos años ha disminuido, el entusiasmo por que la relación no se altera substancialmente, salvo en enfermedad hepática grave. Estudios de la distribución, pueden tener modestos valores en la distinción entre enfermedad intrahepática y posthepática.

COLESTEROL EN LA SANGRE Y EN LOS TEJIDOS.- El colesterol existe en los tejidos y en la sangre en 2 formas: colesterol libre y como ésteres del colesterol, combinado con los ácidos grasos.

Anotaremos en el siguiente cuadro comparativo la concentración del colesterol en sus diversas formas en cada uno de los componentes de la sangre, expresando su concentración en 100 ml. del constituyente.

Constituyente	Libre	Esterificado	Total
Sangre	80	110	190
Eritrocitos	120	80	150
Leucocitos	240	80	320
Plasma	50	170	220

La formación de ésteres de colesterol estará determinada por una enzima denominada colesterol-esterasa cuya presencia se ha demostrado en el plasma, y otros tejidos. Tanto el colesterol libre, como el esterificado se encuentran en la sangre y en los tejidos unidos a proteínas (lipo-proteínas).

ASPECTOS PATOLOGICOS QUE CAUSAN SUS ALTERACIONES.- Antes de mencionar los padecimientos que causan las alteraciones del colesterol, haremos mención de los factores que modifican la concentración del colesterol. Los más importantes son los siguientes:

- 1.- Un aumento de la cantidad de colesterol ingerido cada día, eleva ligeramente la concentración en el plasma, pero en condiciones normales el hígado compensa este aumento formando menos colesterol.
- 2.- Una dieta "muy rica" en grasa, lo puede elevar en 40 á 50 mg. Esto se debe probablemente a que se almacena más grasa en el hígado, aumentando el metabolismo graso y libera en células hepáticas mayores cantidades de acetil-CoA, a cuya expensa se forma colesterol.
- 3.- Cuando se ingieren ácidos grasos no saturados baja un poco la concentración de colesterol sanguíneo.
- 4.- La falta de hormona tiroidea eleva el colesterol sanguíneo y el hiper

tiroidismo lo disminuye, y se cree que sea una consecuencia del aumento del metabolismo lípido por tiroxina.

- 5.- En caso de diabetes sacarina, sube el colesterol; parece ser también, debido al aumento del metabolismo de grasas que acompaña a este estado.
- 6.- Ciertos padecimientos renales con retención se acompañan de hipercolesterolemia, como de aumento paralelo de triglicéridos y fosfátidos en la sangre. Al parecer, las lipoproteínas ya no son eliminadas del plasma, y su concentración aumenta mucho.

ALTERACIONES: se clasifican en fisiológicas y patológicas.

Entre las alteraciones fisiológicas tenemos: La edad (los recién nacidos presentan de 50 a 70 mg.%, normalizándose en algunos meses con tendencia a aumentar con el crecimiento); el sexo (en la mujer aumenta al iniciarse la menstruación y durante ella es normal), en el embarazo hay incremento a medida que avanza, decreciendo la cifra en la época del parto, se eleva nuevamente alcanzando un máximo a los 10 días "post partum" para descender paulatinamente hasta llegar a cifras normales entre los 10 días siguientes.

Entre las alteraciones patológicas tenemos: aumento en la diabetes, de conformidad con el grado de uso de los lípidos, como energéticos, en vez de glúcidos, lo que nos da un índice de la gravedad de este padecimiento.

En hepatopatías, se observa también un incremento de la colesterolemia, como la ictericia hepática, la alteración de la relación colesterol libre/colesterol esterificado, es considerada como una prueba de éste padecimiento hepático, y de acuerdo con las cifras obtenidas en el análisis, ésta relación se verá alterada en otros padecimientos del hígado, ya sea que esté o no alterado el dato de colesterol total.

La nefrosis lipoidea, también presenta elevación del nivel del colesterol sérico.

Hipocolesterolemias las encontramos en anemias como: perniciosa; hipocrómica grave; hemolítica y otras. En hipertiroidismo; glomérulo-nefritis avanzada; debilidad; tuberculosos, etc.

En general los niveles de colesterol sérico son opuestos a la actividad de la tiroides, las alteraciones antes mencionadas se consideran como secundarias a esos trastornos, las modificaciones al metabolismo de las grasas del colesterol, como: xantomatosis lipoidea; enfermedad de Hand-Schuller-Christian; la de Gaucher; la de Von Greyke, y otras también presentan alteraciones significativas.

Quando se forman depósitos de colesterol y otros lípidos en la íntima de

las arterias origina las lesiones conocidas con el nombre de Arteromatosis, el mecanismo de la formación no está aclarado, pero algunos autores suponen que se halla en relación con el contenido de lipoproteínas del suero, y en especial de algunas fracciones de baja densidad ricas en colesterol.

Experimentalmente se ha demostrado en algunas especies animales (conejos)- la ingestión de colesterol produce lesiones ARTEROMATOSAS.

ARTERIOESCLEROSIS.- Es enfermedad de las grandes arterias; se caracteriza por aparecer depósitos de lípidos llamados "PLACAS ARTEROMATOSAS", por debajo de la íntima estas placas contienen mucho colesterol y simplemente se llama "Depósitos de Colesterol". Suelen asociarse con cambios degenerativos de la pared arterial. Cuando la enfermedad ha progresado bastante, hay infiltración fibroblástica de las zonas degenerativas, que causa esclerosis progresiva en el vaso. Además de lípidos, es frecuente la precipitación simultánea de calcio, lo que ocasiona el desarrollo de "Placas Calcificadas".

Cuando se presentan ambos fenómenos, las arterias se vuelven rígidas, y el trastorno pasa a llamarse ARTERIOESCLEROSIS o simplemente "endurecimiento de las arterias". Naturalmente, los vasos arterioescleróticos pierden casi toda su elasticidad; además, se rompen con facilidad debido a la presencia de zonas de degeneración. Frecuentemente las placas arteriomatosas sobresalen de la íntima en la luz del vaso, donde su superficie rugosa facilita la aparición de coágulos, conformación de trombos y émbolos.

Casi las 2/3 parte de los seres humanos que mueren de arterioesclerosis; dependen de trombosis de una o varias arterias coronarias; el otro tanto de trombosis o hemorragias en otros campos vasculares; cerebro, riñones, hígado, tubo digestivo, miembros, etc.

En resumen, es casi seguro que la arterioesclerosis depende de una anomalía del metabolismo lípido; pero también la aumenta cualquier factor que lesione la pared arterial. La hipercolesterolemia suele tener relación especialmente estrecha con la arterioesclerosis.

Finalmente, es posible que tenga mayor importancia que todos ellos un tercer factor desconocido, heredado genéticamente, que aumente la producción o el depósito de colesterol en las paredes arteriales mismas, independientemente de las cifras de colesterol en sangre.

CAPITULO II.

MATERIAL Y METODOS.

El deseo de preparar una modificación para implantar un método rápido en ésta determinación, nos ha impulsado a estudiar, un tanto a fondo, los métodos conocidos; básicamente se reducen a dos sistemas que estudian la reacción fundamental, en cada uno de los métodos se expondrá la reacción química a desarrollarse.

El método de Bloor, que se basa en la reacción de Lieberman y Buchardat; se realiza en medio anhidro empleando anhídrido acético y ácido sulfúrico concentrado, la reacción esquemática se describe en el desarrollo del método. Este fue elegido por considerarse clásico, ha permanecido en uso por mucho tiempo, no habiéndose descartado su empleo en muchos laboratorios de análisis clínicos.

Los métodos de Bennie-Zak, se fundan en la reacción de Salkowsky, en ésta no es requisito indispensable hacerse en medio anhidro, emplea como reactivo colorante básico el FeCl_3 , y ácido sulfúrico, dándonos un color diferente al del método de Bloor; el autor ha desarrollado dos métodos diferentes, el primero empleando como reactivos precipitante de protefínas, y cromógeno una solución acética de cloruro férrico hexahidratado; éste método no requiere de extracciones previas, el reactivo es usado directamente: El segundo método sí emplea la extracción del colesterol de un filtrado libre de protefínas que se prepara con una mezcla alcohol anhidro-acetona, este filtrado se evapora a sequedad y de ahí se extrae el colesterol con ácido acético glacial, sobre este extracto se hace reaccionar cloruro férrico amónico con ácido sulfúrico concentrado. La reacción se describirá también en la explicación de los métodos.

En los tres casos la reacción colorida es cuantitativa, y la concentración del colesterol estará en razón directa de la concentración (propiamente a la densidad óptica) de la coloración, indicándonos que a mayor coloración, mayor será el contenido de colesterol.

El uso del cloruro férrico amónico, ha venido en ayuda de la estabilidad del reactivo, ya que el cloruro férrico simple (hexahidratado), por ser esta substancia una sal higroscópica, que impide en muchas ocasiones tener su concentración en el reactivo, en cambio el cloruro férrico amónico (desarrollado

no hace mucho tiempo), es una sal absolutamente estable.

Esta característica nos ha hecho pensar que modificar el método original de Bennie-Zak, primeramente citado, evitando los pasos de precipitación con mezcla alcohol-acetona, extracción al calor con ácido acético glacial, ayudará en forma amplia para ahorro de tiempo, errores y otras características, aunado a la posibilidad de tener los caracteres propios de un método analítico clínico, como son: exactitud, reproducibilidad; facilidad de ejecución por su simplicidad; eliminación de posibles errores de método, etc., por lo que de los resultados encontrados propondremos nuestra modificación para su empleo como método de rutina en el laboratorio.

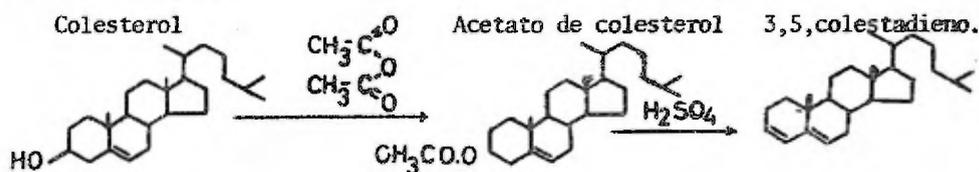
Por otro lado, es sabido que la bilirrubina en el suero nos impide tener resultados satisfactorios en todos los métodos conocidos y empleados actualmente, citaremos los resultados obtenidos con algunos sueros ictericos, pero dejaremos para otro estudio que se está haciendo el encontrar las conveniencias o inconveniencias de esta circunstancia, nosotros empleamos únicamente el $Al(OH)_3$ como agente adsorbente de la bilirrubina y señalaremos los resultados logrados tentativamente, sin tratar de usar otros adsorbentes de bilirrubina.

Al describir y usar los métodos que se incluyen en este trabajo, lo hacemos siguiendo una secuela que consideramos básica, y consiste en: Nombre del método fundamento; reacción química esquemática; material químico (reactivos); material de laboratorio; material biológico; descripción del método; espectrograma; establecimiento de la gráfica de calibración; tabla de lecturas, y observaciones.

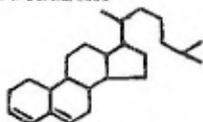
METODO DE BLOOR.

Fundamento: Por ser las proteínas séricas, sustancias que interfieren en la reacción de Lieberman-Buchardat, se precipitan casi mezcla alcohol - - eter; el filtrado así obtenido se evapora a sequedad para tener, por un lado la seguridad de medio anhidro y por otro residuos de colesterol (libre y esterificado), éste es extraído con tres alicuotas sucesivas de cloroformo anhidro, que se lleva a un volumen determinado, ahí se verifica la reacción base al adicionar anhídrido acético y ácido sulfúrico, o bien la mezcla previa de ambos reactivos. Se desarrolla coloración verde esmeralda cuantitativa colorimétricamente.

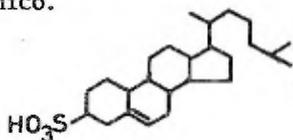
Reacción química:



3,5,colestadieno



Ac. Colestenil
monosulfónico.



Material Químico.

1.- Mezcla alcohol eter.

Fórmula:	Alcohol etílico 95-96°C.L.	3 partes.
	Eter etílico Q.P.	1 parte.

2.- Cloroformo anhidro, Q.P.

3.- Anhidrido acético, Q.P.

4.- Acido sulfúrico, Q.P.

5.- Solución patrón de colesterol 100 mg/100 ml. en solución cloroformica.

6.- Solución tipo de colesterol en cloroformo, a partir de la solución patrón, como adelante se indica.

Material de Laboratorio.

1.- Tubos aforados a 5 y 10 ml.

2.- Pipetas serológicas de 1,5 y 10 ml.

3.- Matraces aforados de 25 y 100 ml.

4.- Vasos de precipitados de 25 ml.

5.- Tubos de centrifuga graduados de 15 ml.

6.- Papel Whatman 41

7.- Centrifuga clínica.

8.- Espectro fotómetro Coleman Jr.6A, equipado con adaptador y celdillas 10 x 75.

Material Biológico.

Suero o plasma sanguíneo, éste, obtenido usando oxalato o EDTA como anticoagulante, NO HEMOLIZADO, procedentes de sangre venosa, de la que es separado por centrifugación, decantando cuidadosamente para separar o hacerlo con pipeta pasteur.

Descripción del método:

Preparar el número de matraces aforados de 25 ml. necesarios para los sueros a determinar y proceder como sigue:

A.- Mezcla alcohol-eter	10 ml.
Suero o plasma (adicionado lentamente)	1 ml.
Agitar y Reposar.	5 mu.
Mezcla alcohol-eter, cbp.	25 ml.
Agitar para homogeneizar.	
Filtrar en papel Whatman 41	
B.- Desproteínizado sérico.	5 ml.
Evaporar a sequedad en parrilla eléctrica de placa caliente.	
Hacer 3 extracciones sucesivas con cloroformo, ^c /u.	3 ml.
Calentando hasta ebullición sobre la placa caliente y vaciar al tubo aforado a 5 y 10 ml. las tres <u>ex</u> tracciones.	
Cloroformo cbp.	5 ml.
Anhidrido acético.	1 ml.
H ₂ SO ₄ QP.	0.1 ml.
Mezclar y reposar a la obscuridad.	20 min.
Leer el % de transmitancia.	640 mu.

ESPECTROGRAMA:

Se realizó con solución tipo de colesterol empleando longitudes de onda con variación de 10 a 10, desde 400 a 700 mu. en el espectrofotómetro Coleman Junior 6A. con celdillas de 10 x 75. Los espectrogramas obtenidos para los - - otros métodos se hicieron siguiendo la misma secuela, en tal forma que las gráficas logradas se dibujaron en una sola hoja, que tiene sus signos explicati- - vos, esto se hizo para poder comparar los resultados obtenidos.

· GRAFICA DE CALIBRACION.- Siguiendo la técnica descrita y empleando una - solución tipo en lugar del filtrado o extracción cloroformica, de la manera siguiente:

Solución tipo de Colesterol:

Fórmula: Solución Patrón	20 ml.
Cloroformo anhidro; cbp.	100 ml.
Concentración:	0.2 mg/ml.

DESARROLLO:

TUBOS	B	1	2	3	4
Solución tipo (ml).	0	1.0	2.0	3.0	4.0

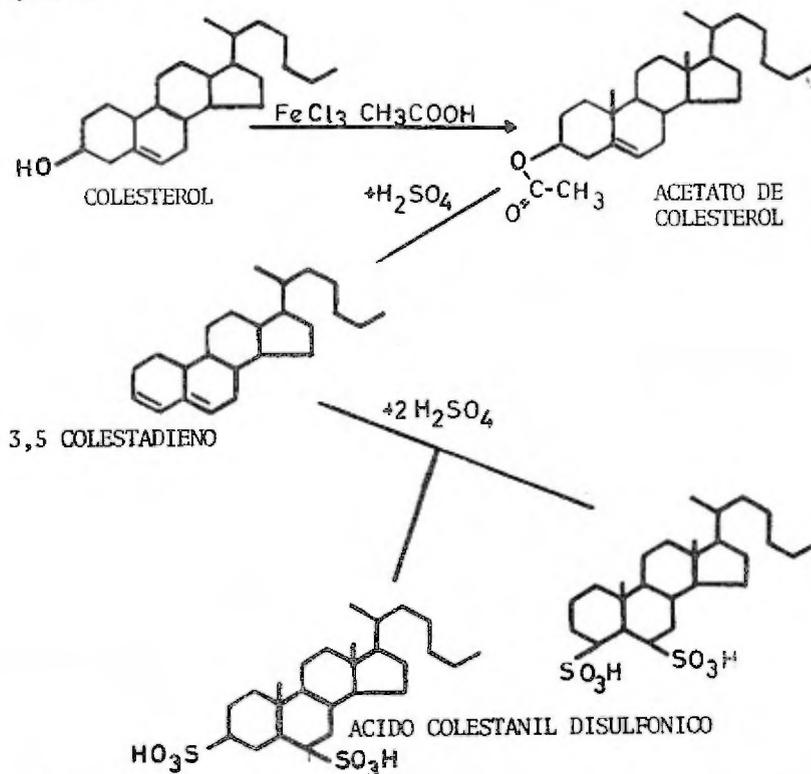
Cloroformo QP. (ml).	5.0	4.0	3.0	2.0	1.0
Anh. Acético (ml).	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
H ₂ SO ₄	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Mezclar y reposar en la obscuridad (min)	20	20	20	20	20
Lectura 640 mμ. en % de T.	100	74	56	42	31
Conc. final mg. colesterol/100 ml. suero	0	100	200	300	400

La Gráfica se dibuja en papel semilogarítmico, y aparece adelante en hoja por separado.

METODO DE BENNIE-ZAK.- Precipitación y desarrollo de color sin extracción, por solución $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ -Acido Acético.

FUNDAMENTO Al mezclarse una pequeña muestra de suero con reactivo de cloruro férrico-ácido acético, se precipitan las proteínas séricas, que son separadas por centrifugación; el colesterol, tanto libre como esterificado, reacciona con el ácido acético formándose un ester acetato de colesterol. Al adicionar el ácido sulfúrico QP., se forma el derivado di-eno, que se dimeriza. Como hay un exceso de H_2SO_4 , se forma, a partir del dímero un compuesto disulforado que imparte a la solución, color púrpura, reproducible y cuantificable.

Reacción Química:



Material químico.

1.- Reactivo precipitante de cloruro férrico.

Fórmula:	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	850 mg.
	$\text{CH}_3\text{-COOH}$ glacial, cbp.	1000 ml.

Guardar en frasco topacio, se conserva indefinidamente.

- 2.- Reactivo diluyente de cloruro férrico.
- | | | |
|----------|-------------------------------------|---------|
| Fórmula: | Reactivo precipitante (1) | 85 ml. |
| | CH ₃ -COOH glacial, cbp. | 100 ml. |
- Guardar en fraco topacio, se conserva por unas semanas.
- 3.- Acido acético glacial, Q.P.
- 4.- Acido sulfúrico, Q.P.
- 5.- Solución patrón de colesterol 1 mg/ml.
- | | | |
|----------|------------------------------------|---------|
| Fórmula: | Colesterol, QP. | 100 mg. |
| | CH ₃ -COOH glacial cbp. | 100 ml. |
- 6.- Solución tipo de colesterol: 0.1 mg/ml.
- | | | |
|----------|-------------------------------------|---------|
| Fórmula: | Solución patrón | 10 ml. |
| | Reactivo precipitante (1) | 85 ml. |
| | CH ₃ -COOH glacial, cbp. | 100 ml. |

Material de Laboratorio:

- Tubos de ensaye de 25 x 100.
- Pipetas serológicas de 1; 5, y 10 ml.
- Tubos de centrifuga graduados, de 15 ml.
- Centrifuga clínica.
- Espectro fotómetro Coleman Junior 6-A
- Adaptador y celdillas de 10 x 75.

Material biológico:

- Suero o plasma sanguíneo, recolectado en forma similar al método de Bloor, y para todos los métodos que se exponen.

Descripción del método:

- a) Desproteinización, en un tubo de centrifuga graduado:
- | | |
|---------------------------|---------|
| Reactivo precipitante (1) | 4.0 ml. |
| Suero o plasma | 0.1 ml. |
- Mezclar energicamente.
- Reposar 2-3 min.
- Centrifugar a 2500/3000 r.p.m. 10 min.
- b) Desarrollo del color, en un tubo de ensaye de 25 x 100:
- | | |
|--------------------------------------|---------|
| Sobrenadante de la centrifugación | 3.0 ml. |
| H ₂ SO ₄ , QP. | 2.0 ml. |
- Adicionado lentamente, y a continuación mezclar lateralmente o de preferencia con agitador magnético cubierto con teflón.
- c) Preparar un blanco en un tubo de 25 x 100:
- Solución diluyente

Solución diluyente (2)	3.0 ml.
H ₂ SO ₄ . QP.,	2.0 ml.

d) Comparación fotométrica.

El color desarrollado es estable durante varias horas, al calor y a la luz, inclusive directa. Se reposa mínimo 20 minutos y se hace la lectura a 560 mμ.

Espectrograma: Se desarrolló con solución tipo y se incluye la gráfica en conjunto con las obtenidas en los otros métodos.

Establecimiento de la gráfica de calibración: Empleando la técnica descrita, se realizó con la solución tipo preparado para éste método, en la siguiente forma:

Tubos				
Solución tipo (ml).	0	1.0	2.0	3.0
Solución diluyente (2)	3.0	3.0	2.0	1.0
Mezclar	+	+	+	+
Transvasar a tubo de 25x100 (ml).	3.0	3.0	3.0	3.0
H ₂ SO ₄ QP.	2.0	2.0	2.0	2.0
Mezclar por agitación lateral o mecánica	+	+	+	+
Reposar (minutos)	20	20	20	20
Leer a 560 mμ. el % T.	100	59	34	20.5
Concentración en mg. colesterol /100 ml. suero	0	100	200	300

La gráfica se dibuja en papel semilogarítmico, y aparece en hoja por separado.

METODO DE BENNIE-ZAK.- Desproteinización con mezcla Alcohol anhidro-Acetona, y Desarrollo de Color con $\text{FeCl}_3 \cdot 2\text{NH}_4\text{Cl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ y H_2SO_4 .

FUNDAMENTO: A diferencia del método descrito antes, éste mezcla una muestra de suero o plasma con reactivo de alcohol anhidro-acetona, para precipitar las proteínas séricas, las que se separan por centrifugación o filtración, entonces el filtrado se mide cuidadosamente para evaporarse a baño maría hasta completa sequedad. El colesterol se extrae con ácido acético en caliente, y se forma el acetato de colesterol por la acción catalizadora del cloruro férrico amónico. Al agregarse ácido sulfúrico se forma el colestadieno que se dimeriza y un exceso de ácido sulfúrico forma el disulfónico dando coloración púrpura a la solución, color que es cuantificable colorimétricamente.

Reacción química: La misma descrita en el método anterior.

Material químico:

1.- Mezcla alcohol acetona.

Fórmula:	Alcohol etílico anhidro	1 parte.
	Acetona QP.	1 parte.

2.- Reactivo de cloruro férrico amónico:

Fórmula:	$\text{FeCl}_3 \cdot 2\text{NH}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2.12 g.
	$\text{CH}_3\text{CO} \cdot \text{OH}$ de 80% cbp.	100 ml.

El reactivo recientemente preparado resulta algo turbio, por su lenta disolución, que desaparece al dejarlo reposar 1 noche. Guardar en frasco topacio. Estable a temperatura ambiente por varios meses.

3.- Acido acético glacial.

4.- H_2SO_4 , Q.P.

5.- Solución patrón de colesterol: La misma utilizada en el método anterior (solución acética) 1 mg/ml.

6.- Solución tipo de colesterol.

Fórmula:	Solución patrón	8.0 ml.
	CH_3COOH . glacial, cbp.	100.0 ml.
Concentración	0.8 mg. colesterol/ml.	

Material de Laboratorio:

Tubos de ensaye de 25 x 100

Pipetas serológicas de: 1; 5, y 10 ml.

Centrífuga clínica.

Tubos de centrífuga graduados, de 15 ml.

Espectrofotómetro Coleman Junior 6A.

Adaptador y Celdillas de 10 x 75.

Material biológico:

Suero o plasma sanguíneo, igual que los métodos anteriores.

Descripción del método:

a) Desproteínización: En un tubo de centrifuga aforado de 15 ml. poner

Reactivo alcohol acetona 10 ml.

Suero o plasma sanguíneo 1 ml.

Mezclar.

Reactivo alcohol-acetona, cbp. 12 ml.

Mezclar vigorosamente 1 min.

Filtrar en Whatman 41-H o centrifugar (si se filtra, cubrir el embudo con vidrio de reloj, para evitar evaporación).

b) Extracción: En un tubo de 25 x 100:

Filtrado 2.0 ml.

Evaporar a sequedad en baño maría.

Extraer con ácido acético glacial 3.0 ml.

c) Desarrollo de color: En el tubo en que se hace la extracción, y disolución del colesterol, se lleva a cabo la reacción de color:

Solución de cloruro férrico amónico 0.1 ml.

H₂SO₄, Q.P. 2.0 ml.

Mezclar por vibración, reposar hasta que la solución tome temperatura ambiente.

d) Comparación fotométrica.

Ya que la solución tomó temperatura ambiente, comparar con blanco de reactivos, a 560 mμ. haciendo la lectura de % transmitancia.

El color es estable por varias horas al calor y a la luz solar inclusiva directa.

Espectrograma: Se realizó con la técnica descrita desarrollándose con solución tipo, en la forma explicada en el método de Bloor, y se incluye en la hoja de gráficas.

Establecimiento de la gráfica de calibración: Empleando la técnica descrita, se realizó con solución tipo preparada para este método, en la siguiente forma:

Tubos		B	1	2	3
Solución tipo	(ml)	0	1.0	2.0	3.0
CH ₃ -CO.OH glacial	(ml)	3.0	2.0	1.0	0

Tubos.	B	1	2	3
Solución de cloruro férrico amónico (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1
Mezclar	+	+	+	+
H ₂ SO ₄ , QP.	2.0	2.0	2.0	2.0
Mezclar por vibración	+	+	+	+
Reposar hasta tomas temperatura ambiente	+	+	+	+
Leer con filtro 560 mμ	100	49	23	11
Concentración mg. colesterol/100 ml. suero	0	100	200	300

La gráfica se dibuja en papel semilogarítmico, y aparece en hoja por separado.

NOMBRE DEL METODO: BENNIE-ZAK, empleando cloruro férrico amónico para desproteí-
nizar y desarrollo de color. MODIFICACION PROPUESTA.

FUNDAMENTO: Aplicar el reactivo cloruro férrico amónico, por ser una sus-
tancia de mayor estabilidad, para el método expuesto en segundo lugar
su estabilidad ayuda a mayor conservación de la sal, máxima facilidad
para su pesaje, y otras facilidades que dá su uso. En el aspecto quí-
mico en primer término, se presenta la desproteínización, este preci-
pitado se separa por centrifugación y al sobrenadante se le adicio-
na ácido sulfúrico para llevar a cabo la sulfonación y por tanto el
desarrollo de color.

Reacción química: La descrita en los dos últimos métodos, por lo que no se
repite.

Material químico.

1.- Reactivo precipitante de cloruro férrico amónico:

Fórmula	$\text{FeCl}_3 \cdot 2\text{NH}_4\text{Cl} \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.7568 g.
	$\text{CH}_3\text{-CO.OH}$ glacial cbp.	1000.0 ml.

2.- Reactivo de dilución de cloruro férrico amónico:

Fórmula:	Sol. precipitante (1)	85 ml.
	$\text{CH}_3\text{-CO.OH}$ glacial, cbp.	100 ml.

Ambos reactivos, guardados en frasco topacio, son estables varios
meses.

3.- Acido acético glacial

4.- Acido sulfúrico, QP.

5.- Solución patrón de colesterol: La misma empleada en los métodos -
de Bennie-Zak 1 mg/ml.

6.- Solución tipo de colesterol:

Fórmula:	Solución patrón	10.0 ml.
	Reactivo precipitante de cloruro férrico amónico	85.0 ml.
	$\text{CH}_3\text{CO.OH}$ glacial cbp.	100.0 ml.
Concentración		0.1 mg/ml.

Material de Laboratorio.

Tubos de ensaye de 25 x 100

Tubos de centrifuga, graduados, de 15 ml.

Pipetas serológicas de: 1; 5, y 10 ml.

Centrifuga clínica.

Espectrofotómetro Coleman Junior 6A.

Adaptador y celdillas de 10 x 75.

Material Biológico:

Suero o plasma.

Descripción del método:

- a) Desproteínización: En un tubo de centrifuga colocar:
- | | |
|--|---------|
| Solución precipitante $\text{FeCl}_3 \cdot 2\text{NH}_4\text{Cl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 4.0 ml. |
| Suero o plasma. | 0.1 ml. |
| Mezclar vigorosamente y reposar | 2.3 min |
| Centrifugar a 2500/3000 r.p.m. | 10 min. |
- b) Desarrollo de color: Transvasar a un tubo de ensaye de 25 x 100:
- | | |
|----------------------------------|---------|
| Filtrado o sobrenadante. | 3.0 ml. |
| H_2SO_4 QP. | 2.0 ml. |
| Mezclar por vibración y reposar. | 20 min. |
- c) Se prepara un blanco de reactivos, en un tubo de 25 x 100.
- | | |
|--|---------|
| Solución diluyente de $\text{FeCl}_3 \cdot 2\text{NH}_4\text{Cl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 3.0 ml. |
| H_2SO_4 QP. | 2.0 ml. |
| Mezclar vigorosamente y reposar. | 20 min. |
- d) Lectura: Con el blanco a 100% de transmisión, leer el % de transmitancia del problema, empleando para ello 560 mμ.

Espectrograma: Se desarrolló empleando la técnica con solución tipo conocida, en la forma descrita en el método de Bloor.

Establecimiento de la gráfica: Empleando la solución tipo con la técnica descrita:

	B	1	2	3
Solución tipo (ml)	0	1.0	2.0	3.0
Solución diluyente de $\text{FeCl}_3 \cdot 2\text{NH}_4\text{Cl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (ml)	3.0	3.0	2.0	1.0
Mezclar y reposar.	+	+	+	+
Transvasar a otro tubo. (ml)	3.0	3.0	3.0	3.0
H_2SO_4 , QP. (ml)	2.0	2.0	2.0	2.0
Mezclar por vibración hasta temperatura ambiente (min)	20	20	20	20
Leer a 560 mμ el % de T.	100	48	22	11
Concentración: mg. colesterol/100 ml.	0	100	200	300

La gráfica se dibuja en papel semilogarítmico, y aparece en hoja por separado.

CAPITULO III.
SELECCION DE PACIENTES.

Recurrimos a Instituciones que nos proporcionaron muestras de sueros de individuos sujetos a diversos tratamientos, no fueron clasificados por sus pade
cimientos, ni edades, ni sexo.

El Centro Hospitalario del Instituto Mexicano de Asistencia a la Niñez, nos proporcionó muestras de pacientes desde meses hasta unos 16 años. En la Clínica 19, del Instituto Mexicano del Seguro Social, obtuvimos muestras de adultos El Hospital Adolfo López Mateos del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado conseguimos sueros de individuos con problemas hepáticos, diabetes y posibles hipercolesterolemias. Por último se consiguieron en el Centro Médico Nacional muestras de sueros de individuos sin clasificación.

Originalmente cada lote de muestras fué separado de conformidad a su color en sueros no ictéricos y sueros ictéricos.

Trabajamos sobre 100 muestras de sueros no ictéricos con los 4 métodos es
plicados.

De los sueros ictéricos, preparamos un lote de 10 muestras para hacer las determinaciones, utilizando como adsorbente 100 mg. de hidróxido alúminico por ml. de suero, el que una vez separado por centrifugación nos proporcionó material biológico para hacer el desarrollo de los mismos métodos expuestos.

Sus resultados y agrupación se explican en el capítulo siguiente.

CAPITULO IV

AGRUPACION ESTADISTICA Y RESULTADOS.

Los resultados obtenidos experimentalmente de la aplicación de los métodos expuestos se ha agrupado en las tablas que damos a continuación, siguiendo el orden siguiente:

- 1°.- Clasificamos los resultados de cada método haciendo una tabla para cada uno de ellos.
- 2°.- Ordenamos los resultados de menor a mayor, indicándolos como "y", que aparecen a la derecha de los casos o frecuencia con que se presentaron.
- 3°.- En la tercera columna aparece la acumulación de los resultados, apareciendo encabezado como " Σy ", siendo la última cifra (en el caso 100) la que nos da la suma total de los resultados. Dato que nos servirá para calcular la media o promedio aritmético.
- 4°.- La columna encabezada como "d" nos indica la diferencia encontrada entre el resultado individual de cada caso, con la media.
- 5°.- La diferencia, elevada al cuadrado está registrada en la quinta columna, dato que nos sirve para calcular la desviación estandar de la serie de determinaciones hechas.
- 6°.- Bajo el símbolo Σd^2 , aparece la suma del cuadrado de las diferencias obtenidas en la columna anterior.

Todos estos datos se acumularon para obtener y anotar al final de cada tabla los siguiente:

y = la suma de los resultados obtenidos.

M = media o promedio aritmético ($\Sigma y/n$).

n = número de casos observados.

d^2 = suma del cuadrado de las diferencias del total de los casos observados.

V = Varianza ($\Sigma d^2/n-1$).

ds = desviación estandar (\sqrt{V}).

Amplitud del límite de valores: los valores que entrarán en nuestro cálculo, en el primer método ($M \pm ds$) desde $M-ds$, hasta $M+ds$.

Valores de aceptación (dentro de éste primer momento), el valor %, de los resultados que estén dentro de los valores obtenidos en la amplitud del límite de valores.

Valores de no aceptación: Agrupamos en 3 resultados, los inferiores -

la amplitud de valores mínima; los superiores a la amplitud de valores máxima obtenido en la amplitud; y el total, la suma de valores inferiores más los valores superiores.

Error: El valor obtenido como error de nuestra serie de muestras y - desarrollo del método (ds/\sqrt{n}).

Error % de la media: calculamos el equivalente porcentual sobre la - media ($ex100/M$).

Todos estos datos nos servirán para correlacionar nuestra proposi- ción a los métodos establecidos, empleando pruebas paramétricas.

Aparece también una séptima columna que está encabezada por Signo (D - ó B ó C) según el método con que se compare: esto nos indica que el resultado ob- tenido en ese caso en particular (misma muestra de suero), nos ha dado un re- sultado en el método propuesto (método D), y en el método a comparar hemos ob- tenido tal o cual cifra, si en el método propuesto obtenemos un resultado ma yor que en el comparado, lo anotamos como +, en el caso contrario lo registra- mos como - ; si es que obtenemos el mismo resultado en ambos métodos queda in dicado como = .

Al final hacemos la suma de todos los signos, que lógicamente en todos - los casos es 100; calculamos la diferencia del signo más veces registrado me- nos el otro (excluyendo los =), y lo registramos.

Esta prueba es NO PARAMETRICA, y la conclusión a que nos llevará está da da por el hecho de que la diferencia obtenida de los signos, sea mayor o menor que la raíz cuadrada de la suma. En el capítulo de resumen y conclusiones se - anotará el resultado de éstas observaciones.

De los resultados que hemos obtenido de los cálculos para: Medias; varian- zas; errores, y demás, se deducirán las pruebas de F y de t, para correlacio- nar el método propuesto (método D) con los 3 métodos de referencia, aplicando- las fórmulas siguientes:

$$\text{Prueba de F} = \frac{V \text{ mayor}}{V \text{ menor}}$$

$$\text{Prueba de t} = \frac{M \text{ mayor} - M \text{ menor}}{e^2 \text{ may} + e^2 \text{ men}}$$

Para encontrar los valores prácticos, se consulta en las Tablas correspon- dientes para calcular la F y la t, teóricas y poder concluir si nuestra inves- tigación tiene significancia estadística o no la tiene.

RESULTADOS OBTENIDOS:		METODO DE BLOOR.				(METODO A).
Casos	y	Σy	d	Σd^2	Σd^2	Signo (D-A)
1	45	45	-114.14	13,027.9390	13,027.9390	+
2	60	105	- 99.14	9,828.7396	22,856.6786	+
3/4	65	235	- 94.14	8,862.3396	40,581.3578	2+
5	68	303	- 91.14	8,306.4996	48,887.8574	+
6	70	373	- 89.14	7,945.9396	56,833.7970	+
7	75	448	- 84.14	7,079.5396	63,913.3366	+
8/9	78	604	- 81.14	6,583.6996	77,080.7358	2+
10/11	80	764	- 79.14	6,263.1396	89,607.0150	2+
12	85	849	- 74.14	5,496.7396	95,103.7546	+
13	88	937	- 71.14	5,060.8996	100,164.6542	+
14	93	1,030	- 66.14	4,374.4996	104,539.1538	+
15	95	1,125	- 64.14	4,113.9396	108,653.0934	+
16/18	98	1,419	- 61.14	3,738.0996	119,867.3922	3+
19	100	1,519	- 59.14	3,497.5396	123,364.9318	-
20/21	103	1,725	- 56.14	3,151.6996	129,568.3310	2+
22/25	105	2,145	- 54.14	2,931.1396	141,292.8894	4+
26	109	2,254	- 50.14	2,514.0196	143,806.9090	+
27/28	112	2,478	- 47.14	2,222.1796	148,251.2682	2+
29	116	2,594	- 43.14	1,861.0596	150,112.3278	+
30/31	118	2,830	- 41.14	1,692.4996	153,497.3270	2+
32/37	120	3,550	- 39.14	1,531.9396	162,688.9646	6+
38	123	3,673	- 36.14	1,306.0996	163,995.0642	+
39/41	125	4,048	- 34.14	1,165.5396	167,491.6830	3+
42	128	4,176	- 31.14	969.6996	168,461.3826	+
43/44	130	4,436	- 29.14	849.1396	170,159.6618	2+
45/46	138	4,712	- 21.14	446.8996	171,053.4610	2+
47	140	4,852	- 19.14	366.3396	171,419.8006	+
48/49	147	5,146	- 12.14	147.3796	171,714.5598	2+
50	152	5,298	- 7.14	50.9796	171,765.5394	+
51/52	153	5,604	- 6.14	37.6996	171,840.9386	2+
53	154	5,758	- 5.14	26.4196	171,867.3582	+
54/55	155	6,068	- 4.14	17.1396	171,901.6374	2+
56/57	157	6,382	- 2.14	4.5796	171,910.7996	2+
58/59	160	6,702	0.86	0.7396	171,912.2758	2+
60/61	163	7,028	3.86	14.8996	171,941.0750	2+
62	168	7,196	8.86	78.4996	172,019.5746	+
63/66	170	7,876	10.86	117.9396	172,491.3330	4+
67	173	8,049	13.86	192.0996	171,683.4326	+
68/70	175	8,574	15.86	251.5396	173,438.0514	3+
71/74	180	9,294	20.86	435.1396	175,171.6098	4+
75/76	185	9,664	25.86	668.7396	176,516.0890	2+
77/78	190	10,044	30.86	952.9396	178,420.7682	2+
79/80	203	10,450	43.86	1,923.6996	182,268.1674	2+
81	205	10,655	45.86	2,103.1396	184,371.3070	+
82	205	10,860	45.86	2,103.1396	186,474.4466	-
83	208	11,068	48.86	2,387.2996	188,861.7462	+
84	210	11,278	50.86	2,586.7396	191,448.4858	+
85	213	11,491	53.86	2,900.8996	194,349.3854	+
86	225	11,716	65.86	4,337.5396	198,686.9250	+
87	230	11,946	70.86	5,021.1396	203,708.0646	-

Casos	y	Σy	d	Σd^2	Σd^2	Signo (D-A).
88	243	12,189	83.86	7,032.4996	210,740.5642	-
89	244	12,433	84.86	7,201.2196	217,941.7838	-
90	250	12,683	90.86	8,255.5396	226,197.3234	+
91	258	12,941	98.86	9,773.2996	235,970.6230	=
92/93	265	13,471	105.86	11,206.3390	258,383.3010	2+
94	295	13,766	135.86	18,457.9390	276,841.2400	+
95	313	14,079	153.86	23,673.8990	300,515.1390	+
96	315	14,394	155.86	24,292.3390	324,807.4780	+
97/98	360	15,114	200.86	40,344.7390	405,496.9560	2+
99	380	15,494	220.86	48,779.1390	455,276.0950	+
100	420	15,914	260.86	68,047.9390	522,324.0340	+

Suma de resultados $\Sigma y = 15,914$

Promedio $M = 159.14$

Número de casos $n = 100$

Suma del cuadrado de las diferencias $\Sigma d^2 = 522,324.034$

Varianza $V = 5,276$

Desviación estandar $ds = \pm 72.64$

Amplitud de límite de valores: de 86.5 á 231.78 mg/100 ml.

Valores de aceptación = 75%

Valores fuera de aceptación

- Inferiores = 12%
- Superiores = 13%
- Total = 25%

Error = 7.26 mg/100 ml.

Error % del promedio = 4.56%

Prueba de los signos

- Positivos (+) = 94
- Negativos (-) = 5
- Igual (=) = 1

Suma de los signos = 100

Diferencia de los signos (+) - (-) = 89

Doble de la raíz cuadrada de la suma = 20

RESULTADOS OBTENIDOS: METODO DE BENNIE ZAK Precip. con $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (METODO B).

Casos	y	Σy	d	Σd^2	Σd^2	Signo (D-B)
1/2	80	160	-168.63	28,436.0760	56,872.152	2+
3	94	254	-154.63	23,910.4360	80,782.588	-
4	130	384	-118.63	14,073.0760	94,855.664	+
5/6	135	654	-113.63	12,911.7760	120,679.216	= +
7	138	792	-110.63	12,238.9960	132,918.212	+
8	140	932	-108.63	11,800.4760	144,718.688	+
9/10	141	1,214	-107.63	11,584.2160	167,887.120	2+
11	145	1,359	-103.63	10,739.1760	178,626.296	+
12	148	1,507	-100.63	10,126.3960	188,752.692	+
13	150	1,657	- 98.63	9,727.8769	198,480.569	+
14	155	1,812	- 93.63	8,766.5769	207,247.246	+
15	160	1,972	- 88.63	7,855.2769	215,102.423	=
16	170	2,142	- 78.63	6,182.6769	221,285.100	-
17	173	2,315	- 75.63	5,719.8961	227,004.997	-
18/19	174	2,663	- 74.63	5,569.6369	238,144.271	- +
20/21	178	3,019	- 70.63	4,988.5961	248,121.465	- +
22/23	180	3,379	- 68.63	4,710.0769	257,541.619	- +
24	184	3,563	- 64.63	4,177.0369	261,718.656	-
25	188	3,751	- 60.63	3,675.9969	265,394.653	+
26/29	189	4,507	- 59.63	3,555.7369	279,617.601	3- +
30/31	190	4,887	- 58.63	3,437.4769	286,492.555	- +
32/33	194	5,275	- 54.63	2,984.4369	292,461.429	- +
34/35	195	5,665	- 53.53	2,876.1769	298,213.783	- +
36	199	5,864	- 49.63	2,463.1369	300,676.920	+
37/38	200	6,264	- 48.63	2,364.8769	305,406.679	- +
39	205	6,469	- 43.63	1,903.5769	307,310.251	+
40/46	210	7,939	- 38.63	1,492.2769	317,756.189	2- 5+
47	215	8,154	- 33.63	1,130.9769	318,887.166	-
48/49	216	8,586	- 32.63	1,064.7169	321,016.600	- +
50/52	231	9,249	- 27.63	763.4169	323,306.851	2- +
53	227	9,476	- 21.63	467.8569	323,779.708	-
54/56	228	10,160	- 20.63	425.5969	325,051.499	3-
57	235	10,395	- 13.63	185.7769	325,237.276	-
58	236	10,631	- 12.63	159.5169	325,396.793	+
59/60	238	11,107	- 10.63	112.9969	325,622.787	+
61/63	242	11,833	- 6.63	43.9569	325,754.658	3-
64/66	250	12,583	1.37	1.8769	325,760.289	2- +
67/68	255	13,093	6.37	40.5769	325,841.443	- +
69	259	13,352	10.37	107.5369	325,848.980	-
70	263	13,615	14.37	206.4969	326,155.477	+
71/75	270	14,965	21.37	456.6769	326,438.862	3- 2+
76	280	15,245	31.37	984.0769	329,422.939	+
77	283	15,528	34.37	1,181.2969	330,604.236	+
78	290	15,818	41.37	1,711.4769	332,315.713	-
79	298	16,116	49.37	2,437.3969	334,753.110	+
80	305	16,421	56.37	3,177.5769	337,930.687	-
81/84	315	17,681	66.37	4,407.9769	355,550.595	4-
85	316	17,997	67.37	4,538.7169	360,089.312	-
86/87	323	18,643	74.37	5,530.8969	371,151.106	2-
88	340	18,983	91.37	8,343.4769	379,499.583	+

RESULTADOS OBTENIDOS: METODO DE BENNIE ZAK Precip. con $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (METODO B).

Casos	Σy	Σy^2	d	Σd^2	Σd^2	Signo (D-B)
89	360	19,343	111.37	12,403.2768	391,902.860	-
90	375	19,718	126.37	15,969.3769	407,872.273	-
91	390	20,108	141.37	19,985.4769	427,957.714	+
92	398	20,506	149.37	22,311.3969	450,169.111	-
93	420	21,926	171.37	29,367.6769	479,536.788	+
94	442	21,368	193.37	37,391.9569	516,928.745	-
95	535	21,903	286.37	82,007.7769	598,936.522	-
96	540	22,443	291.37	84,896.4769	683,832.999	-
97	585	23,028	336.37	113,144.7769	796,977.776	-
98	595	23,623	346.37	119,972.1769	916,949.953	-
99	610	24,233	361.37	130,588.2769	1'047,538.230	-
100	630	24,863	381.37	145,443.0769	1'192,981.307	-

Suma de resultados $\Sigma y = 24,863$

Promedio $M = 248.63$

Número de casos $n = 100$

Suma del cuadrado de las diferencias $\Sigma d^2 = 1'192,981.307$

Varianza $V = 12,050.317$

Desviación estandar $ds = \pm 109.77394$

Amplitud de límite de valores: de 138.86 á 358.4 mg/100 ml.

Valores de aceptación = 81%

Valores fuera de aceptación

- Inferiores = 7%
- Superiores = 12%
- Total = 19%

Error = 10.98 mg/100 ml.

Error % del promedio = 4.42%

Prueba de los signos

- Positivos (+) = 44
- Negativos (-) = 54
- Igual (=) = 2

Suma de los signos = 100

Diferencia de los signos (+) - (-) = 10

Doble de la raíz cuadrada de la suma = 20

RESULTADOS OBTENIDOS: METODO DE BENNIE ZAK Precip. con Mezcla (METODO C).
 Alcohol-Acetona y recuperaci3n con CH₃COOH

Casos	y	Σy	d	Σd ²	Σd ²	Signo (D-C)
1	50	50	-271.53	73,728.540	73,728.540	+
2	60	110	-261.53	68,597.940	142,126.480	+
3	70	180	-251.53	63,267.340	205,393.820	+
4	78	258	-243.53	59,306.860	264,700.680	+
5	94	352	-227.53	51,769.900	316,470.580	+
6	95	443	-226.53	51,315.840	367,786.420	+
7	120	567	-201.53	40,614.340	408,400.760	+
8	132	699	-189.53	35,921.620	444,322.380	+
9	135	834	-186.53	34,793.440	479,115.820	+
10	137	971	-184.53	34,051.320	513,167.140	+
11	143	1,114	-178.53	31,872.960	545,040.100	=
12	160	1,274	-161.53	26,091.940	571,132.040	-
13	163	1,437	-158.53	25,131.760	596,163.800	+
14	164	1,601	-157.53	24,815.700	621,079.500	-
15	168	1,769	-153.53	23,571.460	644,650.960	+
16	169	1,938	-152.53	23,265.400	667,916.360	+
17	172	2,110	-149.53	22,359.220	690,276.580	+
18	177	2,287	-144.53	20,888.920	711,165.500	+
19	178	2,465	-143.53	20,600.860	731,766.360	+
20/21	189	2,843	-132.53	17,564.200	766,894.760	- +
22/23	200	3,243	-121.53	14,769.540	796,433.840	- +
24/26	206	3,861	-115.53	13,347.180	836,475.380	2- +
27	210	4,071	-111.53	12,438.940	848,914.320	+
28/32	213	5,136	-108.53	11,778.760	907,808.120	3- 2+
33	220	5,356	-101.53	10,308.340	918,116.460	=
34/35	227	5,810	- 94.53	8,935.920	935,986.301	- +
36	230	6,040	- 91.53	8,377.741	944,366.042	+
37	234	6,274	- 87.53	7,661.501	952,027.543	-
38/39	235	6,744	- 86.53	7,487.441	967,002.424	- +
40/41	242	7,228	- 79.53	6,325.021	979,652.466	- +
42/43	252	7,732	- 69.53	4,834.421	989,321.308	- =
44/45	270	8,272	- 51.53	2,655.341	994,631.992	2-
46/49	289	9,428	- 32.83	1,077.809	998,943.228	4-
50	300	9,728	- 21.53	463.541	999,406.769	-
51/54	315	10,988	- 6.53	42.641	999,577.333	- 3+
55	336	11,324	14.47	209.381	999,786.714	-
56/58	340	12,344	18.47	341.141	1'000,810.137	3-
59	343	12,687	21.47	460.961	1'001,271.098	-
60	352	13,039	30.47	928.421	1'002,199.519	-
61/62	356	13,751	34.47	1,188.181	1'004,665.881	2-
63/64	358	14,467	36.47	1,330.061	1'007,336.003	2-
65	370	14,837	48.47	2,349.341	1'009,685.344	-
66/67	380	15,597	58.47	3,418.741	1'016,523.826	2-
68	390	15,987	68.47	4,688.141	1'021,211.967	-
69	412	16,399	90.47	8,184.821	1'029,356.388	-
70/71	420	17,239	98.47	9,696.341	1'048,749.470	2-
72/73	425	18,089	103.47	10,706.040	1'070,161.550	2-
74/75	440	18,969	118.47	14,035.140	1'098,231.830	2-

RESULTADOS OBTENIDOS: METODO DE BENNIE ZAK Precip. con Mezcla (METODO C).
 Alcohol-Acetona y recuperación con CH_3COOH

Casos	y	Σy	d	Σd^2	Σd^2	Signo (D-C).
76	450	19,419	128.47	16,504.540	1'114,736.370	-
77	453	19,872	131.47	17,284.360	1'132,020.930	-
78	460	20,332	138.47	19,173.940	1'151,194.870	+
79	470	20,802	148.47	22,043.340	1'173,238.210	-
80/81	480	21,762	158.47	25,112.740	1'223,463.690	2-
82	484	22,246	162.47	26,396.500	1'249,860.190	-
83/84	490	23,226	168.47	28,382.140	1'306,624.474	2-
85	500	23,726	178.47	31,851.540	1'338,476.014	-
86/87	516	24,758	194.47	37,818.580	1'414,113.174	2-
88	518	25,276	196.47	38,600.460	1'452,713.634	-
89	528	25,804	206.47	42,629.860	1'495,343.492	-
90	536	26,340	214.47	45,997.380	1'501,340.874	-
91/92	545	27,430	223.47	49,938.840	1'601,218.554	2-
93	557	27,987	235.47	55,446.120	1'656,664.674	-
94	575	28,562	253.47	64,247.040	1'720,911.714	-
95/96	578	29,718	256.47	65,776.860	1'858,465.434	2-
97	590	30,308	268.47	72,076.140	1'924,541.754	-
98	600	30,908	278.47	77,545.540	2'002,087.114	-
99	615	31,223	293.43	86,124.640	2'088,211.754	-
100	630	32,153	308.47	95,153.640	2'183,365.494	-

Suma de resultados $\Sigma y = 32,153$

Promedio $M = 321.53$

Número de casos $n = 100$

Suma del cuadrado de las diferencias $\Sigma d^2 = 2'183,365.494$

Varianza $V = 22,054.1959$

Desviación estandar $ds = \pm 148.50653$

Amplitud de límite de valores: de 173.03 á 470.03 mg/100 ml.

Valores de aceptación = 63%

Valores fuera de aceptación
 Inferiores = 17%
 Superiores = 20%
 Total = 37%

Error = 14.85 mg/100 ml.

Error % del promedio = 4.62%

Prueba de los signos
 Positivos (+) = 31
 Negativos (-) = 66
 Igual (=) = 3

Suma de los signos = 100

Diferencia de los signos (+) - (-) = 35

Doble de la raíz cuadrada de la suma = 20

RESULTADOS OBTENIDOS: METODO Propuesto como modificación al método de BENNIE-
 Zak de precipitación y coloración con $\text{FeCl}_3 \cdot 2\text{NH}_4\text{Cl} \cdot \text{H}_2\text{O}$. (METODO D).

Casos	y	Σy	d	Σd^2	Σd^2
1/2	93	186	-142.57	40,755.124	40,755.124
3	100	286	-135.75	18,428.062	59,183.186
4	130	416	-105.75	11,183.062	70,366.248
5	135	551	-100.75	10,150.562	80,516.810
6	140	691	-95.75	9,168.063	89,684.873
7/8	143	977	-92.75	8,602.562	106,889.998
9	147	1,124	-88.75	7,876.562	114,766.560
10	153	1,277	-82.75	6,847.562	121,614.122
11	155	1,432	-80.75	6,520.562	128,134.684
12/13	158	1,748	-77.75	6,045.062	140,224.809
14/18	160	2,544	-75.75	28,690.312	168,915.121
19/20	163	2,874	-72.75	5,292.562	179,500.246
21/22	164	13,202	-71.75	10,296.125	189,796.371
23	168	3,370	-67.75	4,590.062	194,386.433
24/25	173	3,716	-62.75	7,875.125	202,261.558
26	180	3,896	-55.75	3,108.062	205,969.620
27/28	184	4,264	-51.75	5,356.125	210,725.745
29	188	4,452	-47.75	2,280.062	213,005.807
30	189	4,641	-46.75	2,185.562	215,191.369
31	193	4,834	-42.75	1,827.562	217,018.931
32	195	5,029	-40.75	1,060.562	218,079.493
33	198	5,227	-37.75	1,425.062	219,504.555
34/35	200	5,627	-35.75	2,556.125	222,060.680
36	203	5,830	-32.75	1,072.562	223,133.242
37/39	206	5,448	-29.75	2,655.187	225,788.429
40/45	213	7,726	-22.75	3,105.375	228,893.804
46	215	7,941	-20.75	430.562	229,324.366
47	218	8,159	-17.75	315.062	229,639.428
48/53	220	9,479	-15.75	248.062	231,127.803
54/57	225	10,379	-10.75	462.250	231,590.053
58	228	10,607	-7.75	60.062	231,650.115
59	230	10,837	-7.75	33.062	231,683.177
60	238	11,075	2.25	5.062	231,688.239
61/63	241	11,798	5.25	82.687	231,770.926
64/69	250	13,298	14.25	1,218.375	232,989.301
70/74	258	14,588	22.25	2,475.312	235,464.612
75/80	268	16,196	32.25	6,240.375	241,704.988
81/82	278	16,752	42.25	3,570.125	245,275.113
83	289	17,041	53.25	2,835.562	248,110.675
84	295	17,336	59.25	3,510.562	251,621.257
85/86	300	17,936	64.25	8,256.125	259,877.362
87/88	310	18,556	74.25	11,026.125	270,903.487
89/90	314	19,184	78.25	12,246.125	283,149.612
91	378	19,562	142.25	20,235.062	303,384.674
92	390	19,952	154.25	23,793.069	327,177.736
93	405	20,357	169.25	28,645.562	355,823.298
94	425	20,782	189.25	35,815.562	391,638.860
95	430	21,212	194.25	37,733.062	429,371.922

RESULTADOS OBTENIDOS: METODO Propuesto como modificación al método de BENNIE-ZAK de precipitación y coloración con $\text{FeCl}_3 \cdot 2\text{NH}_4\text{Cl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (METODO D).

Casos	y	Σy	d	Σd^2	Σd^2
96/97	440	22,092	204.25	83,436.124	512,808.046
98	478	22,570	242.25	58,685.062	571,493.108
99	500	23,070	264.25	69,828.062	641,321.170
100	105	23,575	269.25	72,495.562	713,816.732

Suma de resultados $\Sigma y = 23,575$

Promedio $M = 235.75$

Números de casos $n = 100$

Suma del cuadrado de las diferencias $\Sigma d^2 = 713,816.732$

Varianza $V = 7,210.270$

Desviación estandar $ds = \pm 84.913309$

Amplitud de límite de valores: de 150.84 á 320.66 mg/100 ml.

Valores de aceptación = 81%

Valores fuera de aceptación
 Inferiores = 9%
 Superiores = 10%
 Total = 19%

Error = 8.491 mg/100 ml.

Error % del promedio = 3.6016967%

RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS CALCULOS PARA LAS PRUEBAS PARAMETRICAS, APLICANDO LAS FORMULAS MENCIONADAS ANTERIORMENTE:

METODOS:	A	B	C	D
Media:	159.14	248.63	321.53	235.75
Desviación estandar :	72.64	109.77	148.50	84.91
Error estandar:	7.26	10.98	14.85	8.49
Varianza:	5,276.00	12,050.317	22,054.196	7,210.270

PRUEBAS DE F:

F_e de D/A = 1.3666167	$F_t = (1\%) = 1.94$	$(p5\%) = 1.59$
F_e de D/B = 1.6712568	$F_t = (1\%) = 1.94$	$(5\%) = 1.59$
F_e de D/C = 3.0587198	$F_t = (1\%) = 1.94$	$(5\%) = 1.59$

PRUEBAS DE t:

t_e de D/A = 6.8749399	$t_e = (1\%) = 2.62$	$(5\%) = 1.98$
t_e de D/B = 0.926513	$t_e = (1\%) = 2.62$	$(5\%) = 1.98$
t_e de D/C = 5.014583	$t_e = (1\%) = 2.62$	$(5\%) = 1.98$

El subíndice "e" en las pruebas de F y de "t" indica que es el valor experimental obtenido en nuestro trabajo, y el subíndice "t" nos indican el valor teórico obtenido de las tablas de Barnes & Nobles.

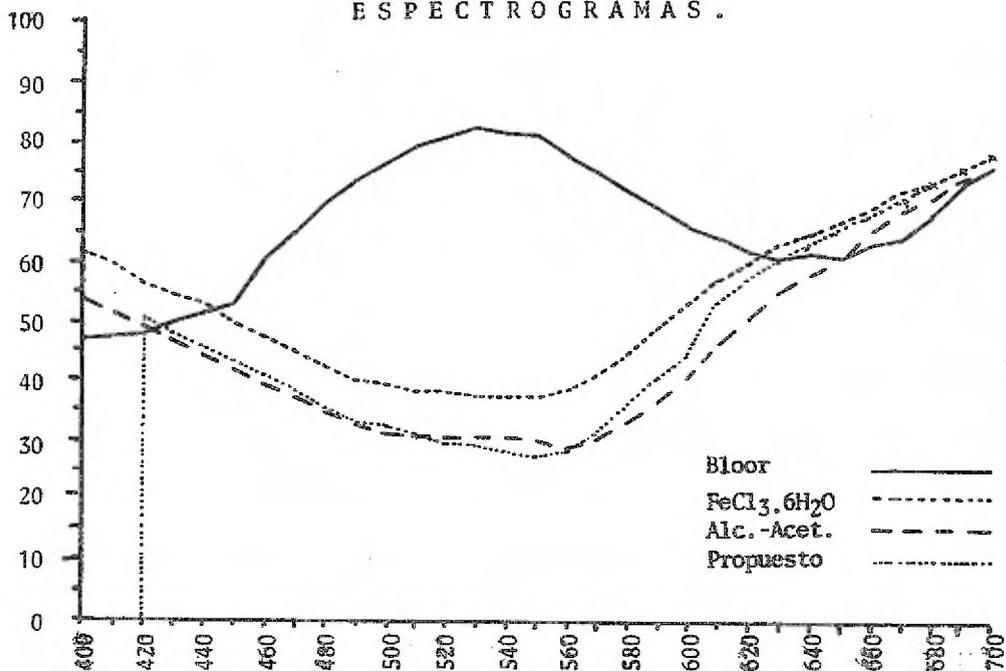
Quando el valor "e" es superior al valor "t", nos demuestra que hemos obtenido significación en los métodos y por tanto no hay correlación en nuestra comparación.

Si el valor "e" es inferior al valor "t", estamos obteniendo correlación entre los métodos.

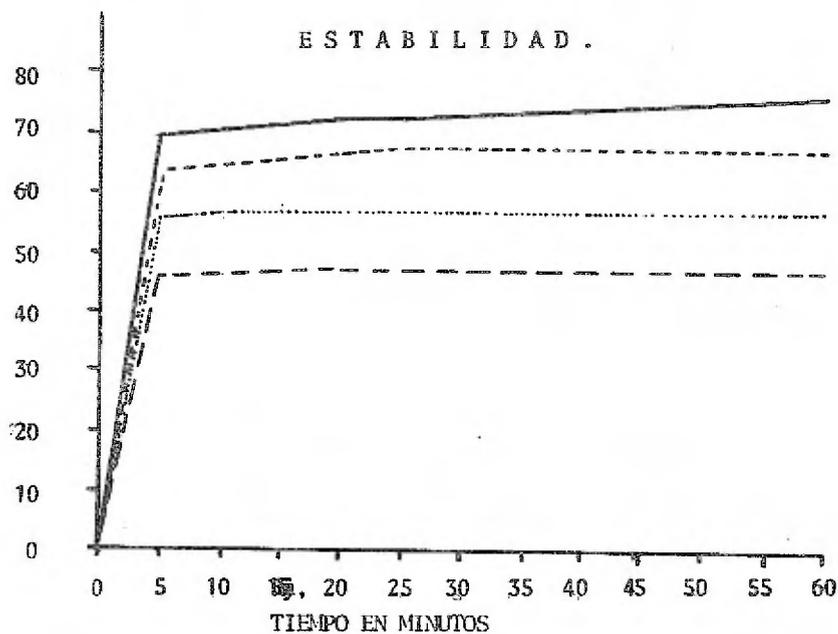
RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS CALCULOS PARA LAS PRUEBAS NO PARAMETRICAS.

Comparación D-A:	94 (+) - 5(-) = 89	$2\sqrt{100} = 89 > 20$
Comparación D-B:	54 (-) - 44(+) = 10	$2\sqrt{100} = 10 < 20$
Comparación D-C:	66 (-) - 31(+) = 35	$2\sqrt{100} = 35 > 20$

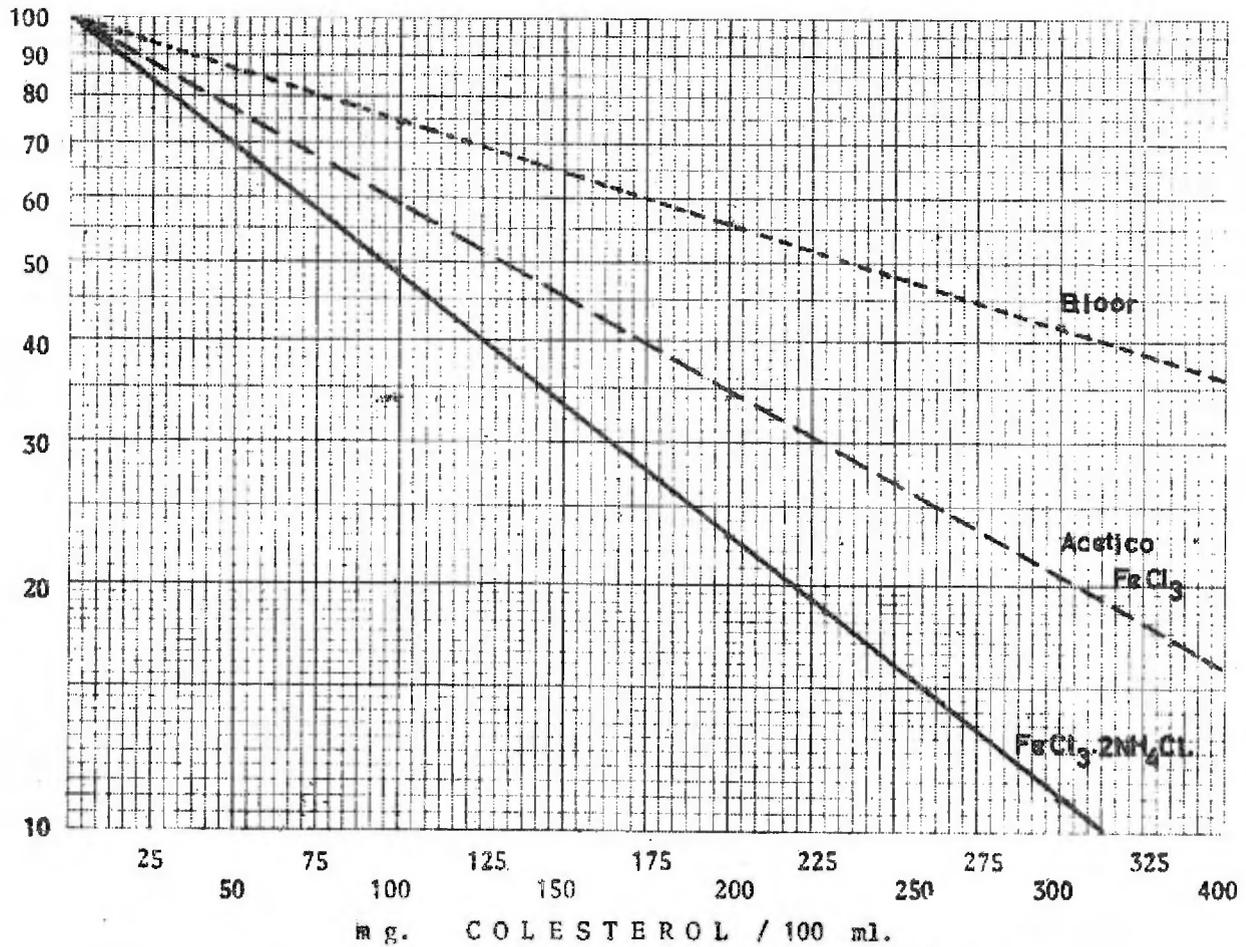
ESPECTROGRAMAS .



ESTABILIDAD .



TRANSMITANCIA



GRAFICAS DE CALIBRACION

RESULTADOS OBTENIDOS DE LOS
SUEROS ICTERICOS.

Técnica de Bloor

con Al(OH) ₃ .	sin Al(OH) ₃ .
1.- 220	200
2.- 190	85
3.- 155	135
4.- 120	150
5.- 72	95
6.- 85	70
7.- 135	75
8.- 110	155
9.- 115	100
10.- 158	95

Técnica de precipitación con FeCl₃.6H₂O

1.- 248	350
2.- 700	630
3.- 325	312.5
4.- 452.5	305
5.- 145	292.5
6.- 198	221
7.- 200	216
8.- 250	315
9.- 120	297.5
10.- 350	315

Técnica de precipitación con Alcohol-Acetona

1.- 550	736
2.- 600	1,036
3.- 850	630
4.- 510	570
5.- 460	436
6.- 380	324
7.- 430	436
8.- 436	516
9.- 300	400
10.- 540	376

RESULTADOS OBTENIDOS DE LOS
SUEROS ICTERICOS.

Técnica de precipitación $\text{FeCl}_3 \cdot 2\text{NH}_4\text{Cl} \cdot \text{H}_2\text{O}$

1.- 314	212.5
2.- 250	173
3.- 282.5	203.5
4.- 245	189
5.- 80	142.5
6.- 194	117.5
7.- 225	108
8.- 147.5	160
9.- 239	135
10.- 314	206

CAPITULO V.

ESTUDIO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.

Hemos efectuado cálculos para dejar en el primer momento de la desviación estandar, y a partir de esas cifras poder sacar conclusiones que nos hagan patente el recomendar la aplicación de la técnica de Bennie-Zak modificada para evitar manipulaciones que traen consigo una multiplicación de errores como lo hemos observado al ejecutar las técnicas que recomiendan extracción, utilizando cloroformo (solvente orgánico de fácil evaporación), o ácido acético al 85% (glacial) desarrollándose, en este último, la reacción colorida dentro de el mismo tubo en que se hace la extracción.

Por la bibliografía técnica conocida, sabemos que la desviación estandar en el primer momento, agrupará un mínimo de 68% de los valores muestreados en los límites de aceptación y hemos observado que el método de Bennie-Zak, de precipitación con mezcla alcohol-acetona, extracción con ácido acético y desarrollo de color con cloruro férrico amónico y ácido sulfúrico, agrupa un máximo del 63% dentro de los valores de aceptación, lo que le hace estar a bajo de dichos límites; en cambio el método clásico de Bloor encierra el 75% y los métodos que emplean cloruro férrico y cloruro férrico amónico para precipitar las proteínas abarcan el 81% de los resultados, hecho que los hace confiables inclusive hemos observado que los errores que encierran estos métodos van en el orden porcentual decreciendo en el mismo orden, alcanzando la modificación en error porcentual mínimo (3.6%).

De la observación de los resultados respecto del promedio aritmético o media obtenida, notamos que el valor mínimo nos lo dá el método de Bloor, con la cifra de 159.14 ml. de colesterol en 100 ml. de suero, en tanto que el valor máximo lo ofrece el método de precipitación con alcohol-acetona seguido de la extracción con ácido acético, alcanzando la cantidad de 321.53 mg. de colesterol por 100 ml. de suero, ésto nos hace suponer que en el método de Bloor no hay una extracción clorofórmica completa, en tanto que en el otro por desarrollarse la fase colorida en el mismo tubo en que se evapora a sequedad debe de haber algún compuesto orgánico que interfiera dañándonos coloración con los compuestos reactivos (cloruro férrico amónico-ácido sulfúrico).

CAPITULO VI.

RESUMEN Y CONCLUSIONES.

- 1°.- Se estableció la técnica cuantitativa de Bloor efectuándose: pruebas para adiestramiento de la técnica; para establecer la gráfica de comparación; se corrió espectrograma para conocer sus transmitancias limitadas entre 400 y 700 μ y el estudio de los sueros problemas.
- 2°.- Se estableció la técnica de Bennie-Zak de precipitación y desarrollo de color con $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ siguiendo los mismos aspectos enumerados en el método anterior.
- 3°.- Se estableció la técnica de Bennie-Zak de precipitación con mezcla alcohol-acetona para precipitar las proteínas; evaporación a sequedad de una alícuota y extracción del colesterol con $\text{CH}_3\text{-COOH}$, iniciando la fase de desarrollo de color con $\text{FeCl}_3 \cdot 2\text{NH}_4\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, siguiendo la misma secuela indicada en el primer punto.
- 4°.- Se estableció la técnica propuesta con reactivo $\text{FeCl}_3 \cdot 2\text{NH}_4\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ para precipitar y desarrollar el color, calculándose la concentración óptima del reactivo usado, de conformidad con la concentración máxima de hierro que debe intervenir en la reacción y a partir de eso se continuó desarrollando el método en la misma forma que se menciona para el método de Bloor.
- 5°.- De las muestras de suero que nos fueron proporcionadas, separamos dos lotes el primero de 100 muestras todas de las mismas características por no presentar ictericia o bilirrubinemia, el segundo lote fué de 10 muestras de sueros ictericos.
- 6°.- A cada muestra del primer lote se le practicaron determinaciones por los cuatro métodos, obteniéndose los resultados enumerados en el capítulo correspondiente.
- 7°.- Se establecieron las técnicas estadísticas para determinar: la frecuencia de cada concentración; la suma de los resultados (concentraciones) obtenidas y a partir de éste dato deducir el promedio aritmético o media, dato que nos servirá para calcular la diferencia de cada resultado con este promedio, estas diferencias se elevaron al cuadrado y se sumaron para

poder calcular la desviación tipo del método, la varianza, el rango de aceptación en el primer momento estadístico.

8°.- De los resultados obtenidos se hizo la correlación del método propuesto (D) con los métodos ya establecidos, calculándose la prueba de F, y la de "t" experimentales, para la correlación individual como quedó indicado.

9°.- De los cálculos deducimos que el método propuesto merece tener todo el apoyo necesario para su uso rutinario por:

a.- Emplear reactivos absolutamente estables.

b.- Encontrar correlación directa con el método expuesto como "B"

c.- Tener los resultados dentro de una aptitud de valores aceptables mayor que los otros métodos.

d.- Obtenerse un menor error que los métodos de referencia.

e.- Tener estabilidad, una vez desarrollado el color muy constante.

f.- No requiere de muchas manipulaciones, por lo que es más fácil de desarrollar.

g.- Las cifras obtenidas como concentración de colesterol en suero están dentro de una observación más verdadera y su interpretación está libre de interferencias por otras sustancias.

CAPITULO VII.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Miriam Reiner. Métodos Seleccionados de Análisis Clínicos. Cia. Ed. Aguilar. S. A. pag. 37-45. Vol. II (1969).
- 2.- Miriam Reiner. Métodos Seleccionados de Análisis Clínicos. Cia. Ed. Aguilar, S. A. pag. 97-105 Vol. V (1969)
- 3.- Handler. Smith. Principles of Biochemistry. 3a. Ed. pag. 470-481 (1959)
- 4.- Biological Chemistry. Henry, R. Mahler & Eugene H. Cordes. Ed. Harper. International. pag. 641-671 (1969)
- 5.- U. Deulo Feu. A.D. Marenzi. A. O. M. Stoppani. Química Biológica. Cia. Ed. El Ateneo. Buenos Aires. pag. 613-629. (9a. Ed.).
- 6.- Davson Eggleton. Fisiología Humana. Cia. Ed. Aguilar, S.A. pag. 480,561, 1458, 1537. 30a. Ed. (1968).
- 7.- Arthur. C. Guyton. Tratado de Fisiología Médica. Cia. Ed. Interamericana, S.A. 3a. Ed. pag. 922-983. (1969)
- 8.- Dr. Norbert W. Tietz. Química Clínica Moderna. Cia. Ed. Nueva Editorial Interamericana, S.A. 1a. Ed. pag. 355-371 (1972).
- 9.- Vanzetti, G. Clínica Chemistry. Acta, 10: pag. 389-391 (1964).
- 10.- Lehnartz. Fisiología Química. pag. 48-50 (1952).
- 11.- Stepham Miall. Diccionario de Química. pag. 267 (1945).
- 12.- Dr. Leonidas Corona. Química Normal y Patológica de la sangre. págs. 807,813 (1942).
- 13.- Harold A. Harper. Química Fisiológica. Cia. Ed. El Manual Moderno pag. 296-303 (1969).
- 14.- Fernando Velez Orozco. Apuntes de Análisis Químico Clínicos. págs. 207 213 (1967).
- 15.- Lynch- Raphael - Mellor-Spare-Hills-Inwood. Metodos de Laboratorio. Cia. Ed. Interamericana, S.A. 1a. Ed. pag. 126, 127, 173, 608,101, 117. (1967).
- 16.- Arthur L. Babson, Paul O. Shapiro. and George E. Phillig "A New Assay for Cholesterol and Cholesterol Esters in Serum which is not Affected by Bilirubin". Clin. Chim. Acta, 7 pag.800-804 (1962).
- 17.- Harold Varley - Practical Clinical Biochemistry. Cia. Ed. William - Heinemann. Medical Books-LTD. and Interscience Books Inc. New York. 1a. Ed. pag. 309-316 (1969).
- 18.- Fieser y Fieser.-Química Orgánica. Cia. Ed. Grijalbo, S. A. pag.1161-1165 (1960).

ESTE TRABAJO SE IMPRIMIO EN LOS TALLERES
DE GUADARRAMA IMPRESORES, S. A., AVENIDA
CUAUHTEMOC 1201, COL. VERTIZ NARVARTE
MEXICO 13, D. F., TELS. 575 28-41 y 575-41-31