

DICNE  
8500-



Biblioteca

23 MAR 2002

VENCIMIENTO



Biblioteca

UNIVERSIDAD  
DE MONTERREY

08 OCT. 2002

VENCIMIENTO

UNIVERSIDAD DE MONTERREY

Instituto de Ciencias

Naturales y Exactas

~~COMPARACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE BLOOR,  
PELKAN Y ALLEN Y LA DE FERRO Y HAMN,  
PARA LA DETERMINACIÓN DE COLESTEROL  
SANGUÍNEO~~

Tesina que presenta

RITA EVELYN ROQUE RODRÍGUEZ

En opción al título de

Químico Farmacéutico Biólogo

Monterrey, N.L.

Septiembre de 1972.

**BIBLIOTECA**  
UNIVERSIDAD DE MONTERREY

040.6151

R 786C

1972

800202

Con cariño y respeto  
a mis padres:

Mauricio Oscar Roque.

Juanita Rodríguez de Roque.

Con eterno agradecimiento  
a mis abuelitos:

Dr. Salvador Rodríguez (q.e.p.d)

Amelia Contreras L.

A la Universidad y Colegio Labastida.

A mis maestros:

Que desde la primaria hasta la profesional con sus enseñanzas y estímulo ayudaron alcanzar mi meta.



---

Con especial agradecimiento  
para mis maestros:

Sr. José Vargas Mena, Q.F.B., M.Sc.

Q.F.B. María Teresa Garza Gallardo.

Q.F.B. Blanca Silvia Garza Fernández.

I.Q. Aureliano García Fernández.

Por su valiosa colaboración en la  
elaboración de esta tesina.

Este trabajo se efectuó en el  
Laboratorio de Análisis Clíni-  
cos Servicio Social "Labasti-  
da - U. de M."

Bajo la dirección del Sr. ---

José Vargas Mena

Q.F.B., M.Sc.

## I N D I C E

Introducción .....	1
Material y Métodos.....	15
Resultados.....	24
Discusión y Conclusiones.....	29
Resumen.....	32
Bibliografía.....	33



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

### Colesterol:

Un gran número de compuestos que se encuentran en la naturaleza pertenecen a la clase conocida como esteroides. Poseen estos compuestos el núcleo progenitor del ciclopentanoperhidrofenantreno, que consiste en tres anillos de seis miembros ( A, B y C ) y un anillo de cinco miembros (D). Los anillos están unidos como se indica con un total de 17 átomos de carbono (Figuras 1 y 2). A este grupo de compuestos llamados esteroides pertenece el colesterol.

Ya en 1815 se le dio el nombre de colesterina a una sustancia blanca de consistencia ceras, que podía aislarse de los cálculos biliares.

Más tarde fue identificado como un alcohol estable a la ebullición con álcalis concentrados. También se aislaron de tejidos,



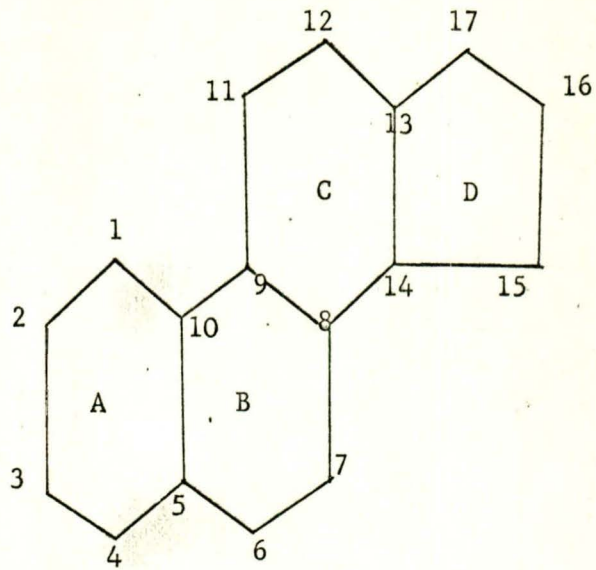


Figura 1 .- CICLOPENTANOPERHIDROFENANTRENO.

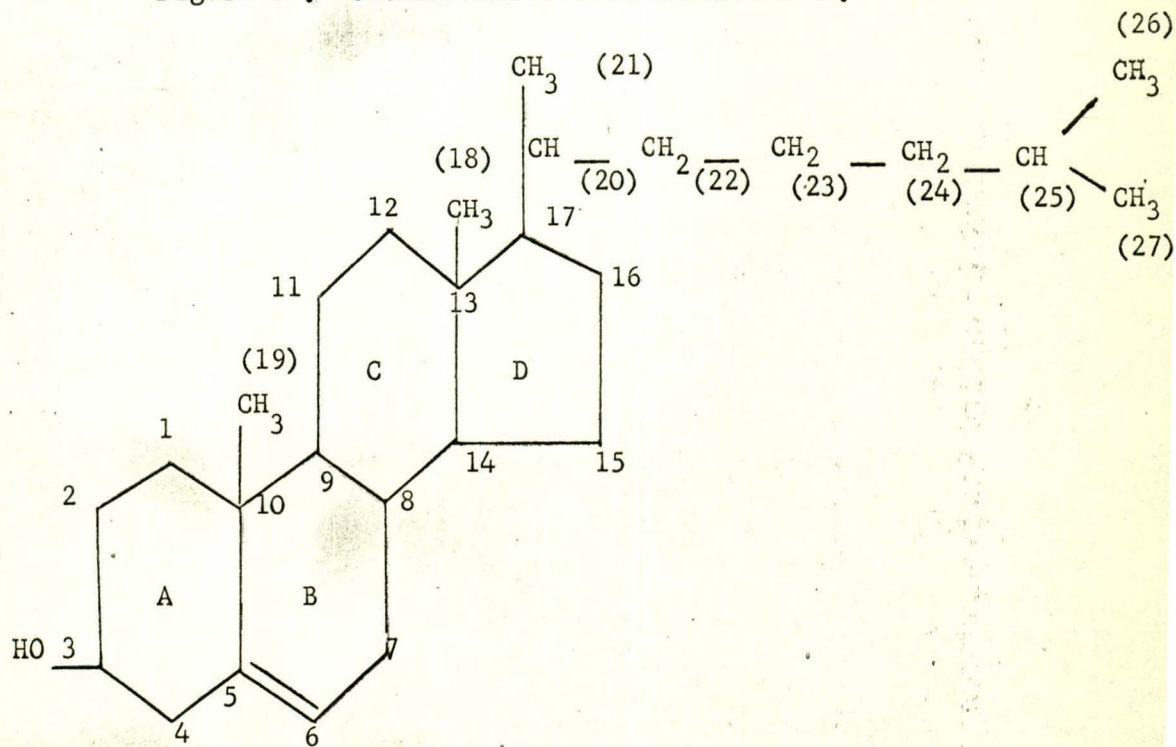


Figura 2 .- COLESTEROL.

ésteres de este alcohol con ácidos grasos.

El colesterol ha sido hallado en todos los tejidos animales, pero no en los vegetales, suele ir acompañado de dihidrocolesterol y 7-dehidrocolesterol.

#### Estructura del Colesterol:

La numeración de los carbonos es similar a la mostrada -- para el ciclopentanoperhidrofenantreno, hay 512 esteroisómeros posibles, solo unos cuantos de estos se encuentran en la naturaleza.

Según la fórmula el colesterol es un alcohol-esteroide -- pues el grupo " OH " lo transforma sistemáticamente en alcohol, --- mientras que la cadena lateral unida al átomo de carbono # 17 le -- confiere la misma solubilidad que tienen los lípidos en cloroformo, éter, etc.

#### Propiedades del Colesterol.

Cristaliza en general en forma de placas rómbicas brillantes, de color blanco. Funde a  $149-150^{\circ}\text{C}$ . y es insípido e inodoro. Por exposición al aire y a la luz, se oxida lentamente. Es insoluble en agua, ácido y álcalis, algo soluble en soluciones de jabón - y mucho más en soluciones de sales biliares. Se disuelve bien en - éter, benceno, cloroformo, éter de petróleo, disulfuro de carbono, acetona y alcohol caliente, poco soluble en alcohol frío.



Se puede preparar colesterol en el laboratorio muy fácilmente por extracción de los cálculos biliares o de tejido cerebral. Comercialmente se prepara a partir de médula ósea de bovinos.

El colesterol posee la importante propiedad, mezclado con grasa o aceite de estimular la absorción de grandes cantidades de agua. Como no es soluble en agua es probable que esta propiedad esté relacionada con su tendencia a formar emulsiones del tipo de agua en aceite. La lanolina, que absorbe mucho colesterol, absorbe agua fácilmente y por eso se usa con frecuencia en farmacia como vehículo graso en la preparación de pomadas que contienen componentes hidrosolubles.

Aunque el colesterol no es saponificable con álcalis, el calentamiento prolongado con ellos lo descompone lentamente.

Las propiedades químicas del colesterol están relacionadas en particular con el grupo hidroxilo secundario y el doble enlace presente en la molécula. Cuando se oxida colesterol en las condiciones apropiadas, se forma la cetona correspondiente, colesteno. El grupo hidroxilo forma fácilmente ésteres con los ácidos y los ésteres de colesterol con los ácidos grasos están ampliamente distribuidos en la sangre y los tejidos.

A causa de la presencia del doble enlace, el colesterol da las reacciones de adición características de los compuestos insa-

turados. Una de las reacciones características es la reacción de Lieberman-Burchard, en la cual se trata una solución clorofórmica del estero<sup>l</sup> con anhídrido acético y ácido sulfúrico concentrado. El color obtenido, es verde azulado a verde, varía de intensidad con la cantidad de colesterol presente y esta reacción de color es la base de su determinación cuantitativa.

Otra reacción usada comunmente es la ideada por Salkowski que consiste en mezclar el estero<sup>l</sup> con cloroformo y ácido sulfúrico concentrado, con el cual se produce una coloración rojo azulado o pú  
ra.

Estas reacciones no son específicas del colesterol, sino que las dan varios esteroides, pero en tejidos animales hay cantidades relativamente pequeñas de otros esteroides, que no sean colesterol. Los esteroides saturados (al igual que el dihidrocolesterol y coprosterol) no dan estas reacciones de color.

Otra reacción de importancia es la formación de un complejo insoluble cuando se mezcla una solución de colesterol con digitonina  $C_{56}H_{92}O_2$  (un glucósido perteneciente al grupo de la saponina y que ocurre en las hojas y semillas de la digital o dedalera), la formación de digitonido de colesterol. Esta reacción no es solo una prueba cualitativa, sino es la base de una prueba cuantitativa. La combinación con digitonina solo es posible si está libre el grupo hidróxilo en la posición 3.



### Fuentes del colesterol.

Practicamente cualquier célula del organismo produce colesterol a partir de compuestos simples de dos carbonos (acetatos). El hígado, la corteza suprarrenal, los ovarios y testículos, así como el epitelio del intestino producen grandes cantidades de colesterol. La corteza suprarrenal, los ovarios y testículos utilizan el colesterol y sus ésteres para sintetizar las hormonas esteroides.

Además de fabricar colesterol el hígado también lo esterifica transformando parte de él en ácido cólico que se excreta en la bilis (un poco menos de un gramo por día), aunque el organismo sintetiza con facilidad el colesterol, parece que resulta muy difícil eliminarlo.

El colesterol se encuentra en la sangre en forma de colesterol libre y de ésteres de colesterol, en el plasma se halla a la vez, colesterol libre y esterificado, en los globulos rojos solamente parece estar presente la forma libre. Para el análisis se prefiere el plasma o suero a la sangre total, por que en la fracción del plasma o suero ocurren la mayor parte de las variaciones patológicas en la cantidad y distribución entre la forma libre y la esterificada.

### Alteraciones Patológicas del Colesterol.

Las cifras normales de colesterol del suero varían según la edad, el sexo y los métodos de determinación química. En gene--

ral se considera un promedio de 125 - 250 mg. por 100 ml., en los niños mayores de dos meses de edad y en los adultos de ambos sexos. - Según Adlersberg (10), el promedio en el hombre de 28 a 32 años de - edad es de 243 mg. por 100 ml. y en la mujer (misma edad) de 200 mg. por 100 ml., con diferencias análogas en lo que se refiere a los fosfolípidos.

El aumento del colesterol consituye la hipercolesterolare-  
mia y la disminución la hipocolesterolaremia.

Pueden encontrarse cifras bajas de colesterol (hipocoleste-  
rolaremia) en el recién nacido y en el niño pequeño, en las anemias graves, enfermedades crónicas y agotadoras, anorexia nerviosa, caque-  
xia, cirrosis (portal), insuficiencia cardíaca congestiva, enfermeda-  
des hepáticas con ictericia por retención, algunos casos de hipertir-  
oidismo (el colesterol plamático se acerca al límite normal infe-  
rior), infantilismo hipofisiario, infecciones agudas, obstrucción in-  
testinal, mieloma múltiple, pancreatitis aguda, policitemia vera, ina-  
nición, tiroiditis, obstrucción de vías urinarias.

Pueden encontrarse cifras altas de colesterol (hipercoles-  
terolaremia) en la segunda mitad del embarazo, un aumento gradual del  
colesterol con la edad, generalmente los niveles sanguíneos de coles-  
terol son más altos en los hombres que en las mujeres (por que los -  
estrógenos tienden a disminuir el colesterol plamático). En el hipo-  
tiroidismo sobrepasan a los límites normales, tanto el colesterol li



bre como el esterificado; en el síndrome nefrótico, en que los lípidos totales del plasma pueden pasar de 2 g. en 100 ml. (el plasma puede ser lipémico o hasta lechoso), hay un aumento del colesterol; en la nefrosis lipoidea, el colesterol plasmático total oscila entre 300 - 1000 mg. por 100 ml. (promedio 500 - 600 mg. por 100 ml.); en la arteroesclerosis, existe una relación entre el aumento de colesterol plasmático, la aparición de arterosclerosis en los vasos coronarios y la trombosis de las arterias coronarias. La relación tal vez no sea directa y es posible que intervengan otros factores y otras fracciones lípidas. Sin embargo es frecuente utilizar las cifras totales del colesterol del plasma para establecer la probabilidad de que un sujeto sufra arteroesclerosis en la edad madura o avanzada. También hay hipercolesterolemia en la diabetes mellitus enfermedad de Gaucher, enfermedad de almacenamiento de glucógeno, hipercolesterolemia hereditaria, hemorragias agudas, hepatitis con ictericia, dietas ricas en grasas, síndrome nefrótico y nefrosis.

#### Metabolismo del colesterol.

La mayor parte del colesterol del cuerpo se origina por síntesis (1.5 - 2.0 g./día), mientras que solo aproximadamente 0.3 g./día se suministran en la dieta promedio. El colesterol es un producto del metabolismo animal y se encuentra por lo tanto, en los alimentos de origen animal como la carne, hígado, sesos y yema de huevo (una fuente principalmente abundante).

### Síntesis del colesterol.

El hígado es el sitio principal de la síntesis del colesterol, contribuyendo alrededor de 1.0 - 1.5 g./día de la cantidad total sintetizada.

Otros tejidos conocidos como capaces de sintetizar colesterol incluyen a la corteza adrenal, piel, intestinos, testículos y aorta. La acetil - CoA es la fuente de todos los átomos de carbono en el colesterol. El proceso de síntesis se puede descomponer por conveniencia en varias etapas.

a) - Síntesis del mevalonato, un compuesto de seis carbonos, a partir de la acetil Co-A.

b) - Formación de unidades isopropenoides a partir del mevalonato por pérdida de  $\text{CO}_2$ .

Las unidades isopropenoides se pueden considerar como los bloques de construcción del esqueleto del esteroide, seis de estas unidades isopropenoides se condensan para formar un intermediario - el escualeno, el cual a su vez da origen al esteroide progenitor, - el lanosterol. El colesterol se forma del lanosterol después de varios pasos ulteriores.



### Transporte del colesterol.

En la dieta es absorbido desde el intestino y junto con otros lípidos, incorporados en los quilomicrones. La presencia de bilis y jugos pancreáticos es necesaria para la absorción. Del colesterol absorbido, 80 - 90 % está en la forma esterificada. En contraste al colesterol los esteroides vegetales (ejemplo, sitosterol) son mal absorbidos.

El colesterol plasmático total es cerca de 200 mg. por 100 ml., en el hombre, pero hay amplias variaciones entre los individuos. La mayor parte se encuentra en la forma esterificada. Es transportada en forma de lipoproteínas en el plasma y la proporción más alta de colesterol se encuentra en las lipoproteínas de baja densidad.

### Excreción del colesterol.

El colesterol es eliminado por dos vías principalmente.

a) - La conversión en ácidos biliares: un 80 - 90 % del colesterol corporal es excretado en las heces fecales después de su conversión en ácidos biliares en forma de esteroides neutros. Mucho del colesterol secretado en la bilis es reabsorbido y se cree que el colesterol que sirve como precursor para los esteroides fecales se deriva de la mucosa intestinal. El coprosterol es el principal esterol en las heces se forma del colesterol en el intestino delgado por las bacterias residentes.

b) - La síntesis de las hormonas esteroideas a partir del colesterol y la eliminación de sus productos de degradación en la o-

rina son de menor significación cuantitativa.

#### Factores que disminuyen el colesterol sanguíneo.

La sustitución en las dietas de los ácidos grasos poliinsaturados por algunos de los ácidos grasos saturados. Los aceites que ocurren en la naturaleza que son útiles para bajar el colesterol sanguíneo, incluyen el aceite de cacahuete, de algodón, de maíz y el de cartamo, mientras que la grasa de la mantequilla y el aceite de coco elevan el nivel.

Dilucidado así el papel que juega el colesterol en los procesos metabólicos y fisiológicos y considerando la importancia que su determinación en el laboratorio clínico tiene para el diagnóstico médico; se revisaron varias de las técnicas ya establecidas estudiándose cuidadosamente sus ventajas y desventajas, se eligieron dos de ellas que son las que se compararon.

Entre las técnicas revisadas están:

El método Bloor, Pelkan y Allen, (8); Zack, (7); Leffler, (9); Schenheimer y Sperry, (5); cloruro férrico, (Crowford, 1958; -- Cheimori, 1959; Leffler, 1959), (2); Sackett, (9); Ferro y Ham, (1).

En el método de Bloor, Pelkan y Allen se realizan simultáneamente la extracción del colesterol total y la precipitación de las proteínas con una mezcla alcohol-éter, el alcohol precipita las proteínas mientras que el éter es el extractor principal. El extrac



to se evapora a sequedad y se extrae del residuo seco el colesterol total (junto con otros lípidos) con cloroformo, la solución resultante se somete a la reacción de Lieberman-Burchard. Esta reacción consiste en la producción de una serie de colores al tratar la solución clorofórmica de colesterol con anhídrido acético y ácido sulfúrico, el color en las condiciones de la técnica es verde. Se desconoce la naturaleza de la reacción, pero parece que es específica para los esteroides no saturados en los carbonos 5 - 6.

El método de Zack emplea la reacción de Salkowski. Esta técnica no precisa de la extracción del colesterol y permite operar en muy pequeña cantidad de suero, pero requiere el empleo de reactivos de gran pureza.

Entre las ventajas que ofrece esta técnica es que no requiere extracción, el tiempo empleado es poco y se usan pequeñas cantidades de suero para la determinación.

En el método de Leffler se añade el suero alcohol isopropílico que al mismo tiempo que precipita las proteínas, extrae el colesterol, tanto el libre como el esterificado. El colesterol extraído se mide directamente por el color púrpura que produce con el cloruro férrico y ácido sulfúrico (reacción de Lieberman Burchard modificada).

En el método de Schenheimer y Sperry se usa mezcla al---

cohol-acetona para precipitar las proteínas y extraer el colesterol y los ésteres de colesterol de la muestra de la sangre total o mejor -- de plasma o suero. El colesterol se precipita con digitonina antes de la saponificación (colesterol libre) o después de ella (coleste-- rol total) y el digitónido separado se purifica y somete a la reac-- ción de color de Lieberman-Burchard.

En el método del cloruro férrico, (Crowford, 1958; Cheimo-- ri, 1959; Leffler, 1959), se consideran dos etapas preliminares al-- ternativas, en una se extraen del suero colesterol libre y coleste-- rol esterificado y se precipitan las proteínas con mezcla de Bloor, de alcohol-éter, o con isopropanol. Una porción, tras evaporación - hasta sequedad o sin ella, se trata con reactivo de cloruro férrico- ácido acético (más estable que el cloruro férrico-ácido sulfúrico u-- tilizado a veces).

En la otra, el suero se trata directamente con el reactivo de cloruro férrico-ácido acético y las proteínas se precipitan calen-- tando la mezcla. En cualquiera de los casos se añade luego ácido -- sulfúrico; se desprende calor y aparece una coloración parda clara - al principio que se vuelve púrpura rojiza intensa. En microadapta-- ciones, el color producido no puede ser suficiente para elevar la -- temperatura al grado que requiere un desarrollo pleno del color; en tal caso, los tubos se sumergen brevemente en un baño de agua hir--- viendo.



Esta técnica ofrece de ventajas que la extracción del colesterol se puede obtener sin necesidad de llevar a sequedad y que el reactivo de color es mucho más estable que el del cloruro férrico-ácido sulfúrico y que también se puede hacer la determinación -- tratando directamente el suero con el reactivo de color.

En el método de Sackett se realizan simultáneamente la extracción del colesterol total y la precipitación de las proteínas -- con una mezcla alcohol-éter, el alcohol precipita las proteínas, -- mientras que el éter es el extractor principal. El extracto se evapora a sequedad y se extrae el residuo seco, el colesterol total -- (junto con otros lípidos) con cloroformo; la solución resultante se somete a la reacción de Lieberman-Burchard.

Esta técnica ofrece de ventaja que los productos finales son muy estables.

En el método de Ferro y Ham la determinación del colesterol es desarrollada directamente sin la extracción de los lípidos.

Esta técnica ofrece de ventaja que la determinación se hace directamente, requiere muy poco tiempo y muy pocos reactivos.

El objeto de la presente tesina es buscar un método con -- las características adecuadas para ser adoptado como método de rutina en el laboratorio de Análisis Clínicos Servicio Social Labastida

Universidad de Monterrey.

La técnica escogida deberá llenar los siguientes requisitos:

- 1 - Ser reproducible dentro de los límites aceptables para los valores conocidos en la población.
- 2 - No estar sometida a muchas fuentes de error.
- 3 - No requerir reactivos difíciles de preparar y de conseguir en el mercado.
- 4 - No requerir equipo con el que no cuente el laboratorio.
- 5 - No requerir demasiado tiempo de personal.

De las técnicas mencionadas previamente se seleccionaron la de Bloor, Pelkan y Allen y la de Ferro y Ham por las ventajas ya mencionadas. Por ello se planeó un estudio comparativo de ambas técnicas con el objeto de determinar cual de ellas respondería mejor a los requisitos señalados.



## MATERIAL Y METODOS

Se emplearon en este estudio las técnicas de Bloor, Pelkan y Allen, (8) y la de Ferro y Hamm, (1).

1 - Se hizo una curva de calibración para cada uno de los métodos.

2 - Se hizo una serie de 11 determinaciones por cada uno de los métodos en un "pool" de sueros.

### Preparación del "pool" de sueros.

Las muestras de sangre que se emplearon para preparar el "pool" de suero se obtuvieron de personas, seleccionadas al azar, que asistieron al laboratorio de Análisis Clínicos Servicio Social Labastida durante el mes de marzo de 1972. A cada una de ellas se le extrajeron por punción en el pliegue del codo con aguja calibre -



21, de cinco a diez ml. de sangre. Cada una de estas muestras fue depositada en un tubo de 13 x 100 m.m., se dejó coagular y retraer el coagulo y se separó el suero por centrifugación; los sueros hemolizados o turbios fueron descartados. Las porciones de suero así obtenidas se fueron juntando en un matraz que se mantuvo constantemente en el congelador (-10°C). Una vez recolectada la cantidad adecuada de suero, se descongeló a temperatura ambiente, se homogenizó por rotación y se repartió en tubos de 12 x 75 m.m. estos tubos se congelaron (-10°C) y se mantuvieron a esta temperatura hasta el momento de ser usados. Los volúmenes contenidos en cada tubo fueron los necesarios para hacer las 2 determinaciones correspondientes a cada serie, de tal manera que en cada ocasión se sacó un tubo del congelador, se descongeló a temperatura ambiente y se utilizó de inmediato para hacer dos determinaciones. Todo este procedimiento se llevó a cabo con material previamente lavado con mezcla crómica, enjuagado con agua destilada y esterilizado en autoclave.

Preparación de las soluciones de colesterol para la calibración del método de Bloor, Pelkan y Allen.

Para hacer la curva de calibración se partió de una solución "stok" conteniendo 100 mg. de colesterol en 100 ml. de cloroformo; de esta solución se tomaron porciones de 2, 3, 4, 5, 6, 7, y 8 ml. y se aforaron a 100 ml. con cloroformo. Las soluciones así obtenidas son equivalentes a los filtrados 1:25 de sangre que contienen 100, 150, 200, 250, 300, 350 y 400 mg. de colesterol en 100 ml. de suero.

Método de Bloor, Pelkan y Allen, (8).

- 1 - En un matraz de aforación de 25 ml. se ponen 10 ml. de mezcla alcohol-éter.
- 2 - Se añade despacio y haciendo girar el matraz, 1 ml. de suero.
- 3 - Se sumerge el matraz en baño de agua, hasta que comienza a hervir el contenido del matraz.
- 4 - Se enfría con agua de la llave.
- 5 - Se afora a 25 ml. con mezcla alcohol-éter.
- 6 - Se agita el matraz con fuerza y se filtra con papel filtro de pliegues, Whatman 40, cubriendo el embudo con un vidrio de reloj para reducir la evaporación.
- 7 - En un vaso de precipitados de 50 ml. se ponen 10 ml. del filtrado.
- 8 - Se evapora a sequedad en baño de agua caliente (no debe usarse flama).



- 9' - Se añaden 3 ml. de cloroformo, se agita con agitador de vidrio, se hace hervir un momento, se deja reposar el sedimento y se decanta con cuidado el líquido claro que sobrenada recogiendo en una probeta seca de 10 ml.
- 10 - Se repite la extracción dos veces más con porciones de 3 ml. de cloroformo, reuniendo los extractos claros en la misma probeta.
- 11 - Se deja enfriar a la temperatura ambiente y se completa el volumen hasta 10 ml. con cloroformo.
- 12 - En una segunda probeta se ponen 10 ml. de la solución estandard.
- 
- 13 - A ambas probetas (una conteniendo el problema y otra conteniendo el estandard), se les añade 2 ml. de reactivo de Lieberman-Burchard. Se tapan y se mezcla el contenido inclinándolas a un lado y otro.
- 14 - Se colocan en un baño de agua a 30°C durante 15 min.
- 15 - Se prepara un blanco, poniendo 5 ml. de cloroformo y 1 ml. del reactivo.

10 - Se compara en un fotocolorímetro (\*), usando filtro rojo, llevando a cero el aparato con el blanco.

11 - El contenido de colesterol del problema se calcula utilizando la formula:

$$\frac{200}{\text{Lectura de la solución estándar}} \times \text{Lectura del problema} = \text{mg. de colesterol en 100 ml.}$$

En donde 10 ml. de la solución estándar son equivalentes a los 10 ml. de extracto clorofórmico que se usaron en la técnica de un suero que contenga 200 mg. de colesterol en 100 ml.

#### REACTIVOS.

1 - Cloroformo, Q.P.

2 - Mezcla anhídrido acético y ácido sulfúrico (reactivo de Lieberman-Burchard.)

Se mezclan, en una probeta seca con tapón de vidrio - 20 ml. de anhídrido acético y 2 ml. de ácido sulfúrico concentrado. Se enfría en el refrigerador, esta mezcla debe usarse dentro de la primera hora de su preparación.

3 - Mezcla alcohol-éter.

Se mezclan, en una probeta, 75 ml. de alcohol al 95% y 25 ml. de éter etílico.

4 - Solución patrón de colesterol.

Se disuelven 160 mg. de colesterol en 50 ml. de cloro



formo, se colocan en un matraz de aforación de 100 -- ml. y se afora hasta la señal con cloroformo.

5 - Solución estándar de colesterol. (Para emplear en la determinación).

Se ponen 5 ml. de la solución anterior en un matraz de aforación de 100 ml. y se afora con cloroformo hasta la señal. Ambas soluciones se conservan bien, si se evita la evaporación usando frascos con tapón esmerilado y conservándolos a bajas temperaturas.

Preparación de las soluciones de colesterol para la calibración del método de Ferro y Ham.

Para la curva de calibración hecha por este método la solución "stok" contiene 400 mg. de colesterol en 100 ml. de ácido acético glacial y es equivalente a una sangre que contiene 400 mg. de colesterol en 100 ml., cuando se usan 0.1 ml.

A partir de esta solución se prepararon seis diluciones - de la siguiente manera:

Solución A: Solución "stok" 87.5 ml., aforados a 100 ml. con ácido acético glacial. Equivale a una -- sangre que contiene 350 mg. de colesterol en 100 ml.

Solución B: Solución "A" 85.7 ml., aforados a 100 ml. con ácido acético glacial. Equivale a una sangre

que contiene 300 mg. de colesterol en 100 ml.

Solución C: Solución "B" 83.3 ml. aforados a 100 ml. con ácido acético glacial. Equivale a una sangre que contiene 250 mg. de colesterol en 100 ml.

Solución D: Solución "C" 80 ml., aforados a 100 ml. con ácido acético glacial. Equivale a una sangre que contiene 200 mg. de colesterol en 100 ml.

Solución E: Solución "D" 75 ml., aforados a 100 ml. con ácido acético glacial. Equivale a una sangre que contiene 150 mg. de colesterol en 100 ml.

Solución F: Solución "E" 66.6 ml., aforados a 100 ml., con ácido acético glacial. Equivale a una sangre que contiene 100 mg. de colesterol en 100 ml.

Método directo de Ferro y Ham, (1).

- 1 - Poner en un tubo 0.5 ml. de suero y añadir 0.5 ml. de agua destilada.
- 2 - Poner en un tubo 0.2 ml. de esta dilución de suero.
- 3 - Introducir la punta de una pipeta graduada de 10 ml. llena de reactivo de color y dejar caer rápidamente -



6 ml. de reactivo, agitando cuidadosamente de que caiga directamente sobre el suero diluido, no se necesita agitación posterior.

4 - El máximo de color ocurre en  $90 \pm 30$  segundos y se mantiene estable alrededor de 1 min. más.

5 - Se prepara un blanco con 0.2 ml. de agua destilada y 6 ml. de reactivo de color.

6 - Se prepara un "standard" de trabajo.

Poner 0.1 ml. del "standard", 0.2 de agua destilada y 5.9 ml. de reactivo de color.

7 - Se compara en un fotocolorímetro (\*), usando filtro rojo, llevando a cero el aparato con el blanco.

8 - El contenido de colesterol de la muestra se calcula utilizando la fórmula:

$$\frac{\text{Lectura del suero problema}}{\text{Lectura del "standard"}} \times 250 = \text{mg. de colesterol en 100 ml.}$$

En donde 0.1 ml. del "standard" son equivalentes a un suero que contenga 250 mg. de colesterol en 100 ml.

#### REACTIVOS.

1 - Anhídrido acético, Q.P.

(\*) Klett-Summerson photoelectric colorimeter;  
Klett Mfg. Co., New York.

2 - Acido acético glacial, Q.P.

3 - Reactivo de color (Lieberman-Burchard modificado).

Se mezclan en una probeta con tapón de vidrio 30 ml. de anhídrido acético, 20 ml. de ácido acético glacial y 5 ml. de ácido sulfúrico concentrado. Se mezcla -- bien y se enfría a temperatura ambiente.

4 - Standard de colesterol.

Se disuelven 250 mg. de colesterol en ácido acético - glacial, se colocan en un matraz de aforación de 100 ml. y aforar con ácido acético glacial hasta la señal.



## RESULTADOS

### Calibración para la técnica de Bloor, Pelkan y Allen, (8).

Para hacer la curva de calibración, se decidió originalmente, hacer un total de nueve determinaciones para cada uno de los siete puntos en que descansaría el trazo, correspondientes a las concentraciones mencionadas en el capítulo anterior; estas nueve de terminaciones se harían repartidas en tres series de tres repeticiones cada una.

Considerando que el proceso de extracción con cloroformo es la parte de la técnica que más errores puede introducir en la cuantificación, en lugar de utilizar las soluciones clorofórmicas de colesterol de concentración conocida, directamente, estas soluciones se manejaron como si se tratara del filtrado alcohol - éter de suero problema, es decir se evaporaron y se extrajo el colesterol con tres adiciones de cloroformo. Los resultados obtenidos de

esta manera se presentan en la tabla 1. Como puede verse en ella - la reproducibilidad fue muy pobre; en la primera serie, las diferen - cias entre las repeticiones carecen relativamente de importancia, - en las series 2 y 3 la mayor parte de las repeticiones presentan po - ca variabilidad entre si, sin embargo cuando se comparan las medias aritméticas de las tres series, las diferencias entre ellas si son considerables; por ejemplo, en la primera serie la lectura promedio para la concentración de 100 mg. fue de 90 mientras que en la segun - da serie tuvo un valor tan bajo como 64. Examinando la tabla 1 pue - de apreciarse que esta variabilidad se presentó en la mayor parte - de las concentraciones.

Analizando las posibilidades para explicar esta variabili - dad se pensó que en el proceso de extracción con cloroformo, sin -- control de la temperatura, la ebullición brusca del cloroformo ha-- ría que algo de el "saltara" fuera del vaso con la pérdida conse--- ciente de colesterol. Con objeto de comprobar experimentalmente es - ta suposición se hizo el siguiente experimento:

Serie de vasos de precipitado de 50 ml. conteniendo 10 - ml. de cloroformo, fueron expuestos a temperaturas controladas empe - zando por 95°C. y disminuyendo en cada experimento la temperatura - en 5°C. Se encontró que a 70°C. (en baño de agua) se evaporaba el cloroformo en aproximadamente 50 min. sin llegar a hervir.

Una vez determinadas estas condiciones se procedió a repe



tir la curva de calibración en esta ocasión haciendo un total de 4 determinaciones para cada concentración repartidas en dos series de dos determinaciones cada una. Los resultados obtenidos de esta manera se presentan en la tabla 2; como puede verse en ella la reproducibilidad es satisfactoria sin diferencias importantes entre las repeticiones de cada serie ni entre las series; estos valores se encuentran graficados (gráfica 2).

#### Calibración para la técnica de Ferro y Ham. (1)

Para hacer la curva de calibración por este método se utilizan siete soluciones de colesterol con las concentraciones mencionadas en el capítulo anterior. Debido a que la estabilidad del compuesto coloreado que se cuantifica en esta técnica es muy poco estable (tiene una duración máxima de un min.), no fue posible hacer series de repeticiones que son deseables para comparar la variabilidad interna de las réplicas de una serie con la de las series entre si, ya que ello requiere de un tiempo superior al de la estabilidad del compuesto coloreado. Por ello se corrieron el total de siete concentraciones para cada curva en forma individual, repitiéndose nueve veces. En la tabla 3 se presentan los valores así obtenidos.

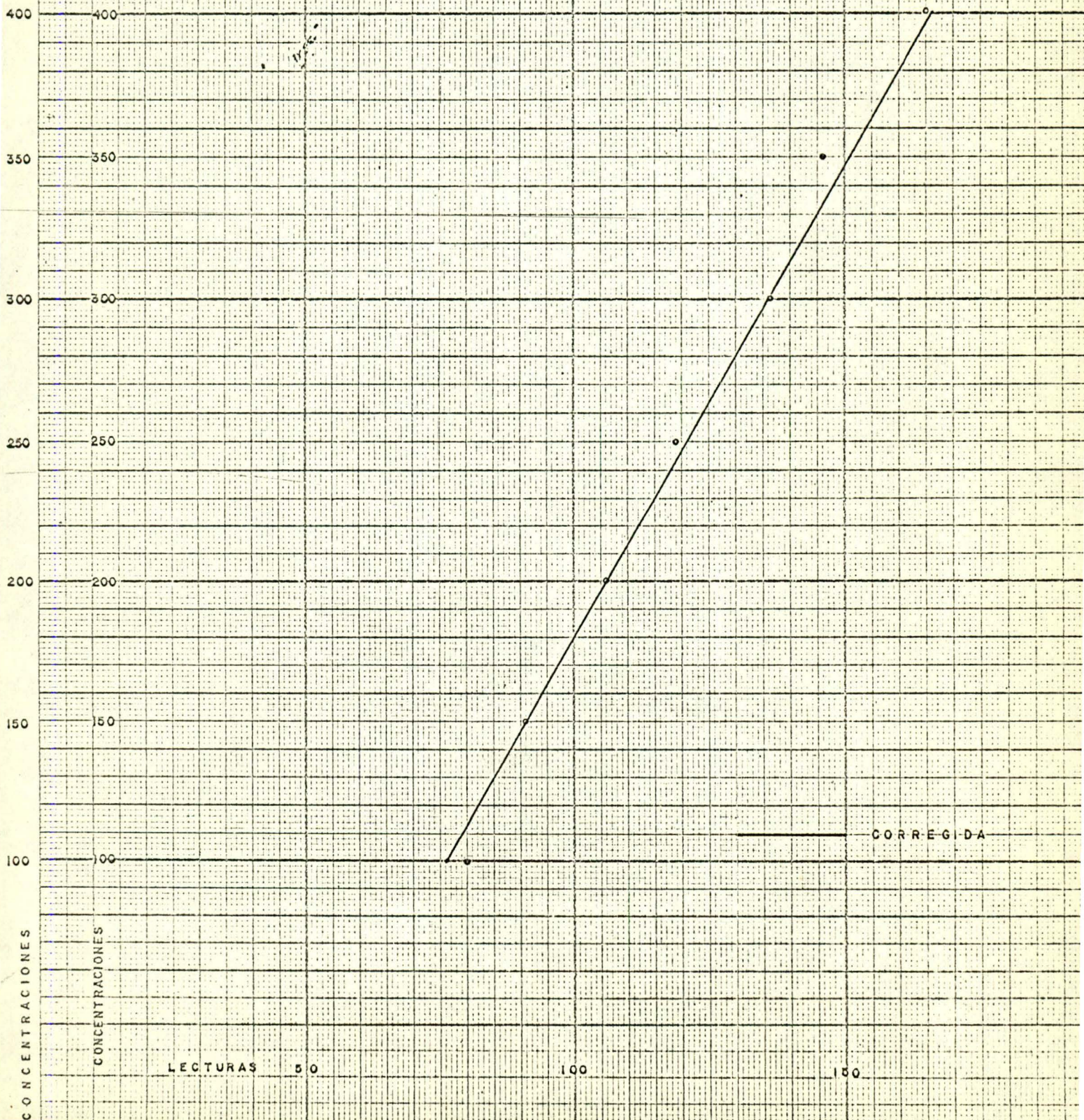
Como puede verse en ella hay una reproducibilidad casi absoluta; estos valores se encuentran graficados (gráfica 3).



GRAFICA No 1

CURVA DE CALIBRACION PARA DETERMINACION DE COLESTEROL SANGUINEO POR EL METODO DE BLOOR-PELKAN-ALLEN, USANDO UN FOTOCOLORIMETRO "KLETT" SE GRAFICARON LAS MEDIAS DE LOS EXPERIMENTOS

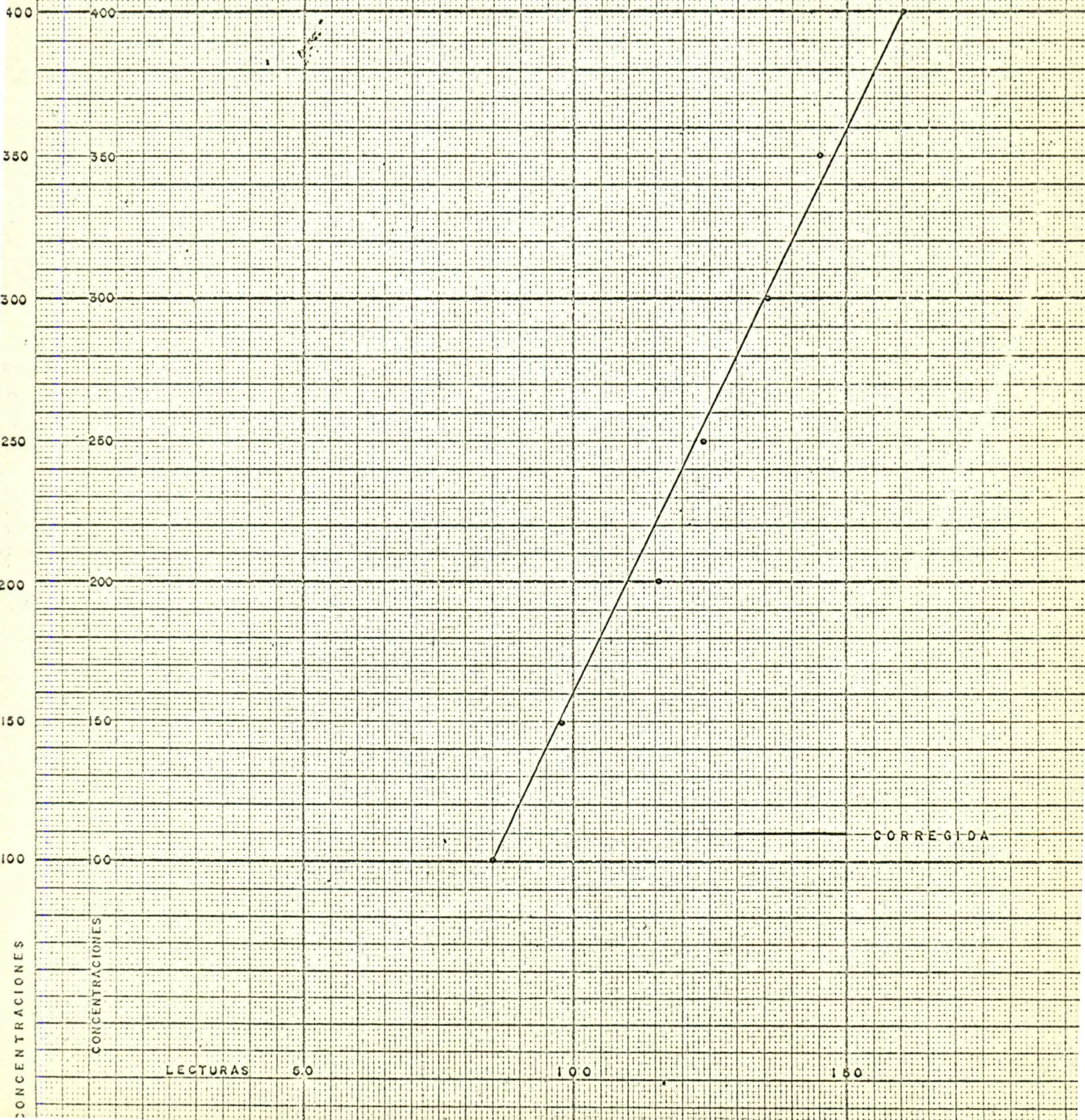
1 2 3





GRAFICA N° 2

CURVA DE CALIBRACION PARA DETERMINACION DE COLESTEROL SANGUINEO POR EL METODO DE BLOOR-PELKAN-ALLEN, USANDO UN FOTOCOLORIMETRO "KLETT" SE GRAFICARON LAS MEDIAS DE LOS EXPERIMENTOS





GRAFICA N.º 3

CURVA DE CALIBRACION PARA DETERMINACION DE COLESTEROL SANGUINEO POR EL METODO DIRECTO DE FERRO Y HAMN USANDO FOTOCOLORIMETRO "KLETT" SE GRAFICARON LAS MEDIAS DE LOS EXPERIMENTOS 1, 2, 3, 4, 5,

6, 7, 8, 9

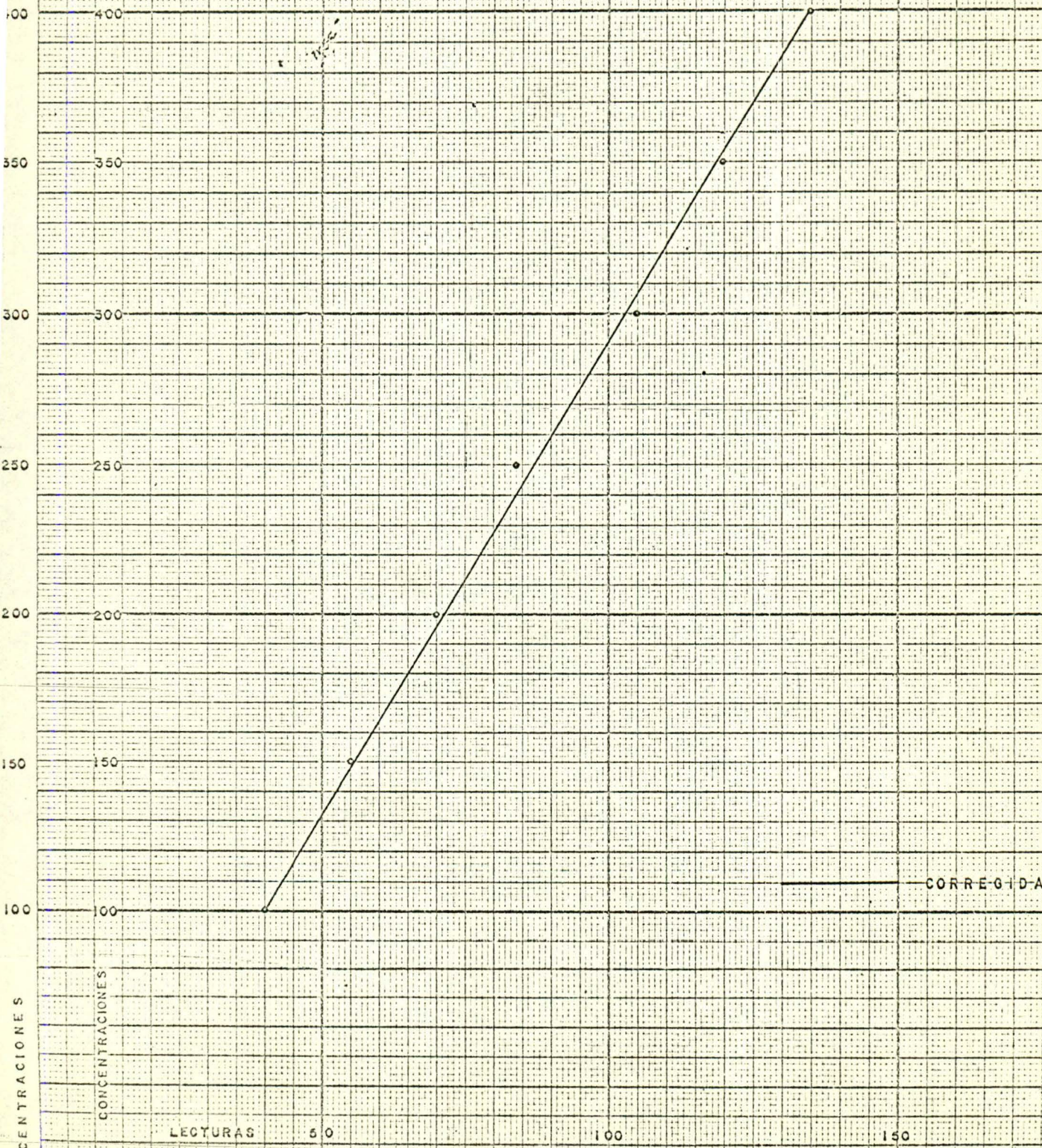




TABLA 1

Valores expresados en mg. por 100 ml. de colesterol sanguíneo obtenidos en 3 series de 3 determinaciones de cada una de las concentraciones de colesterol. Por el método de Bloor, Pelkan y Allen.

Concentraciones en mg. por 100 ml.	Determinaciones												Media Aritmética.
	1				2				3				
	A	B	C	$\bar{X}$	A	B	C	$\bar{X}$	A	B	C	$\bar{X}$	
100	85	100	85	90	61	66	65	64	85	94	85	88	81
150	105	105	105	105	75	75	75	75	96	95	90	94	91
200	112	103	112	109	93	97	95	95	112	112	120	115	106
250	126	124	120	123	95	100	105	100	130	137	135	134	119
300	135	130	130	132	122	125	124	124	145	150	140	145	134
350	140	142	138	140	132	147	140	140	155	155	160	157	146
400	152	154	150	152	160	165	170	165	180	175	172	179	165

TABLA 2

Valores expresados en mg. por 100 ml. de colesterol sanguíneo obtenido en 2 series de 2 determinaciones cada una de las concentraciones de colesterol. Por el método de Bloor, Pelkan y Allen.

Concentra ciones en mg. por - 100 ml.	Determinaciones						Media Aritmética
	4			5			
	A	B	$\bar{X}$	A	B	$\bar{X}$	
100	87	85	86	82	85	83	85
150	98	98	98	98	98	98	98
200	116	118	117	115	114	115	116
250	124	124	124	124	124	124	124
300	134	138	136	134	136	135	136
350	145	143	144	145	145	145	145
400	160	158	159	160	160	160	160



TABLA 3

Valores expresados en mg. por 100 ml. de colesterol sanguíneo obtenidos en 9 determinaciones de cada una de las concentraciones de colesterol. Por el método de Ferro y Hamn.

Concentraciones en mg. por 100 ml.	Determinaciones									Media Aritmética
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
100	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
150	55	54	55	55	57	55	54	54	57	55
200	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70
250	85	84	85	85	85	85	85	86	82	84
300	105	105	107	105	105	104	105	105	102	105
350	120	120	120	120	120	120	120	120	121	120
400	135	135	135	132	134	135	135	135	137	135

Determinaciones en el "pool" de sueros por la técnica de Bloor, Pelkan y Allen.

Se hizo un total de 11 determinaciones en un "pool" de -- sueros, que fueron programados para verificarse como 11 series. La técnica empleada es la original descrita en el capítulo anterior -- con una sola modificación consistente en hacer la extracción evaporando a 70°C. por las razones antes mencionadas. En la tabla 4 se presentan los resultados obtenidos. Como puede verse en ella el -- rango total de variación esta comprendido entre 214 - 218 mg. por -- 100 ml., con una media aritmética de 215 mg. en 100 ml. y una D.S. de 1.6 correspondiente aun C.V. de 0. 74 %

Con estos valores se presenta el esquema para establecer un programa de control de calidad para la determinación de colesterol sanguíneo por este metodo, (fig. 3).

Determinaciones en el "pool" de sueros por la técnica de Ferro y -- Ham.

Se hizo un total de 11 determinaciones en un "pool" de -- sueros, que se trabajaron individualmente. La técnica empleada es la original descrita en el capítulo anterior. En la tabla 5 se pre-- sentan los resultados obtenidos entre 212 - 221 mg. por 100 ml., -- con una media aritmética de 213 mg. en 100 ml. y una D.S. de 2.6 -- correspondiente a un C.V. de 1.20 %.

Con estos valores se presenta el esquema para establecer un programa de control de calidad para la determinación de colesterol sanguíneo por este metodo, (fig. 4).



TABLA 4

Resultados obtenidos en 11 sueros problemas para determinación de colesterol sanguíneo, por el método de Bloor, Pelkan y Allen, usando un fotocolorímetro Klett.

Determinación	mg. por 100 ml. de - colesterol sanguíneo.
1	214
2	216
3	214
4	218
5	216
6	214
7	218
8	214
9	214
10	216
11	214
Media Aritmética	215
Desviación standar.	1,6

TABLA 5

Resultados obtenidos en 11 sueros problemas para determinación de colesterol sanguíneo, por el método de Ferro y Ham, usando un fotocolorímetro Klett.

Determinación	mg. por 100 ml. de colesterol sanguíneo.
1	212
2	215
3	212
4	212
5	215
6	215
7	215
8	212
9	218
10	215
11	221
Media Aritmética	215
Desviación standar.	2,6



FIGURA 3.- Esquema de un diagrama para control de calidad Bloor, Pelkan y Allen.

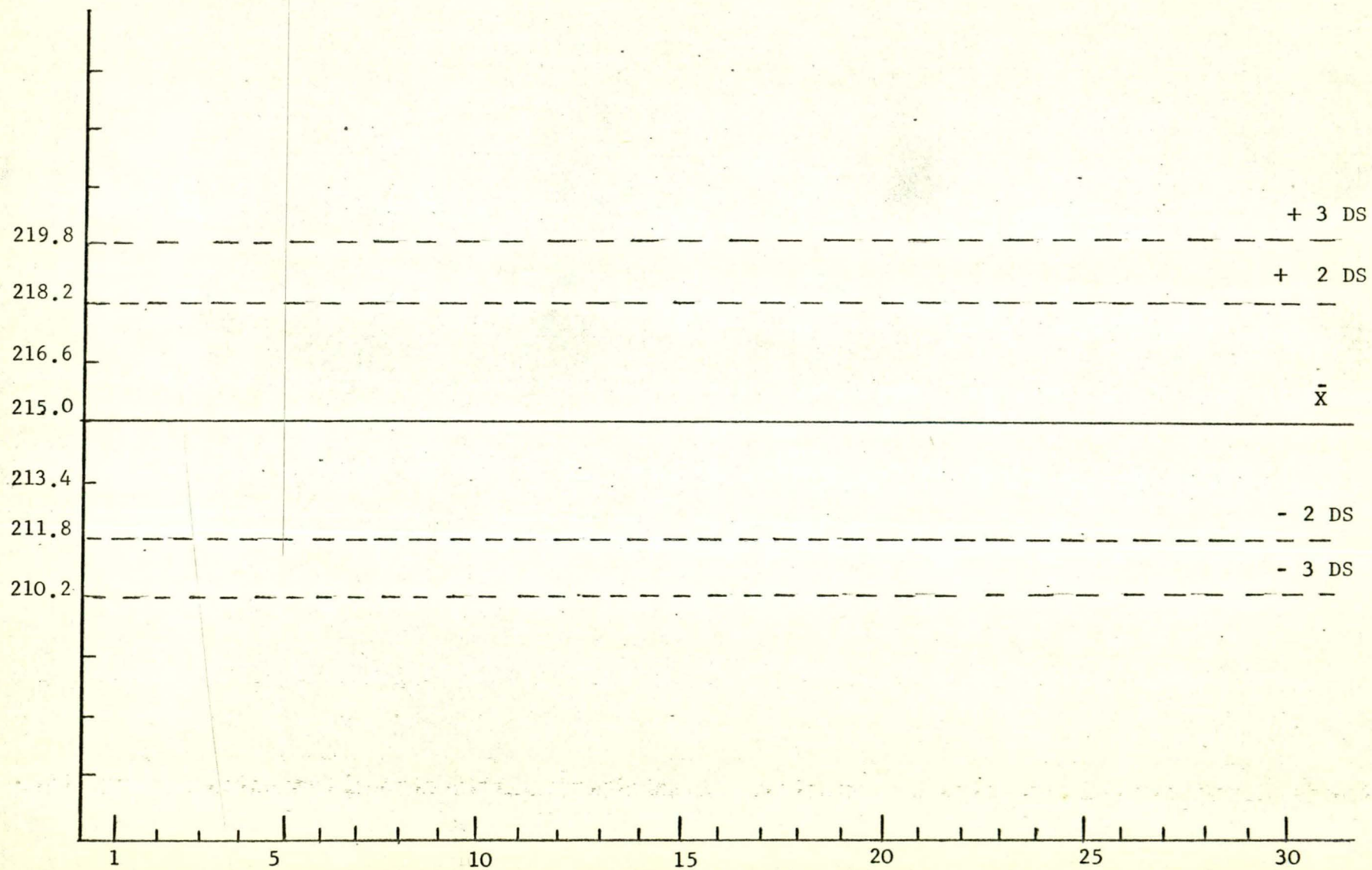
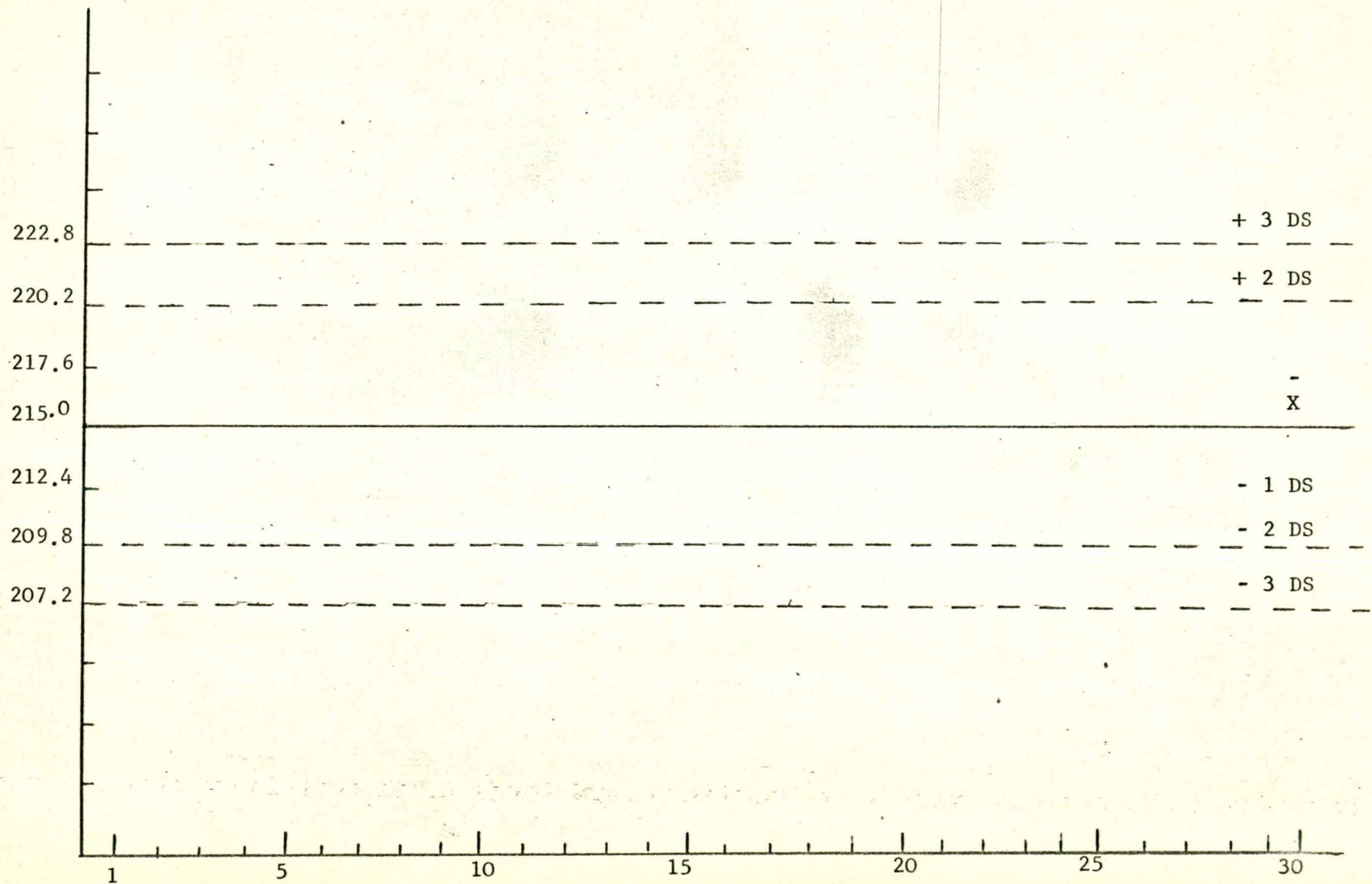


FIGURA 4.- Esquema de un diagrama para control de calidad Ferro y Ham.





Determinaciones en un suero control comercial (\*) por las técnicas de Bloor, Pelkan y Allen y Ferro y Ham.

Se hizo un total de 6 determinaciones, que fueron programadas para verificarse 3 determinaciones por cada una de las técnicas. Las técnicas empleadas fueron las originales descritas en el capítulo anterior.

Las concentraciones contenidas en el suero control son las siguientes:

Métodos directos

Ferro y Ham ----- 206 mg. por 100 ml.

Métodos de extracción.

Bloor, Pelkan y Allen ----- 200 mg. por 100 ml.

En la siguiente tabla se presentan los resultados obtenidos:

Método de Ferro y Hamn	mg. % de colesterol sanguíneo
Determinación	
1 -----	203
2 -----	203
3 -----	203
Método de Bloor, Pelkan y Allen	
Determinación	
1 -----	198
2 -----	196
3 -----	198

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

La técnica de Bloor, Pelkan y Allen, es más laboriosa que la técnica de Ferro y Ham requiriéndose mayor tiempo para su realización debido a que incluye una serie de pasos poco prácticos y que en ninguna forma pueden modificarse; en cuanto a la técnica de Ferro y Ham implica un procedimiento sencillo.

Los reactivos requeridos por ambas técnicas son de adquisición posible y de costo bastante moderado (excepto algunos usados en la técnica de Bloor, Pelkan y Allen); en cuanto a la estabilidad de los reactivos podemos considerar que duran en buenas condiciones por lapsos de tiempos aceptables, excepto el reactivo de color en la técnica de Bloor, Pelkan y Allen (mezcla de anhídrido acético y ácido sulfúrico) es estable únicamente solo por una hora después de su preparación, y en la técnica de Ferro y Hamn (mezcla de anhídrido acético, ácidos sulfúrico y ácido acético glacial) que se debe -



preparar cada vez que se hagan las determinaciones.

Causas que pueden ser fuente de error en la técnica de --  
Bloor, Pelkan y Allen son:

- 1 - La temperatura del baño de agua deberá ser controlada.
- 2 - La presencia de pequeñas cantidades de agua o simplemente humedad, no permite que se desarrolle la reacción de color.
- 3 - Debe evitarse la hemólisis, aunque si esta es ligera no altera los resultados.
- 4 - Los sueros deberán refrigerarse si la medición no es inmediatamente o en un período de tiempo razonable.

En si el número de pasos de esta técnica es mucho mayor, por lo tanto la posibilidad de error también es mayor y el tiempo requerido para cada determinación es prolongado.

Los errores cometidos en la técnica de Ferro y Ham son debidos al operador si no se tiene cuidado con el tiempo que se mantiene estable la reacción coloreada, con respecto al tiempo requerido para efectuar cada una de las determinaciones se observó que el tiempo empleado es corto.

En esta técnica el estandard y los problemas se trabajan de forma distinta. Observando lo anterior se hicieron determinaciones con cada una de las concentraciones conocidas de colesterol, --

trabajándolas como si fueran sueros y en los resultados no se observaron diferencias considerables.

Cuando las lecturas se hacen en un fotocolorímetro se pueden usar 4 ml. de reactivo de color en lugar de 6 ml. y no hay diferencia en los resultados.

Con respecto a la reproducibilidad de ambas técnicas podemos concluir: que si el coeficiente de variabilidad es de 0.74% para la técnica de Bloor, Pelkan y Allen y de 1.20% para la técnica de Ferro y Hamn, tomando en cuenta los valores normales para ambas técnicas, vemos que estas variaciones no son de significación considerable y que por lo tanto, ambas técnicas son reproducibles. Después de haber considerado detenidamente los puntos anteriormente expuestos, puedo sugerir como técnica más adecuada la de Ferro y Hamn, para que sea establecida como técnica estandar en el laboratorio de Análisis Clínicos Servicio Social Labastida - Universidad de Monterrey.



## RESUMEN

En este estudio se compararon dos técnicas para la determinación de Colesterol Sanguíneo, la de Bloor, Pelkan y Allen, y - la de Ferro y Hamn.

De un "pool" de sueros se hicieron 11 determinaciones, -- por cada técnica. Cada día se corría un estandar y un control de - concentración conocida, adquirido comercialmente. Con los valores obtenidos se calculó la media aritmética y la desviación estandar - para las determinaciones de cada técnica. Se analizaron los resul- tados así como las ventajas y desventajas de ambas técnicas, eli--- guiéndose la de Ferro y Ham como técnica para ser estandarizada en el Laboratorio de Análisis Clínicos Servicio Social Labastida - Universidad de Monterrey.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Bauer, J.D.; Ackermann, P.G. and Toro, G.; Bray's Clinical Laboratory Methods. 7th Ed.; Mosby, Saint Louis. 764 p. --- 1968.
2. Davidson, J.; Welles, B.B. and Todd - Stanford; Diagnóstico Clínico de Laboratorio; 4a. Ed. Marin, S.A., Barcelona, --- 1020 p. 1968.
3. Guyton, C. A.; Fisiología Humana; 3a. Ed. Interamericana, México 468 p. 1969.
4. Harper, A. H.; Manual de Química Fisiológica. 2a. Ed. Manual Moderno, México. 537 p. 1969.
5. Harrow, B. y Mazur, A.; Bioquímica Básica. 9a Ed. Interamericana, México. 546 p. 1967.



6. Hawk, B. P.; Oser, L. B. y Summerson, H. W.; Química fisiológica práctica. Interamerica, México. 1850 p. 1949.
7. Julmes, Ch.; Jude, A.; Querangal, E. y Delgo, J.; Prácticas de Laboratorio. 1a. Ed. Toray - Mason, Barcelona, 1020p.; 1968.
8. Kolmer, J. A.; Spaulding, E. H. y Robinson, H. W.; Métodos de laboratorio, 5a. Ed. Interamericana, México. 1152 p.; 1960
9. Lynch, J. M.; Raphael, S. S. and Mellor, D.L.; Métodos de Laboratorio. Interamericana, México. 661 p. 1965.
10. Mason, S. H. Todd, R. W. y West, S.E.; Bioquímica Médica. 4a. Ed. Interamerica, Mexico. 1214 p. 1969.
11. Miller, S. E. and Weller, J.M.; Clinical Pathology; 8th Ed. --- Williams & Wilkins, Baltimore. 697 p. 1971.
12. Murray, R. S.; Estadística. McGraw-Hill, México. 357 p. 1969.
13. Oser, B. L.; Hawk's Phisiological Chemestry. 14 th Ed.; McGraw Hill, New York. 1338 p. 1965.

800202



## FECHA DE DEVOLUCION

El último sello marca la fecha tope para ser devuelto este libro.

Vencido el plazo, el lector pagará <sup>5</sup>1.00 peso por cada día que pase.

Plata 153,672

~~09 FEB. 1983~~  
~~23 FEB. 1983~~