

DICME
\$500

800250

FECHA DE DEVOLUCION

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

Vencido el plazo, el lector pagará 1.00 peso por cada día que pase.

(11-013)

8 NOV. 1978



Biblioteca

- 8 MAR 1999

VENCIMIENTO



Biblioteca

- 8 MAR 1999

VENCIMIENTO

V. B. [Signature]

UNIVERSIDAD DE MONTERREY

DIVISION DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS



CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LA
DETERMINACIÓN DE PREGNANDIOL

REPORTE DEL PROGRAMA DE EVALUACION FINAL

QUE PRESENTA

MARTHA CARLOTA GARCÍA GARCÍA

EN OPCION AL TITULO DE
LICENCIADO EN QUIMICA CON ESPECIALIDAD
EN ANALISIS CLINICOS

BIBLIOTECA
UNIVERSIDAD DE MONTERREY

MONTERREY, N. L.

MAYO DE 1976

040.54
G216 C
1976

800250

INDICE

	páginas
Introducción	1
Materiales y Métodos	9
Resultados	16
Discusión y Conclusiones	20
Resumen	23
Bibliografía	25

INTRODUCCION

Las hormonas son sustancias secretadas por las células de las glándulas endócrinas y llevadas directamente a la sangre o los líquidos intersticiales, produciendo efectos, ya sea limitados o amplios, específicos o generales. Estos efectos producen modificaciones en el metabolismo o en la función de otros órganos, -- glándulas o tejidos, llamados órganos blanco de las hormonas. (1)

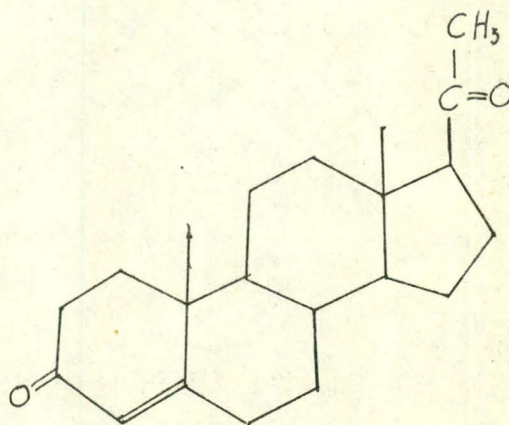
El mayor grupo de hormonas químicamente semejantes en el organismo son compuestos esteroides que comprenden las secreciones endócrinas de ovarios, testículos y corteza suprarrenal, las cuales tienen una estructura básica semejante que comparten con el colesterol, ácidos biliares, ergosterol, vitamina D y glucósidos cardiacos. (2)

El análisis de hormonas esteroides, tiene una -- gran importancia en la medicina clínica, teniendo su mayor aplicación en el campo de la investigación pues ayuda a profundizar en los conocimientos sobre biosíntesis y metabolismo de las hormonas; en el campo diagnóstico, valorando cuantitativamente la actividad y funcionalidad de las glándulas relacionadas con la producción de hormonas esteroides; y por último en el campo terapéutico, de terminando los efectos de diversos tratamientos sobre la actividad de ciertas glándulas (3)

Los procedimientos para valorar la funcionalidad de las glándulas productoras de esteroides se basan en la determinación bioquímica de ciertas hormonas o de sus metabolitos excretados en sangre u orina. (1)

Estos procedimientos tienen significado fisiológico y clínico diverso, pues informa sobre aspectos distintos de la biosíntesis de las hormonas y sus reacciones metabólicas que terminan con la eliminación de estas hormonas o sus metabolitos. (3) Una de las hormonas que

ha despertado gran interés por su importancia es la progesterona, hormona sexual femenina, cuya estructura orgánica es la siguiente; (4)



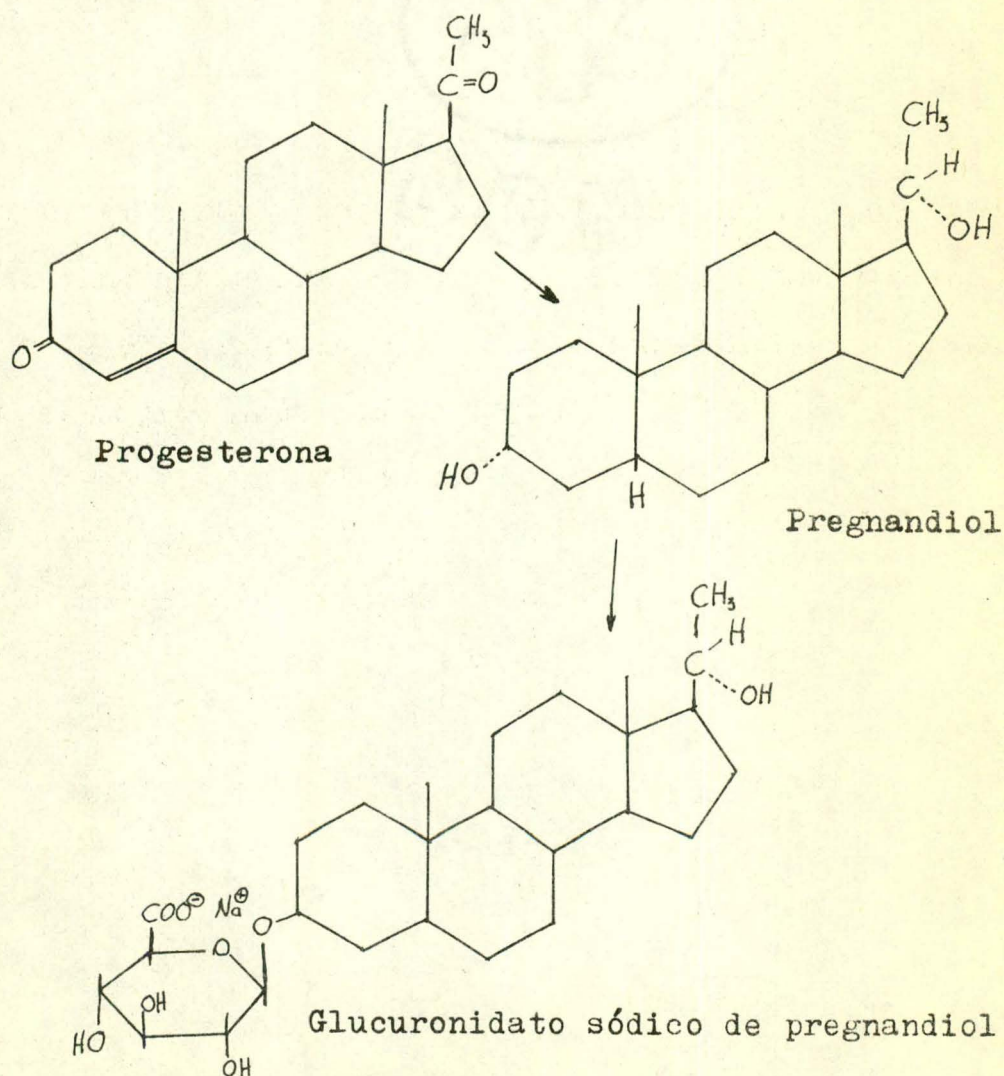
La progesterona es secretada en el ovario por el cuerpo amarillo durante la fase post-ovulatoria del ciclo menstrual y en grandes cantidades a través de la gestación por el cuerpo lúteo y la placenta. Pequeñas cantidades son secretadas por la corteza adrenal en ambos sexos. Esta hormona es causante de la anidación del huevo fertilizado y de la inhibición de las contracciones uterinas durante la gestación. (1) (5)

La progesterona influye en otras funciones biológicas diversas como la retención de sodio y cloruros, -- también puede aumentar la temperatura y el metabolismo basal del cuerpo. (6)

Cuando aumenta o disminuye su concentración puede producir alteraciones importantes de gran significación clínica. Los valores de progesterona aumentan en el embarazo, síndrome de Stein-Leventhal, hirsutismo simple, tumores de células de Leydig, pubertad precoz. Disminuyen en casos de aborto, eclampsia, metropatía hemorrágica, parto (tanto prematuro como espontáneo) y esterilidad. (1) (3)

Las principales aplicaciones que tiene en clínica la determinación de este esteroide son; como control de la evolución del embarazo, en algunas alteraciones funcionales del cuerpo amarillo, en el diagnóstico de la amenorrea y en el diagnóstico del síndrome de Stein-Leventhal. (3)

No existen métodos específicos para determinar la progesterona pues no es eliminada del organismo como tal sino que sufre una transformación a 5 β -Pregnan 3 α -20 α - diol (pregnandiol). Esta substancia que se forma en el tejido hepático se conjuga con el ácido glucurónico formándose el glucuronido de pregnandiol el cual es fácilmente eliminado por la orina. (8)



La eliminación urinaria del pregnandiol no corresponde a la cantidad total de hormona secretada, pero representa una proporción aproximada de la cantidad producida durante el periodo de recolección de la orina. Así, el análisis urinario de pregnandiol refleja de manera indirecta el índice de producción endógena de progesterona. (3) (1)

Los procedimientos principales de análisis requieren ciertos pasos generales que son; hidrólisis, extracción, purificación, separación y determinación cuantitativa final. (2)

La mayoría de los esteroides se encuentran en la orina como conjugados acuosolubles de ácido glucurónico y ácido sulfúrico, lo que obliga a liberarlos por medio de la hidrólisis, la cual puede ser de dos tipos; hidrólisis ácida é hidrólisis enzimática. (2)

Después de la hidrólisis, los esteroides libres son poco solubles en solución acuosa, así se agregamos -

un disolvente orgánico inmiscible pasarán estos por extracción a la capa orgánica. Repitiendo el proceso aseguraremos la recuperación máxima de esteroides. (2)

A menudo se extraen junto con los esteroides substancias que interfieren en las etapas finales de la técnica. La purificación final puede lograrse por extracción sucesiva con otros solventes, así como también haciendo uso de la cromatografía en columna.

Para la estimación cuantitativa se utilizan distintos métodos que pueden clasificarse en tres categorías; procedimientos colorimétricos, fluorimétricos y cromatográficos. (3) (1) Los nuevos descubrimientos han dado lugar a la introducción de técnicas más especializadas como son la cromatografía de gases con el uso de columnas capilares, programadores de temperatura, dispositivos automáticos, detectores de captura electrónica, etc. (3)

Los métodos actuales que más prometen al analista clínico por su gran eficiencia son; los de evaluación de

compuestos marcados mediante isótopos radioactivos y los de radioinmunoensayo. (3)

Tomando en cuenta que la cromatografía en columna (simple) puede ser una técnica accesible a cualquier laboratorio, consideramos conveniente aplicar este método para cuantificar pregnandiol urinario como primer paso en el estudio de la determinación de hormonas esteroides.

En el presente trabajo se pretendió demostrar la posibilidad de utilizar esta técnica a partir de un estándar puro de pregnandiol.

MATERIALES Y METODOS

Aparatos;

Espectrofotómetro. (Beckman. Modelo DB-GT).

Espectrofotómetro. (Coleman).

Rotavapor. (Buchler Instruments, Fort Lee, N.J. U.S.A.).

Plancha Eléctrica. (Corning PC-35).

Secadora de Pelo. (Conair Pro Style).

Aparato para medir puntos de fusión. (Fisher-Johns).

Balanza Analítica. (Mettler H30).

Material;

Pipetas graduadas de 5 Ml. (diam. de 5 mm.). (IVA). (Columna cromatográfica).

Refrigerante de dedo.

Vidrio de reloj.

Matraces de bola de 1 lt. y de 500 m. (Corning 24-40).

Estuche Corning 24-40.

Tubos de ensayo 16 X 150

Refrigerante recto. (IVA)

Vasos de precipitado de 50, 250 y 400 ml. PYREX)

Matraz de aforación de 100 ml. (PYREX)

Probetas de 10 y 100 ml. (PYREX)

Agitadores.

Reactivos;

Benceno.- Grado reactivo. Productos Químicos Mty.

Acetato de etilo.- Grado reactivo. Productos Químicos
Monterrey.

Acetato de etilo al 5% en benceno.

Acido sulfúrico.- Grado reactivo. Productos Químicos
Monterrey.

Sulfato de sodio anhidro.

Pregnandiol purificado. 5β -Pregnan- $3\alpha,20\alpha$ -diol. SIGMA.
Chemical Company, St. Louis, U.S.A.

Gel de sílice. (Merck, 70-230 mallas).

PURIFICACION DE REACTIVOS

Benceno.- C_6H_6 , P.M. 78.11. Punto de ebullición 80.1°C. (9) Cuatro litros de benceno se agitan con 50 ml. de ácido sulfúrico concentrado por litro, dejarlo en repo so y despues descartar la capa de ácido, agregar 100 ml. por litro de bicarbonato de sodio al 10%, agitar y descar tar el bicarbonato. El benceno se lava 2 veces con 100 ml de agua destilada por litro. Se seca sobre sulfato de so- dio anhidro granular, se filtra y destila dos veces en el rotavapor.

Acetato de etilo.- $CH_3CO_2C_2H_5$. P.M. 88.1. Punto de ebullición 77.1°C. (9)
Se destila dos veces descartando el 5% de la parte inicial y final del destilado. Se seca sobre sulfato de sodio an- hidro granular y se filtra.

Anhidrido acético.- $(CH_3CO)_2O$, P.M. 102.09. Punto de ebullición 139.6°C. (9)
Se refluja sobre trióxido de cromo (1g/lt.) durante 4 ho- ras y se destila 2 veces. Se guarda en frasco ámbar.

TECNICA (10)

Preparación del Diacetato de Pregnandiol

Reacción de acetilación.- Se pesan 15 mgr. de pregnandiol y se agregan 13 ml. de anhídrido acético, mas 1 o 2 gotas de piridina, se disuelve el esteroide y se coloca en un sistema de reflujo calentando a baño de agua - por 12 horas, manteniendo la temperatura a 100°C. Terminada la reacción se evapora a sequedad.

Purificación del Diacetato de Pregnandiol.- Se lava el extracto seco del tubo de acetilación con etanol - hasta eliminar el olor a piridina, se evapora a sequedad se disuelve en 1 ml. de benceno, y se pasa a una columna cromatográfica.

Preparación de la columna cromatográfica.- Se toma una pipeta (5 mm. de diam.) limpia y seca y se introduce en ella un pequeño trozo de algodón y se coloca en la parte inferior de la columna sin oprimir demasiado. Se pesa 1 g. de sílica gel y se va agregando poco a poco

con cuidado a obtener capas uniformes en la columna. El extracto disuelto en benceno se coloca en la columna cromatográfica, lavando el tubo con mas solvente hasta completar 5 ml.

El eluente de esta y la fase siguiente (2 ml. de acetato de etilo al 5% en benceno) son descartados. La tercera fracción consiste en agregar 5 ml. de acetato de etilo al 5% en benceno. Esta elución se separa para cuantificar el diacetato de pregnandiol. El solvente de esta fracción es evaporada a sequedad.

Cuantificación.- Al extracto seco de la cromatografía se e agrega 4 ml. del reactivo de ácido sulfúrico (100 mgr. de Na_2SO_4 + 100 ml. de H_2SO_4 conc.) y se pone en baño de agua por 4 min., al cabo de los cuales se enfrían los tubos en agua corriente. El color resultante es muy estable. Se transfiere a celdillas PYREX y se lee en el espectrofotómetro contra un blanco de reactivos a la longitud de onda adecuada en contrada en el espectro de absorción.

OBTENCION DEL ESPECTRO DE ABSORCION
Y CURVAS DE CALIBRACION

Se prepara un estandar primario de una concentración de 20 mg/100 ml. Los mgr. de diacetato se disuelven en etanol y se completan los 100 ml. utilizando matraz de aforación.

Del estandar primario se toman alícuotas llevándolas a sequedad para obtener diferentes cantidades. (Ver tabla 1).

Los mgr. de pregnandiol se obtienen por medio de un factor de conversión (0.8) que se utiliza para convertir valores de diacetato de pregnandiol en cifras de pregnandiol.

Para obtener el espectro de absorción se utiliza el estandar mas conveniente.

Tabla #1

estandares	ml. del estandar primario	mgr. de diacetato de pregnandiol	Equivalentes en pregnandiol
estandar 1	.25	.05	.04
estandar 2	.5	.1	.08
estandar 3	5	1	.8
estandar 4	10	2	1.6
estandar 5	25	5	4
estandar 6	50	10	8

RESULTADOS:

- A.- El rendimiento de la reacción de acetilación fué de 99.3%.
- B.- Punto de fusión del producto de reacción.- 172°C.
- C.- Longitud de onda máxima obtenida en el espectro de absorción.- $\lambda_{\text{máx}} = 430$.
(Ver fig. 1)
- D.- Curvas de calibración.- La obtenida en el espectrofotómetro Beckman. (Ver fig. 2) y la obtenida en el espectrofotómetro Coleman. (Ver fig. 3).

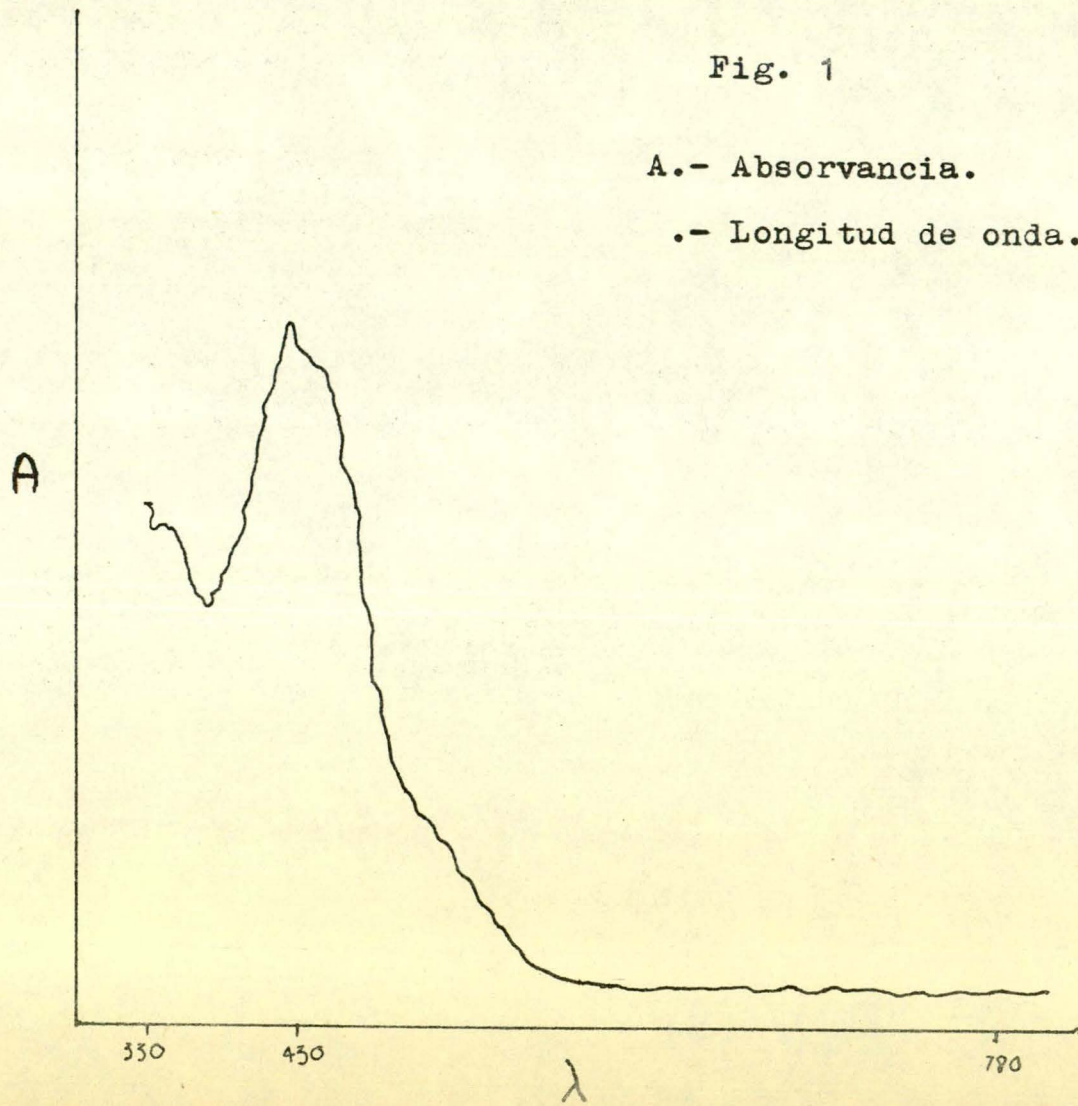


Fig. 1

A.- Absorvancia.

.- Longitud de onda.

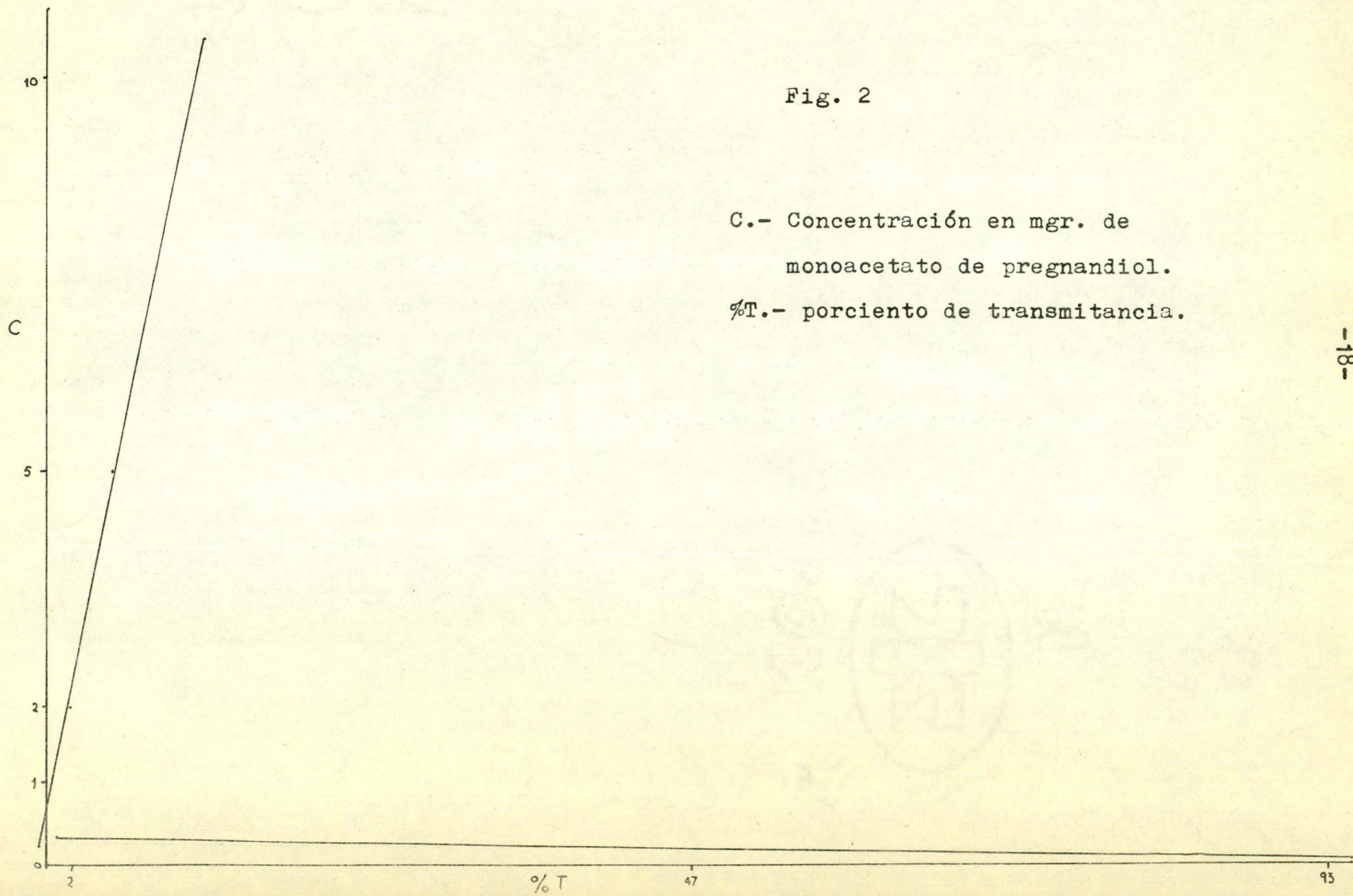


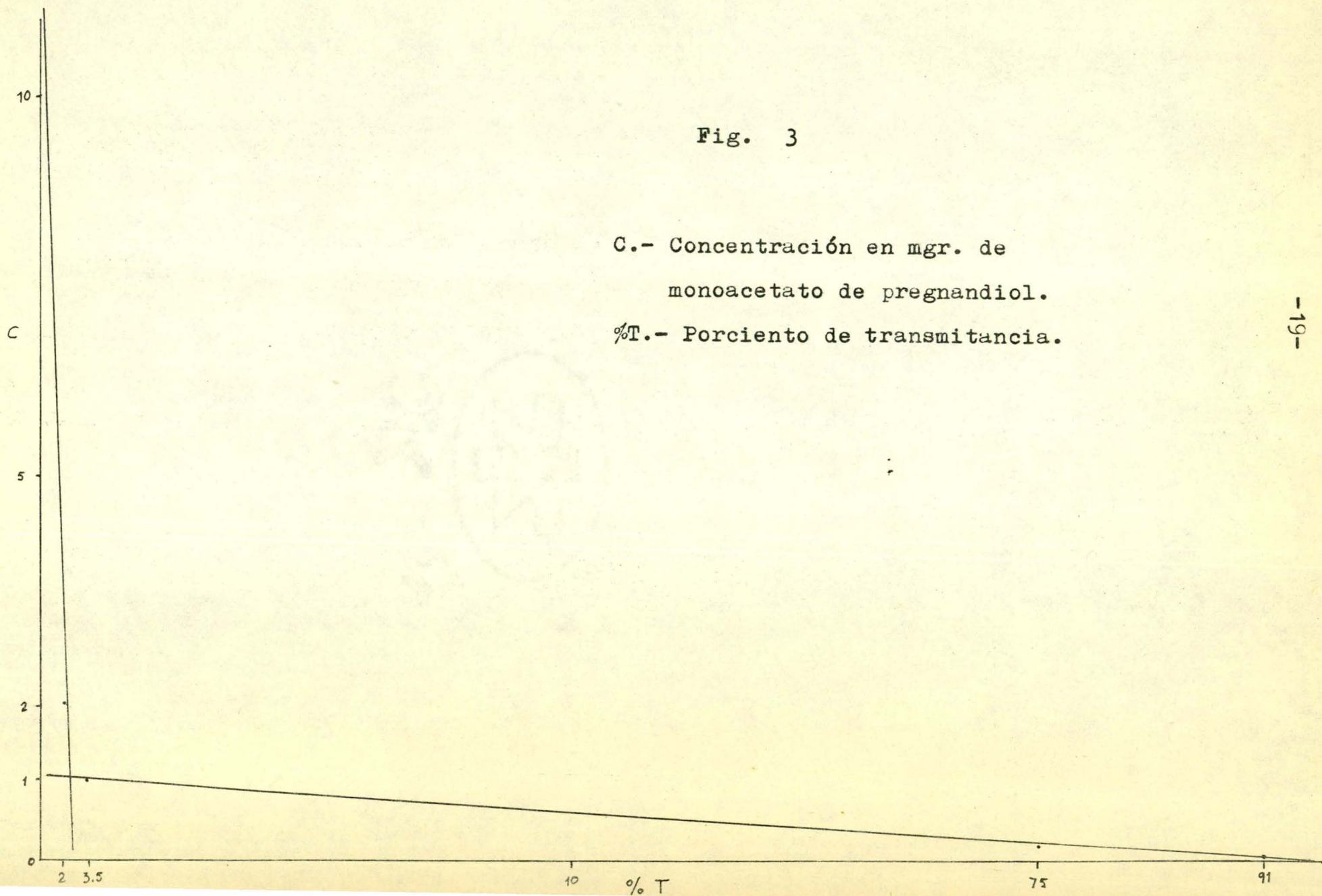
Fig. 2

C.- Concentración en mgr. de
monoacetato de pregnandiol.

%T.- por ciento de transmitancia.

Fig. 3

C.- Concentración en mgr. de
monoacetato de pregnandiol.
%T.- Por ciento de transmitancia.



DISCUSION Y CONCLUSIONES

Una reacción es cuantitativa cuando da un solo producto -no reacciones laterales- y en un 100% de rendimiento, incluyendo el proceso de separación y purificación. Un riesgo en la separación por cromatografía es no lograr purificar totalmente el material, es decir que parte de - éste quede adherido sobre las partículas de adsorbente y no sea arrastrado por el eluente.

Para muestras condiciones de trabajo el porcentaje de producto separado por cromatografía en columna fué lo suficientemente alto para considerar esta una técnica ade--cuada de trabajo.

En relación a lo reportado por Goldzieher (10) no se obtuvo el diacetato el cual funde a 182°C sino por el contrario el producto obtenido fundió a 172°C. El punto de fusión para el monoacetato (C-20) es de 174° (7). En este caso se recomienda tratar las condiciones de la reacción variando tanto las concentraciones de reactivos como el tiempo de reacción.

La longitud de onda de máxima absorción para el producto obtenido es la misma tanto para el diacetato de --- pregnandiol como para el pregnandiol (4) (10). El punto de fusión del pregnandiol es de 243°C; su presencia se observaría en un rango amplio de fusión a una temperatura mayor a la reportada.

Consideramos conveniente obtener una gráfica de absorvancia contra concentración para distintas concentra-- ciones obtenidas de un estandar primario del producto obtenido, en esta reacción.

De la gráfica puede observarse un comportamiento lineal a bajas concentraciones lo cual está en concordancia con lo reportado por Goldzieher (10).

Consideramos que esta técnica es adecuada y que para las determinaciones deben tomarse pequeñas alícuotas de -- las muestras a analizar.

Es importante mencionar que la razón de obtener el derivado acetilado del pregnandiol es facilitar la separación cromatográfica de los diferentes derivados del pregnano que se encuentran en la orina.

RESUMEN

Se obtuvo el monoacetato de pregnandiol a partir de pregnandiol, el cual fué purificado y separado por cromatografía en columna (99.3%); se trató con Na_2SO_4 y H_2SO_4 y se obtuvo una gráfica de absorvancia contra concentraciones, observándose un comportamiento lineal a bajas concentraciones (cantidades menores de 1 mgr.).

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Lynch M. J., Raphael S. S., Mellor L. D., Spare P. D.
Inwood M. J. H., Métodos de Laboratorio, 2a. edición,
Editorial Interamericana, México, (1972).
- 2.- Tietz N. W., Química Clínica Moderna, Editorial Inter
americana, México, (1972).
- 3.- Castellanos J. M., Avances en Análisis de Esteroides,
Editorial Científico Médica, Barcelona, (1973).
- 4.- Klyne W., Química de los Esteroides, Compañía Edito-
rial Continental, S. A., España, (1970).
- 5.- Oser B. L., Hawk's Physiological Chemistry, 14a. edi-
ción, McGraw Hill Book Company, New York, (1965).
- 6.- Guyton A. C., Tratado de Fisiología Médica, 4a. edi-
ción, Editorial Interamericana, México, (1971).
- 7.- Dictionary of Organic Compounds, 4a. edición, Etre &
Spottiswoode, Publishers, LTD E. & F. N. Spon LTD,
Londres, 5, 2775, (1965).
- 8.- Karlson P., Manual de Bioquímica, 3a. edición, Edito-
rial Marín S. A., Barcelona, (1969).

9.- Handbook of Chemistry and Physics, 54a. edición, CRC Press, (1974).

10.- Goldzieher J. W. y Nakamura Y., Acta Endocrinológica, 41, 373-375, (1962).

800250