

## Tesis de Posgrado

# Estudio de la reacción de Zimmermann para la determinación de los 17 ceto-esteroides en sus diversas fases, comparándola al mismo tiempo con otros métodos

Schargrodsky, Juana

1948

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Química de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Schargrodsky, Juana. (1948). Estudio de la reacción de Zimmermann para la determinación de los 17 ceto-esteroides en sus diversas fases, comparándola al mismo tiempo con otros métodos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_0559\\_Schargrodsky.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0559_Schargrodsky.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Schargrodsky, Juana. "Estudio de la reacción de Zimmermann para la determinación de los 17 ceto-esteroides en sus diversas fases, comparándola al mismo tiempo con otros métodos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1948.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_0559\\_Schargrodsky.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0559_Schargrodsky.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES

ESTUDIO DE LA REACCION DE ZIMMERMANN PARA LA DETERMINACION DE LOS  
17 CETO-ESTEROIDES EN SUS DIVERSAS FASES, COMPARANDOLA AL MISMO  
TIEMPO CON OTROS METODOS

*Tesis* 559

Trabajo de Tesis presentado por

**Juana Schargrofsky**

para optar al título de:

**Doctor en Química**

1 9 4 8

**A MI MADRE**

**PADRINO DE TESIS:**

**DR. JORGE R. MENDIVE**

**Agradezco al Dr. Jorge R. Mendive la  
dirección de este trabajo, como así  
también la amplia colaboración  
prestada.**

El aislamiento de la folliculina de la orina de mujeres embarazadas, por Doisy, Weller y Thayan (23) condujo inmediatamente a los investigadores a la búsqueda de sustancias de acción androgénica.

El término andrógeno comprende sustancias que posean una acción masculinizantes y las primeras de esta naturaleza aisladas y químicamente caracterizadas por Eutenandt y sus colaboradores en 1931-32 y 34 (4-5-6-) han sido androsterona y dehidroandrosterona separadas de orina de hombres y mujeres normales y castradas.

A pesar de algunos grados de correlación de la excreción androgénica con el sexo y la edad es imposible en la práctica de determinar por el contenido de andrógeno en la orina el sexo o la edad del individuo humano. Aún después de la castración parece que la excreción de andrógeno ocurre lo mismo y puede ser dentro de los límites normales (Callow) (14).

Comunicaron Womack y Koch (39-40) que la orina de mujer normal contenía cantidades de material androgénico, el cual medido en capones era del mismo orden que el obtenido de la orina de hombre normal; pero con los métodos perfeccionados de extracción que han sido usados durante los últimos años es reconocido que la cantidad de promedio de andrógeno urinario es un poco menos para la mujer que para el hombre.

Se sabe que dos son las fuentes de origen de las hormonas masculinas: el testículo y la corteza suprarrenal. En el primero se produce la testosterona, la única hormona con poder androgénico que se ha aislado de esa fuente. La testosterona no se encuentra en la orina como tal, sino en forma de androsterona y transdehidro-androsterona, que derivan de ella por un proceso de degradación

que experimentan en el organismo.

En cuanto a la corteza suprarrenal, se ha comprobado que en ella se originan un número grande de hormonas y derivados; en efecto, en la hiperfunción córtico-suprarrenal se observa una producción suplementaria de hormonas sexuales, masculinas o femeninas según los casos, que altera el equilibrio sexual normal (Crus-Coke) (20); esta comprobación es corroborada por el hecho de que en la orina de animales castrados se encuentran hormonas masculinas, lo que indica evidentemente un origen extra gonadal. Parece muy probable que en el organismo, estas hormonas de origen extra gonadal son metabolizadas hacia formas inactivas o menos activas, que serían excretadas por la orina.

Hirschman (38) demostró que en la orina de mujeres ovariectomizadas se encuentra tanto la alfa como beta 17 esto-esteroides, lo que indicaría también que las suprarrenales dan origen a ambas. Numerosos hechos clínicos revelan que las suprarrenales constituyen en el ser humano una fuente importantísima de andrógenos.

Así sabemos que la hiperplasia o neoplasia de la glándula suprarrenal, como es bien conocido, causa cambios en los atributos sexuales accesorios del paciente.

Los cambios varían en los sexos. En mujeres en las cuales éste descende en la glándula suprarrenal es más frecuente que en los hombres, produce comúnmente virilismo. En el hombre, al contrario los disturbios de la cápsula suprarrenal produce feminismo.

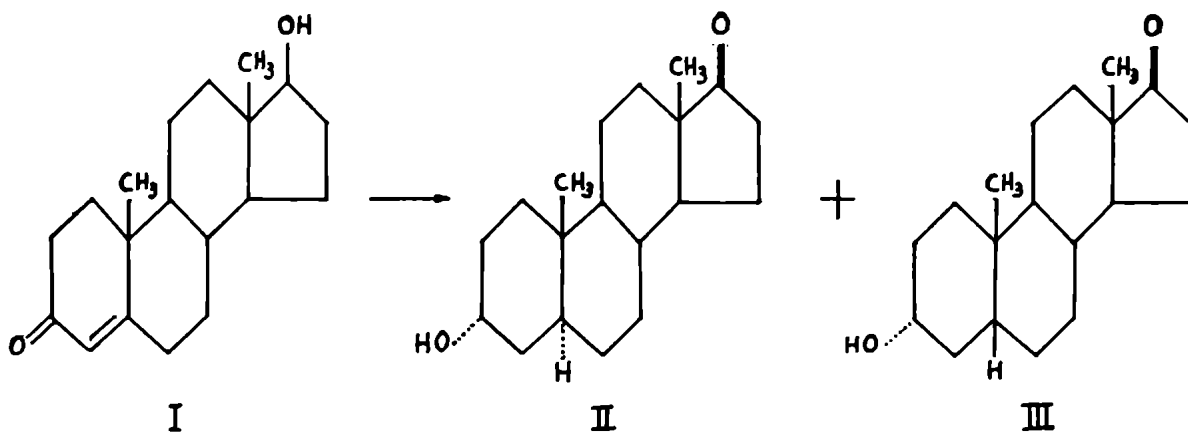
Hipóticamente los cambios producidos han sido atri-

buidos a la proporción incorrecta de las hormonas masculinas y femeninas. Se nota un aumento de las hormonas masculinas en las orinas de las mujeres que sufren de virilismo. En caso de feminismo se nota un aumento de la hormona estrógena.

Por otra parte la extracción de androsterona y del compuesto estereo-isómero eticolan-3 ( $\alpha$ )-ol-17-ona de la orina de un hombre que recibe propionato de testosterona es particularmente interesante desde el punto de vista de determinar la substancia origen del esteroide compuesto excretado en orina y si su formación tiene origen en las gónadas o las glándulas suprarrenales.

Hartman y Locher (33) demostraron que el pregnandiol y allepregnandiol, las cuales han sido extraídas de la orina de mujer preñada era derivada de la progesterona por reducción.

Un proceso análogo puede producirse por degradación de la testosterona (I) a androsterona (II) y eticolan-3- $\alpha$ ol-17-ona (III), involucrando la reducción del grupo ceto en 3 para dar 3- ( $\alpha$ )-hidrox compuesto y de la doble ligadura entre 4 y 5 para dar las dos configuraciones posibles en la posición 5 con la oxidación del grupo OH en 17.





Butler y Marrian (10) (1938) establecieron que el etio-  
colan- 3 $\alpha$ -ol-17 una el cual fué aislado de la orina de una mujer  
con hiperplasia de las glándulas suprarrenales derivada de la par-  
cial oxidación del pregnano- 3 $\alpha$ -17-20 trial el cual ha sido extraí-  
do a partir de la misma orina. El hallazgo del compuesto anterior  
como un producto de degradación de la testosterona muestra que otro  
mecanismo es posible.

Los hechos mencionados apoyan el concepto que hombres  
y mujeres eliminan normalmente idénticos andrógenos y en proporcio-  
nes semejantes. Sin embargo trabajos recientes de Callow (13-14-16-  
17) muestran que la orina normal de la mujer dá de 1 a 3 mgr/lit de  
androsterona y 1 a 3 mgr/lit de etiocolan 3 $\alpha$ -ol-17-ona a diferen-  
cia de los 1 a 6 mgr/lit y 1 a 4 mgr/lit respectivamente obtenida de  
orina normal de hombre con el mismo método.

Con la digitonina ha sido posible la determinación de  
dos fracciones de ándrogenos: los  $\alpha$  estosteroides y los  $\beta$  estoste-  
roides. Entre los primeros se encuentra la androsterona y la 3 $\alpha$   
hidroxietiocolanona 17, cada una de las cuales corresponde al 40-  
45% del total de los andrógenos: en tanto que la fracción de los  $\beta$   
este-steroides alcanza solamente al 2-15 % y está compuesta por la  
dehidro-iso-androsterona y la iso-androsterona y la iso-androsterona.

Es interesante hacer notar que estas proporciones se  
invierten en los casos de cáncer córtico-suprarrenal: la fracción  
de los  $\beta$  este esteroides comprende el 40 % de los andrógenos, hecho  
que se ha podido observar también en un caso de virilismo. La es-  
trea, que es también un 17 ceto- esteroide queda excluida de la

determinación porque, siendo un fenol débil es eliminada por el lavado con álcali en el proceso de la extracción.

Desde el punto de vista químico los andrógenos son derivados del androstano.

La androsterona representada por la fórmula  $C_{19}H_{30}O_2$  es un compuesto saturado, conteniendo un alcohol secundario y un grupo cetónico y químicamente es muy estable.

Ruzitska (52-53-54) y sus colaboradores han mostrado que la oxidación del epicolesterol da androsterona, estableciendo así el parentesco entre las hormonas sexuales y el colesterol. La dehidro androsterona que es tres veces menos activa que la androsterona ha sido sintetizada del colesterol por Ruzitska y Wettstein (53) quienes mostraron también que ésta puede ser convertida en 4-5 androsteno-17-ol-3-ona, un compuesto idéntico de la testosterona natural, diez veces más activa que la dehidroandrosterona y cuya síntesis fué hecha por Buthenandt en 1935.

Los andrógenos que se eliminan por la orina son productos del metabolismo de las hormonas y los de mayor significado biológico y químico son los esteroides que tienen un grupo cetónico sobre el átomo de carbono 17. A este grupo Callow y sus colaboradores designaron con el nombre de 17-cetosteroides, muy en uso actualmente.

Los 17-cetosteroides encontrados en la orina humana se dividen en dos grupos: fenólicos y no fenólicos.

Los que se consideran provenientes del metabolismo de los andrógenos se encuentran en la fracción no fenólica e neutra de los extractos urinarios.

Por ello, para la separación de los extractos urinarios para la dosificación de los andrógenos es necesario obtener la fracción neutra libre de las fracciones ácida y fenólica que se eliminan por lavados con álcali.

### METODO PARA LA DOSIFICACION DE ANDROGENOS

Con el objeto de conseguir un índice de la actividad endócrina de un sujeto, las investigaciones se han dirigido hacia la determinación cuantitativa de las sustancias hormonales de actividad androgénica en la orina. Con este fin, se han puesto en práctica dos clases de métodos: Biológicos y químicos.

#### Métodos biológicos:

Estos métodos han sido los más usados; mencionaremos solo algunos.

En uno de ellos se ha medido el poder de actividad de la androsterona por la acción excitante que esta hormona tiene en el crecimiento de la cresta de los capones Leghorn, inyectando el extracto que se desea dosificar ya sea intra-muscular o bien directamente en la base de la cresta (Fussganger) y valorizando su actividad por el crecimiento obtenido, apreciación que se hace en forma directa, objetiva o mediante la planimetría en silueta fotográfica. Este método ha experimentado diversas modificaciones con el objeto de evitar errores; no obstante, es el mejor aceptado por su sensibilidad.

Otro método, más difundido, para la determinación de la actividad androgénica, se basa en las modificaciones que experimentan los órganos sexuales secundarios de la lechuza o rata castrada al inyectar en ellas hormonas masculinas. Los efectos se pueden apreciar en diversos órganos o funciones: modificaciones ponderables de la próstata y de las vesículas seminales, en el conducto deferente, glándula de Cowper, etc; cambio de coloración en el pico del gorrion inglés, reaparición de los movimientos de los espermatozoides en el epidídimo después de la resección del testículo.

#### Métodos químicos:

1) Zimmermann (61) utilizó un método colorimétrico aplicable tanto a los compuestos puros, como a los extractos urinarios. Este método está basado en el hecho de que sustancias que contienen el grupo  $\text{CH}_2\text{CO}$  en presencia de álcalis y de meta-dinitro benceno, dan una coloración roja característica, que es producida por los 17-ceto-esteroides y que puede ser usada para la determinación cuantitativa de las sustancias mencionadas. Esta valorización de los 17-ceto esteroides se basa en tres consideraciones: a) el método de obtención de los extractos, elimina los compuestos neutros no volátiles de alto peso molecular; b) El espectro de absorción de estas sustancias con metadinitro benceno y álcali es muy semejante al que dan los 17 ceto-esteroides puros y c) el fraccionamiento químico del extracto hace que la actividad androgénica se concentre en la fracción estérica.

Tanto para la reacción de Zimmermann como para otros métodos ha demostrado Adler (1) que como los andrógenos y los estróge-

nos, se encuentran en forma de compuestos hidrosolubles combinados, hacen necesario, antes de su extracción con disolventes grasos, que sean liberados mediante una hidrólisis fuerte, para lo cual la orina debe ser llevada a PH 1 que se obtiene agregando  $\text{SO}_4\text{H}_2$  o HCl concentrado. Los autores han llegado a la conclusión que 40 c.c. de HCl concentrado por litro de orina es suficiente para obtener el PH adecuado; se procede enseguida a hervir la orina acidificada durante un cuarto de hora para hacer la hidrólisis. Otros autores indican que el mejor resultado se obtiene hirviendo un litro de orina con 100 c.c. de HCl durante una hora. También se ha usado el autoclave (con 20 libras de presión a  $125^\circ$  y 40 cc. de HCl por litro, con tiempos que varían de media a cuatro horas) dando muy buenos resultados en la liberación total de estrógenos, mientras que para los andrógenos los valores no son mayores que los obtenidos con la ebullición.

Efectuada la hidrólisis, se somete la orina a la extracción para lo cual se han utilizado diversas sustancias extractoras, de valor muy discutido, como el tetra cloruro de carbono, benceno, éter sulfúrico, eter de petróleo, eter etílico, etc.

El extracto obtenido, usando cualquiera de los disolventes mencionados, es sometido a un fraccionamiento con el objeto de separar los andrógenos que se encuentran en la fracción neutra; el contenido androgénico se separa del disolvente por destilación y el residuo se extrae con alcohol, que se ha usado en concentraciones diversas según los autores: absoluto, de  $95^\circ$  y aún de  $60^\circ$  como lo hace Oesting (50). En esta solución alcohólica se practica la reac-

ción.

El fundamento es siempre el mismo: hidrólisis, extracción, fraccionamiento, separación de los andrógenos con el disolvente, extracción del residuo en alcohol y, finalmente la reacción de Zimmermann.

2) Método Standard de rutina que es una hidrólisis y extracción separada (Modificación del método de Callew 1936) (11).

3) Método de hidrólisis y extracción combinada (Modificación del método de Dingemans, Borchardt y Laqueur 1937) (21). Se realiza la hidrólisis con HCl y la extracción con  $Cl_4C$ .

4) El Dr. Mac Cullag y T. R. Mac Lin, usaron como agente de extracción el éter dibutílico. Expresan que el método es promisor y que el éter dibutílico comercial debe ser purificado.

5) Strickler, E. Walton, D.A. Wilson y M. Dienes utilizan como agente extractor el éter butílico en un embudo de decantación.

6) Charles Neterval (49) en 1940 propone un pequeño extractor de gran eficacia que requiere una cantidad menor de orina. El aparato usado es esencialmente un extractor Soxhlet modificado ad-hoc y es tan eficaz que basta una extracción de 2,5 a 3 horas para que sea completa.

7) William Consollasio y John Talbot (19) (1940) dan a conocer un método que según ellos, es más sencillo y más exacto; hacen la hidrólisis con HCl y extracción con  $Cl_4C$ . Estos investigadores tratan 500 c.c. de orina con 50 c.c. de HCl concentrado hacien-

de una hidrólisis de 20 minutos y enfriando luego la orina con una corriente de agua, que se distribuye mediante un dispositivo en espiral. Luego se adapta un matraz que contiene 100 c.c. de  $\text{Cl}_4\text{C}$  y se realiza la extracción por una hora, pudiéndose hacer 6-8 determinaciones diarias; es un procedimiento muy práctico.

8) Hershberg y J.K. Wolfe, (37) proponen un método rápido de hidrólisis y extracción simultánea de los esteroides urinarios con disolventes más pesados que el  $\text{H}_2\text{O}$  (Cloruro de metileno, cloroformo y tetracloruro de etileno).

9) Mencionaré también algunos autores (Bauman, Metzger y Sprinson) que, con el fin de determinar colorimétricamente la cantidad de 17 ceto-esteroides en la orina por la reacción del meta-dinitro benceno de Zimmermann en forma exacta, sugieren la conveniencia de purificar los andrógenos mediante el reactivo de Girard (Trimetil-acet-hidróxido-cloruro de anonio).

La reacción colorimétrica de Zimmermann ha sido extensamente aplicada a los extractos urinarios para la determinación cuantitativa de los 17 ceto-esteroides urinarios. Presenta la desventaja que otros 17 ceto-esteroides reaccionan con el reactivo de Zimmermann. Los cromógenos no cetónicos de los extractos urinarios neutros pueden ser descontados por el uso de una ecuación de corrección o por separación química directa con medida únicamente de los extractos cetónicos. Entre los ceto-esteroides neutros pueden estar presentes ciertas cetonas que dan colores atípicos; así el 3 ceto-esteroide dá un color amarillo y el 20 un color rojo claramente diferente del rosa típico del 17.

Compuestos teniendo espectros de absorción semejantes a los 3 ceto-esteroides aparecen frecuentemente en los extractos urinarios neutros no alcohólicos.

Son típicas particularmente en orinas preñadas en las cuales pueden estar presentes en cantidades excediendo a los 17 ceto-esteroides contribuyendo ordinariamente en el título del color.

Una reacción colorimétrica de mayor especificidad que la de Zimmermann tiene sus ventajas.

Se describirá una reacción publicada por Pinous en 1943 (51): La reacción del  $\text{Cl}_3\text{Sb}$  con una serie de compuestos de esteroides.

En condiciones apropiadas puede desarrollarse un color azul con ciertos 17 ceto-esteroides y no con otros de una serie de esteroides estónicos que se encuentran en extractos urinarios neutros.

Se prepara una solución altamente concentrada de  $\text{Cl}_3\text{Sb}$  (p.a.) en una mezcla de 9 partes de ácido acético glacial y una parte de anhídrido acético (p.a). Para determinaciones standard se usa 3,8 gr. de  $\text{Cl}_3\text{Sb}$  en 1 c.c. de mezcla ác-anh.

A una preparación de esteroide seco o extracto urinario en tubo de ensayo se le añade gota a gota desde una micro bureta 0,2 cc. de reactivo y la solución tapada es calentada en un baño de agua hirviendo durante 20 minutos. Después de la inmersión del tubo de ensayo en el baño de agua entre medio a un minuto el tubo es agitado para asegurar la completa solución de la preparación del esteroide. El tubo es guardado tapado para prevenir la entrada de la humedad. Después del calentamiento el tubo es enfriado y la solu-



ción diluida con ácido acético glacial; el diluyente es añadido lentamente con agitación. El color típico se desarrolla sobre la solución y alcanza un máximo después de un tiempo. Con la solución de 3,8 gr. de  $\text{Cl}_3\text{Sb}$  en l.e.c. de la mezcla ácido-anhidrido el máximo es alcanzado generalmente en 40 a 60 minutos a temperatura ordinaria.

Los esteroides puros ensayados en la reacción fueron divididos en tres grupos:

- a) Cetonas alcohólicas incluyendo testosterona, androsterona, iso-androsterona y etio-colanol  $3\alpha$ -17 ona, androstanol-  $3\beta$  (?) ona, dehidro-isoandrosterona, allepregnanolona y epipregnanolona.
- b) Cetonas no alcohólicas incluyendo androsterona 17, androstenona, pregnenona y colestenoona.
- c) Esteroides no cetónicos incluyendo androstanediol, pregnanediol y colestero. Además se ha empleado sulfato de androsterona, succinato de androsterona y succinato de de-hidro-iso-androsterona. Los resultados fueron expresados en términos de 100 micro gr de esteroide. Las medidas fueron hechas con el espectrofotómetro de Coleman.

En este trabajo se ha comprobado que:

- a) De los ceto-esteroides alcohólicos únicamente la androsterona y sus isómeros isoandrosterona y etio-colanol  $3\alpha$ -17 ona desarrollan un intenso color azul.
- b) Que la dehidroisoandrosterona desarrolla un débil color azu-

lado teniendo un considerable tinte amarillento.

- c) Para los otros esteroides alcohólicos probados se desarrolló un débil color amarillento.
- d) Para los esteroides no alcohólicos solamente la androsterona 17 desarrolla en igual intensidad un color azul típico de androsterona y sus isómeros.
- e) Para los otros esteroides no alcohólicos comparados desarrolla despreciable coloración.
- f) El androstanediol desarrolla un típico color azul pero en intensidad igual al desarrollado por cerca de 7% de androsterona.
- g) El pregnandiol desarrolla un color azul.
- h) El colesterol desarrolla un débil color que resulta despreciable.

Se han utilizado estudios comparativos entre los métodos biológicos y químicos con el objeto de dilucidar sus ventajas o sus deficiencias; así se ha comprobado que la etiocolanona es biológicamente inactiva, la dehidro-iso androsterona posee aproximadamente a un tercio a un séptimo de la actividad que la androsterona produce en la cresta del capón.

Por otro lado, la androsterona y la dehidro-iso androsterona no dan una coloración de igual intensidad por molécula con la reacción de Zimmermann, en tanto que se desconoce la coloración

dada por la etio-colazona.

Muy interesantes son los trabajos realizados bajo los auspicios del Comité de Hormonas del Consejo de Investigación Médica de E.E.U.U. En ellos se han correlacionado los métodos biológicos y químicos, empleando en los métodos biológicos los métodos del capón, usando los extractos urinarios en solución oleosa; llegaron a la conclusión que las diferencias existentes en la correlación de los resultados de las dosificaciones biológicas y colorimétricas, se deben a errores de las primeras, es decir, del método biológico.

En verdad, ninguna forma de dosificación es específica, pero no se puede dejar de reconocer que la dosificación química es más susceptible a la investigación y, por consiguiente, debe ser perfeccionada, además es menos errónea y más rápida.

La parte práctica de este trabajo consiste en ensayar el método de Zimmermann en sus diversas fases, estudiando su técnica al mismo tiempo que una fácil practicabilidad; para ello se ha investigado los factores que de uno u otro modo influyen sobre la marcha del método y el desarrollo de la reacción.

Al mismo tiempo se ha comparado este método con métodos descriptos por otros autores.

Las determinaciones se han hecho en orinas de niños, adultos, jóvenes y ancianos, en individuos de ambos sexos.

A) REACTIVOS

a) Meta-dinitro benceno: Se usó esta substancia pura y bien cristalizada. (P.F 89,5-90°)

Como en el comercio no se pudo conseguir este producto fué preparado de la siguiente forma:

A 128 c.c. = 230 grs de  $\text{HNO}_3$  concentrado (D: 1,84) contenido en un matras de medio litro se le añade poco a poco y agitando 110 c.c. = 154 grs de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (D: 1,40). Cuando la mezcla adquiere la temperatura ordinaria enfriándola con agua, se le va agregando poco a poco y agitando continuamente 90 c.c. = 78 grs (1 mol) de  $\text{C}_6\text{H}_6$ . La temperatura se regula de modo que no pase de 50 a 60° introduciendo eventualmente el matras en hielo y cesando durante unos minutos la adición de benceno si hubiera más de lo debido. A cada adición de benceno aparece en la mezcla una coloración parda intensa fugaz; terminada la adición se adapta al matras un refrigerante a reflujo y se calienta la mezcla a reflujo media hora sobre un baño de  $\text{H}_2\text{O}$  a 60°, se deja enfriar y se pasa a un embudo de decantación donde se separa la capa inferior (mezcla ácida) del nitro benceno (capa superior). Este se lava en el mismo embudo varias veces con  $\text{H}_2\text{O}$ , después con una solución diluida de  $\text{HONa}$  (Conviene eliminar completamente los ácidos probando con papel de tornasol porque sino el  $\text{HNO}_3$  ataca el producto en la destilación y se obtiene malos rendimientos) después otras vez con  $\text{H}_2\text{O}$  teniendo en cuenta que en todos estos lavados el nitro benceno forma la capa inferior más densa.

El nitro benceno bien lavado se pasa a un matras seco

provisto de un refrigerante de aire y se calienta sobre el baño maría con un poco de cloruro de calcio hasta que el líquido lechoso y turbio quede completamente límpido. Se decanta entonces a un matracito de destilación fraccionada provisto de un refrigerante de aire y se destila todo. Pasa primero una fracción formada por el benceno no atacado (El benceno destila a menos de 90-95°) y después destila el nitro benceno entre 206-207°: Rendimiento 100 a 105 grs.

A una mezcla de 14 c.c. = 26 grs de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  concentrado y 10 c.c. = 15 grs de  $\text{NO}_2\text{H}$  fumante se le agrega poco a poco y agitando 10 grs de nitro benceno; la mezcla colocada en un matracito abierto se calienta tres cuartos de hora sobre baño maría. Se deja enfriar un poco y se tira poco a poco y agitando sobre  $\text{H}_2\text{O}$  fría; el dinitro benceno se cuaja en una masa cristalina que se filtra y escurre a la trompa. Se lava con  $\text{H}_2\text{O}$ , se seca sobre plato poroso y se cristaliza en alcohol; Rendimiento 10-12 grs.

La purificación se obtiene de la manera siguiente: se disuelven 20 grs de meta-dinitro benceno por purificar en 750 c.c. de alcohol a 95°, se calienta a 40° y se agregan 100 c.c. de  $\text{HONa}$  2N; al cabo de 5 minutos se enfría la solución y se añaden 2.500 c.c. de  $\text{H}_2\text{O}$ .

El meta-dinitro benceno precipitado se recoge en un embudo de Büchner, se lava bastante con  $\text{H}_2\text{O}$ , se seca al vacío y se re-cristaliza dos veces sucesivas en 120 y 80 c.c. respectivamente, de alcohol absoluto; la substancia debe cristalizar bien en forma de agujas casi incoloras (punto de fusión 90,5-91°). El reactivo que se necesita para las determinaciones es una solución al 2% en alcohol absoluto, debiendo conservarse en frasco oscuro, al abrigo de

la luz, manteniendo su estabilidad por 15-20 días.

b) Hidróxido de potasio: Se usa una solución al 2,5N en alcohol absoluto, que se prepara como sigue: se pesan 4,5 grs. de HOK, se colocan en un mortero donde se lavan rápidamente dos o tres veces con alcohol absoluto, se pulveriza, se agregan 25 c.c. de alcohol absoluto y se disuelve por agitación mecánica. La solución espesa de potasa se filtra a través de lana de vidrio y se recibe el filtrado transparente en un tubo de ensayo; se procede enseguida a la titulación con  $\text{SO}_4\text{H}_2(\text{N})$  usando como indicador naranja de metilo (1 c.c. de HOK 2,5 N = 2,5 c.c. de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  N). La solución se diluye si es necesario con alcohol absoluto, hasta llevarla a los límites 2,48-2,52 N. Permanece sin alterarse de 2 a 4 días, si se conserva en un refrigerador y debe dejar de usarse tan pronto como aparezca en ella un leve color amarillento.

c) Alcohol absoluto: Se preparó a partir de alcohol a 95° hirviéndolo a reflujo con OCa durante tres horas y luego separando el alcohol absoluto por destilación.

d) Benceno: Se usó benceno cristalizable (P.E. 80-80,5° C.)

e) Éter metílico: Debe ser éter puro (D a 15°: 0,720) Redestilado libre de aldehidos, peróxidos).

f) Acido clorhídrico: concentrado

## B) RECOLECCION DE LAS MUESTRAS

Las determinaciones han sido hechas en orina de niños, adultos, jóvenes y ancianos, todos normales desde el punto de vista endócrino y sin antecedentes patológicos de importancia que pudieran alterar el equilibrio hormonal. Las determinaciones se hicieron en orinas de 24 horas, recogida en frascos de 1.500-2.000 c.c. de capacidad previamente lavados con una mezcla sulfo-crómica y H<sub>2</sub>O destilada.

En general se utilizó muestras de orina fresca. Es indispensable evitar la descomposición amoniacal, pues de lo contrario se encontrarán valores más bajos, por lo tanto es necesario usar sustancias que impidan la acción microbiana (Se empleó xilol).

## C) HIDROLISIS

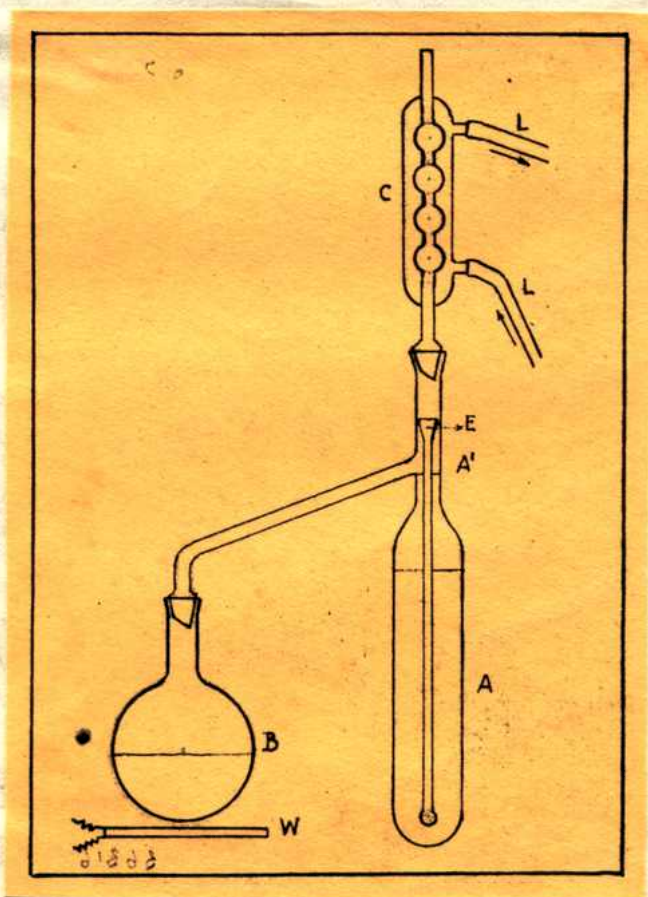
Para cada determinación se tomó 500 c.c. de orina que se colocó en un matras y se agregó HCl concentrado hasta obtener un pH 1. La cantidad necesaria de HCl es de 25 c.c. por litro de orina. Acidificada la orina a pH 1 se lleva a un matras provisto de un refrigerante a reflujo y se mantiene a ebullición durante 15 minutos; en ésta forma se produce la hidrólisis.

## D) EXTRACCION

Terminada la hidrólisis se enfría la orina y se translada al extractor continuo, en donde se somete a una extracción con benceno por 24 horas.



El extractor que se ha empleado ha sido construido por el Sr. Klobassa del curso de construcción de vidrio. Consta de un tubo cilíndrico (A) de más o menos 1.000 c.c. de capacidad y que se continúa por su otro extremo superior con otro tubo cilíndrico más estrecho (A') que está provisto de un tubo lateral ligeramente inclinado que comunica con el balón (B) de paredes resistentes (Pyrex); por su parte superior el tubo estrecho lleva adaptado un refrigerante de bolas (C) cuyo extremo inferior se encuentra sobre un pequeño embudo (E) que llega hasta el fondo del aparato, donde termina en una pequeña dilatación llena de orificios.



El funcionamiento de este aparato se hace del modo siguiente:

Se coloca la orina en el tubo inferior (A), se adapta

bien el refrigerante vertical (C) y se coloca 800 c.c. del líquido extractor en el balón (B) que es adaptado al tubo lateral con vidrio esmerilado de modo que no haya escape posible. El calentamiento se hace con una platina eléctrica (W) que se coloca bajo el balón.

Cuando el benceno entre en ebullición los vapores que desprende salen por el tubo lateral, ascienden por la parte estrecha del aparato y al ponerse en contacto con las paredes frías del refrigerante, se condensan y caen por el extremo de éste, siendo recogidas por el embudo en cuya parte tubular se acumula una larga columna de benceno que ejerce presión sobre la erina y sale por los poros de la ampolla en forma de finas burbujas que atravesando la capa de erina se deposita sobre una superficie en forma de otra capa que va en aumento (A") hasta llegar a la altura del tubo lateral, lo rebalsa y cae en el balón como un chorrito continuo, donde vuelven a evaporarse siguiendo el mismo ciclo anterior. Este extractor es bastante eficiente y se puede comprobar que una extracción de 12 horas es suficiente para extraer todo el material androgénico, lo que reduce al tiempo a la mitad, como queda demostrado en la tabla siguiente:

TABLA N° 1

N° de la muestra	Cantidad de andrógenos extraídos	
	en 24 horas	en 12 ha.
41	6,40 mgr	6,40 mgr
42	6,40 mgr	6,30 mgr
43	7,40 mgr	7,60 mgr
44	9,90 mgr	9,80 mgr
45	10,35 mgr	10,00 mgr
46	4,60 mgr	4,60 mgr
47	6,90 mgr	6,90 mgr
48	7,00 mgr	7,24 mgr
49	9,90 mgr	9,80 mgr
50	4,50 mgr	5,60 mgr

Se puede substituir el benceno por éter como líquido extractor y como tiene bajo punto de ebullición la marcha es más corta y además no se debe llevar a sequedad como se hace con el benceno, sino que se somete directamente al fraccionamiento.

Sigue a continuación una tabla que nos indica los valores haciendo la extracción paralelamente con éter y con benceno en la misma muestra de orina dividida en dos porciones de 500 c.c. cada una.

TABLA 2

Nº de la muestra	Cantidad de andrógenos extraídos en 24 horas	
	con éter	con benceno
26	12,40 mgr	12,20 mgr
27	7,40 mgr	7,40 mgr
28	6,40 mgr	6,40 mgr
29	7,30 mgr	7,00 mgr
30	11,40 mgr	11,40 mgr
31	6,50 mgr	6,40 mgr
32	5,80 mgr	6,00 mgr
33	4,90 mgr	4,90 mgr
34	8,30 mgr	8,40 mgr
35	8,50 mgr	8,50 mgr

### **E) FRACCIONAMIENTO**

Una vez concentrados los andrógenos urinarios en el balón se desconecta el aparato extractor y se somete a una destilación hasta sequedad si el líquido extractor es benceno; si es éter se omite la destilación, haciendo los lavados directamente en él. El residuo se disuelve en 100 c.c. de éter y se lleva a un embudo de decantación para ser sometido a diferentes lavados con el objeto de separar las tres fracciones: ácida, fenólica y neutra, en la última de las cuales se encuentran los compuestos androgénicos.

a) Primer lavado: El líquido etéreo se lava tres veces con solución de HONa al 10 %, usando 25 c.c. cada vez; con este tratamiento se eliminan las fracciones ácida y fenólica, incluida la estrona que es un fenol débil.

b) Segundo lavado: La solución etérea se lava cinco veces con H<sub>2</sub>O destilada, empleando 30 c.c. en cada lavado; se hacen con el fin de eliminar el HONa que la ha impregnado.

Se transfiere el líquido etéreo a un vaso de precipitados para ser tratado con 0,5 grs de carbón activado que se usa para absorber los cromógenos; se agita con una varilla y se deja reposar 10 minutos y, finalmente, se filtra y se recibe el líquido decolorado en un balón bien seco; el filtro se lava cinco veces con éter puro y el líquido resultante se destila al vacío hasta sequedad; el residuo completamente seco se capta con 10 c.c. de alcohol absoluto. Se obtiene una solución alcohólica de un color ligeramente pajizo, en las que se hacen las determinaciones colorimétricas.

Los extractos deben conservarse en un refrigerador, al abrigo de la luz, donde pueden permanecer por lo menos tres semanas sin alterarse.

#### F) DETERMINACION COLORIMETRICA

Hay que advertir que los tubos que se usan para la reacción deben limpiarse con mezcla sulfocrónica y  $H_2O$  destilada y secarse bien. En un tubo de ensayos, enrasado de 10 cc. se colocan sucesivamente con una pipeta de 1 c.c., 0,2 c.c. del extracto alcohólico cuyo contenido androgénico deseamos conocer; 0,2 cc de metadinitro benceno al 2% en alcohol absoluto y 0,2 cc de HOK 2,5 N, también en alcohol absoluto; dejando caer esta solución lentamente; en otro tubo se hace una reacción en blanco substituyendo el extracto hormonal por 0,2 cc de alcohol absoluto.

Antes de practicar la reacción, los tubos deben colocarse en un baño maría a la temperatura de  $25^\circ$ , protegidos de la luz por una pantalla. Al agregar los reactivos, se agita y se deja reposar durante una hora al cabo de la cual se enrasa a 10 cc con alcohol absoluto, se mezcla el contenido para obtener un color homogéneo y, por último se hace la lectura al fotocolorímetro. Se obtiene una solución de color rosado ligeramente violáceo, semejante a una solución muy diluida de  $MnO_4K$ , coloración cuya intensidad varía con el contenido androgénico.

Los milivoltios medidos en el fotocolorímetro, se comparan con los obtenidos en una escala colorimétrica y se traducen los resultados en miligramos de androsterona por 24 horas.

La cantidad encontrada en 0,2 cc del extracto alcohólico, equivale a 10 cc de orina, relación que facilita considerablemente los cálculos.

### CURVA DE CALIBRACION

Para confeccionar la curva de calibración se toma como punto de partida una solución madre que contenga 15 mgr de androsterona en 10 cc de alcohol absoluto.

Se toman 13 tubos de ensayo completamente limpios y secos y enrasados en 10 cc; con una pipeta de 0,2 cc se miden cantidades decrecientes de ésta solución (0,2-0,18....0,005) se llevan a 0,2 cc en cada una de ellos con alcohol absoluto y se practica la reacción en la forma indicada.

Número del tubo	Solución madre	Miligramos de androsterona	Por ciento de (Filtro transmisión 530)
1	0,2 cc	0,30 mgr	1,5
2	0,18 cc	0,27 "	7,5
3	0,16 cc	0,24 "	11,5
4	0,14 cc	0,21 "	15
5	0,12 cc	0,18 "	20
6	0,10 cc	0,15 "	27
7	0,08 cc	0,12 "	40
8	0,06 cc	0,09 "	46
9	0,04 cc	0,06 "	64
10	0,02 cc	0,03 "	75
11	0,01 cc	0,015 "	85
12	0,005 cc	0,0075 "	92
13	0,2 a. abs.	0,0 "	100

Dada la poca estabilidad de la coloración, se puede fijar la escala con sulfato de cebalite y permanganato de potasio, fijación que significa una mejor practicabilidad y una mayor economía en la reacción.



FIJACION DE SULFATO DE COBALTO

Se parte de una solución de sulfato de cobalto al 14.54 % peso. Las diluciones que es necesario hacer para obtener las mismas lecturas que da la escala de androsterona son las siguientes:

$SO_4Co$	más	agua bidestilada	por ciento de transmisión	(Filtro 530)
Soluc. madre				
9,5 cc.	+	0,5 cc	1,5	
7,5 cc.	+	2,5 cc	7,5	
6,36 cc	+	3,64cc	11,5	
5,45 cc	+	4,55cc	15	
5 cc	+	5 cc	20	
4,61 cc	+	5,39cc	27	
3,33 cc	+	6,67cc	40	
2,14 cc	+	7,86cc	46	
1,33 cc	+	8,67cc	64	
1,06 cc	+	8,94cc	75	
0,79 cc	+	9,21cc	85	
			82	

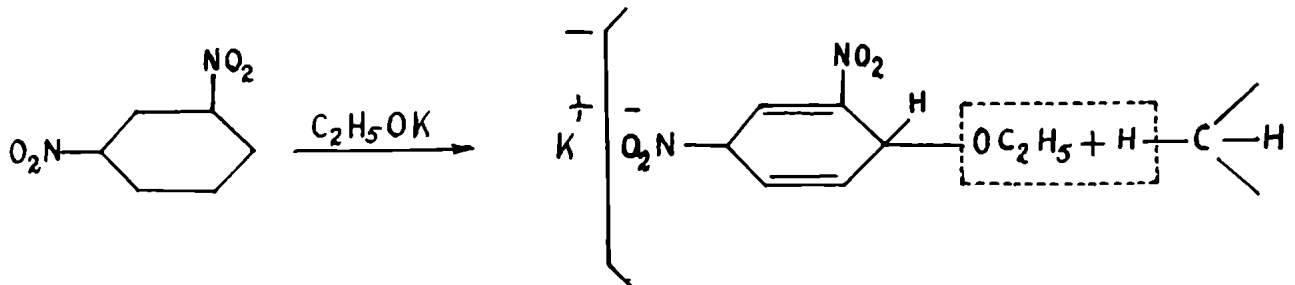
FIJACION CON PERNANGANATO DE POTASIO

Se parte de una solución de  $MnO_4K$  N/10 y se hacen las siguientes diluciones:

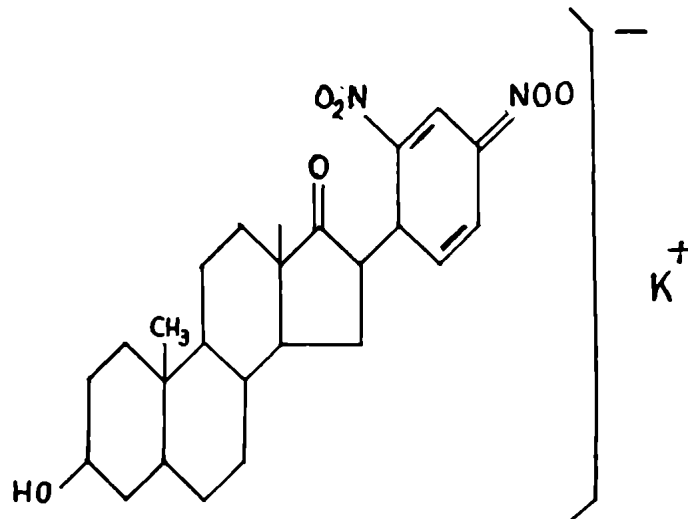
$MnO_4K$	más	agua bidestilada	por ciento de transmisión	(Filtro 530)
0,5 cc	+	5,5 cc	1,5	
0,5 cc	+	6,5 cc	7,5	
0,5 cc	+	7,5 cc	11,5	
0,25 cc	+	6,0 cc	15	
0,25 cc	+	7,5 cc	20	
0,25 cc	+	7,8 cc	27	
0,25 cc	+	8,0 cc	40	
0,25 cc	+	11,0 cc	46	
0,25 cc	+	16,5 cc	64	
0,10 cc	+	10,0 cc	75	
0,10 cc	+	14,0 cc	85	
0,10 cc	+	18,3 cc	92	

**MECANISMOS DE REACCION Y CONSTITUCION DE LAS**  
**SALES COLOREADAS FORMADAS**

Se trata primeramente de la conjugación del estilato de potasio con el cuerpo nitro y después la libertad del alcohol entre el primer producto de unión y el componente activo del esquisma:



La sal formada con androsterona tiene la siguiente fórmula: (5G)



Lo mismo vale para las demás hormonas de glándulas sexuales con grupos activos.



**FACTORES QUE INFLUYEN EN LA REACCION**

a) **SOLUCION DE HOK:**

En lo posible, la solución de HOK debe ser recién preparada, pues a lo sumo se conserva tres o cuatro días en el frigorífico; en cuanto presente el más leve color amarillento debe rechazarse porque al tergiversar el color propio de la reacción por un color rojo parduzco, las lecturas que proporciona son más altas como se comprueba en la tabla siguiente:

**TABLA 3**

<b>Muestra</b>	<b>Con HOK 2,5 N recién preparada</b>	<b>Con HOK envejecida</b>
<b>A</b>	<b>7,8 mgr</b>	<b>10,80 mgr</b>
<b>B</b>	<b>4,5 mgr</b>	<b>10,90 mgr</b>
<b>C</b>	<b>7,1 mgr</b>	<b>10,40 mgr</b>
<b>D</b>	<b>7,0 mgr</b>	<b>13,60 mgr</b>

Además el HOK debe ser medido con exactitud al hacer la reacción.

También influye la CONCENTRACION del HOK: se observa que a medida que aumenta la concentración se produce paralelamente una intensificación del color de la reacción; bastan pequeñas variaciones en la concentración del HOK para modificar la coloración y de aquí la necesidad de usar el HOK exactamente 2,5 N, cuyos límites deben oscilar entre 2,48 N y 2,52 N.

En la tabla que sigue se puede evidenciar la influencia de la concentración del HOK.

**TABLA 4**

Muestra	HOK	Mgts
A	0,5 N	0,60 mgr
"	N	1,20 mgr
"	1,5 N	2,30 mgr
"	2,00 N	4,50 mgr
"	2,5 N	7,80 mgr
"	3,0 N	9,90 mgr
"	3,5 N	10,40 mgr
"	4 N	12,80 mgr
"	0,4 cc 2,5 N	19,80 mgr

**b) TEMPERATURA:**

La temperatura óptima es de 25°. Con temperaturas superiores a 30° la reacción no se efectúa en forma satisfactoria y se obtiene un color café pardusco que debe desestimarse. Con temperaturas inferiores a 25° también se produce la reacción pero con una coloración menos intensa que a la temperatura óptima.

**TABLA 5**

**INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA**

Muestra	Grade	Mgts
V	0°	5,00 mgr
"	15°	6,00 mgr
"	25°	8,00 mgr

<b>Muestra</b>	<b>Grado</b>	<b>Mgts</b>
V	38°	Mala
"	57°	Mala
"	90°	Mala

**c) ACCION DE LA LUZ:**

La reacción se debe realizar al abrigo de la luz, porque la exposición da valores más bajos.

**TABLA 6**

**ACCION DE LA LUZ SOBRE EL DESARROLLO DE LA REACCION**

<b>Muestra</b>	<b>Luz</b>	<b>Oscuridad</b>
L	2,60 mgr	5,00 mgr
V	3,39 mgr	8,00 mgr
A	4,29 mgr	7,80 mgr
Q	1,80 mgr	4,00 mgr
S	3,80 mgr	6,60 mgr

**d) CONCENTRACION DEL META DINITRO BENCENO:**

Se ha procurado determinar la acción que tiene la concentración de este reactivo, para lo cual se ha ensayado a distintas concentraciones: 2%, 1% y 0,5% y hemos constatado que los valores de andrógenos son tanto más bajos cuanto mayor es la dilución del m - dinitro benceno.

TABLA 7

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DEL META DINITRO BENCENO

Muestra	m-dinitro benceno	Andr6genos por 24 h.
Muestra B	2%	12,40 mgr
	1%	8,30 mgr
	0,5%	5,40 mgr
Muestra A	2%	7,80 mgr
	1%	5,90 mgr
	0,5%	3,30 mgr
Muestra C	2%	9,80 mgr
	1%	6,60 mgr
	0,5%	4,90 mgr

El meta dinitro benceno debe ser purificado de la manera indicada anteriormente. El reactivo ordinario da un color rojo con el H<sub>2</sub>K, lo que se atribuye a la presencia de dinitro tiofeno que es detectable ya en la cantidad de 0,1 mgr.

e) ACCION DE LA HUMEDAD:

El material que se usa para hacer la reacci6n, debe estar completamente seco, si se quiere obtener buen resultado.

En lugar de diluir con alcohol absoluto se podría usar alcohol de 95%, siempre que la lectura se haga de inmediato, ya que pasados algunos momentos, la reacci6n cambia su color característico por otro rojo pardusco, que como ya hemos dicho debe desestimarse.

Damos a continuación una tabla que muestra los valores de androsterona obtenidos de una misma orina, pero con diluciones diferentes de alcohol absoluto y de alcohol de 95°, las lecturas fueron hechas en el momento mismo de la dilución.

TABLA 8

Muestra	Alcohol absoluto Miligramos por 24 horas	Alcohol de 95°
A	7,80 mgr	7,80 mgr
1	14,60 mgr	14,60 mgr
D	7,90 mgr	7,00 mgr
8	12,30 mgr	12,40 mgr
10	14,80 mgr	14,70 mgr
14	7,00 mgr	7,00 mgr
24	8,00 mgr	8,30 mgr
25	16,20 mgr	16,00 mgr

f) TIEMPO DE DESARROLLO DE LA REACCION:

El color de la reacción alcanza su máximo a la hora.  
El cuadro siguiente lo demuestra.

TABLA 9

Muestra	Tiempo en minutos	Mgr por 24 horas
D	10 m	1,0 mgr
"	20 m	4,3 mgr
"	30 m	4,9 mgr
"	40 m	5,3 mgr

Muestra	Tiempo en minutos	Mgr por 24 horas
D	50 m	6,9 mgr
"	60 m	7,0 mgr
"	70 m	7,0 mgr
"	80 m	7,0 mgr

A continuación exponemos algunas técnicas descritas por diversos investigadores; las cuales han sido comparadas con el método de Zimmermann.

**METODO QUE UTILIZA LA HIDROLISIS Y EXTRACCION COMBINADA**

(Modificación del método de Dingemans, Borchardt y Laqueur 1937)

La orina se coloca en un matraz adaptado a un refrigerante a reflujo y la cantidad de ácido clorhídrico que se agrega para llevar la orina a un pH 1 es de 100 cc de HCl concentrado por litro de orina. Se agrega  $Cl_4C$  en la proporción de 125 cc por litro de orina.

La mezcla se hierve a baño maría durante dos horas, al cabo de las cuales se separa el  $Cl_4C$  por destilación. Se repite dos veces más la extracción con el tetra cloruro de carbono.

El tetracloruro de carbono resultante de todas las extracciones se somete a destilación y el residuo de esta destilación se capta con benceno y se realiza luego el fraccionamiento.

**FRACCIONAMIENTO:**

La solución bencénica se lava dos veces con 25 cc por vez de bicarbonato de sodio, para eliminar el ácido; los feng

los se eliminan haciendo cinco lavados con 20 cc cada vez de  $\text{HONa 2N}$ .

La solución benecónica se evapora a sequedad y el residuo se disuelve en éter redestilado; el extracto etéreo se filtra y se evapora el filtrado a sequedad hasta que no quede material volátil.

El residuo se disuelve en alcohol absoluto, libre de aldehidos y en éste extracto alcoholico se practica la reacción de Zimmermann.

#### METODO DEL Dr. MAC CULLAG Y T. R. MAC LIN.

En este método se emplea como agente de extracción el éter dibutílico.

En primer lugar se procede a hidrolizar la orina ligándola a pH 1 con ácido sulfúrico y ebullición durante quince minutos.

Se realiza la extracción por agotamiento con dos porciones sucesivas de 200 cc de éter dibutílico por litro de orina.

Una vez realizada la extracción se realiza el fraccionamiento en la misma forma que en el método de la hidrólisis y extracción combinada y finalmente se realiza la reacción de Zimmermann.

#### METODO EN EL QUE SE REALIZA LA EXTRACCION EN UN ENVASE DE DECANTACION:

Strikler, E. Walton, D.A. Wilson y M. Dienes han descrito un método de extracción de andrógenos en el que se realiza la extracción en un embudo de decantación.

La orina es previamente hidrolizada durante 15 minutos con HCl al 10%, practicando enseguida la extracción con éter

butílico en un embudo de decantación.

Los extractos etéreos se someten a un lavado con HONa al 10% luego se lavan con agua; la solución etérea se evapora a sequedad y el residuo se extrae con éter, que se vuelve a evaporar; por último, el extracto seco se conserva hasta su determinación.

La separación de las fracciones estérica y no cetónica se realiza de acuerdo a la técnica de Talbot Bather y Mac Lachlan.(56).

Las orinas que contienen sustancias no cetónicas dan un color semejante al que se desarrolla con los 17 ceto-esteroideos, meta-dinitro benceno o HOK en solución alcohólica. Por lo tanto estas sustancias no cetónicas deben ser eliminadas para hacer los ensayos calorimétricos.

Una vez realizada la hidrólisis y extracción en la orina se evapora el benceno y el extracto es disuelto en 100 cc de éter etílico.

Las fracciones ácida y fenólica son separadas lavando la solución etérea cuatro veces con porciones de 20 cc por vez de HONa al 10% y tres veces con agua empleando 20 cc por vez. La solución etérea remanente se separa en tres porciones.

a) Una porción es evaporada hasta sequedad y el residuo es disuelto en una cantidad medida de alcohol absoluto. Esta solución alcohólica ( roja oscura ) es separada como la fracción cruda.

b) Otra porción de la solución etérea es decolorada con carbón (norita) en la proporción de 0,5 grs. por 100 cc de sg



lución etérea. La mezcla es agitada por tres minutos. La solución etérea decolorada es filtrada al vacío. El carbón es lavado una vez con 20 cc de éter fresco y la mezcla del extracto etéreo es evaporada a sequedad. El residuo incoloro es disuelto en una cantidad medida de alcohol absoluto. Es considerada como fracción tratada con carbón.

c) En la tercera porción la solución etérea es evaporada a sequedad y el residuo es dividido en las fracciones estéricas y no estéricas de la siguiente forma: El residuo seco es disuelto en 4 cc de alcohol etílico al 95% y después de la adición de 0,5 cc de ácido acético glacial la solución es refluída durante una hora a baño maría. Luego la solución es enfriada y se añade 40 cc de agua de hielo, 3 cc de solución acuosa de  $\text{HONa}$  al 10% y la mezcla es extraída cuatro veces con porciones de 40 cc de éter etílico por vez. El extracto etéreo luego de ser lavado tres veces con porciones de 20 cc de agua es evaporado a sequedad. El residuo es disuelto en una cantidad medida de alcohol absoluto. Esta solución alcohólica es considerada como la fracción no estérica.

Un cc de ácido sulfúrico concentrado diluido con agua de lavado del anterior extracto etéreo más 20 cc de éter etílico es añadido a la fase acuosa después de la extracción etérea de la fracción no estérica.

Después de estar dos horas a la temperatura ambiente la mezcla es extraída cuatro veces con porciones de 40 cc de éter. Luego para asegurar la completa recuperación de las cetonas se puede agregar 1 cc más de  $\text{SO}_2\text{H}_2$  después de la extracción etérea.

El extracto etéreo es luego bien lavado tres veces con porciones de 20 cc de agua que es evaporada a sequedad. El residuo es disuelto en una cantidad medida de alcohol absoluto. Esta solución (Incolora) es considerada la fracción cetónica.

Para hacer las lecturas colorimétricas se pasa 0,20 cc de solución de extracto urinario a un tubo colorimétrico y se agrega 0,20 cc de solución de m - dinitro benzene y 0,20 cc de HOK 2,5 N.

La mezcla y la solución testigo preparada en la misma forma que la anterior pero sin hormona se mantiene a temperatura constante en un baño a 25° más o menos 0,2° durante 30 minutos. Una vez extraída del baño la mezcla y la solución testigo se enrasa a 20 cc con alcohol etílico al 95% y se hace la lectura en el fotocolorímetro.

VALORES OBTENIDOS

La cantidad de andrógenos que se ha encontrado en los individuos normales, varía dentro de límites relativamente amplios.

El nivel que he encontrado en las determinaciones varía entre 5,7 y 18 miligramos por 24 horas en los hombres y entre 4 y 11 miligramos por 24 horas en las mujeres con un promedio de 13 miligramos y de 7,5 miligramos respectivamente por 24 horas.

He comprobado que los valores obtenidos son muy semejantes a los que han dado otros autores, como se puede ver en la siguiente tabla:

TABLA 10  
17 ceto esteroides en  
Miligramos de androsterona por 24 horas

	Hombres	Mujeres
CALLOW	10,5 mg.	6,75 mg.
ALBRIGHT	12,0 "	9,5 "
SCOTT	14,3 "	10,1 "
KOCH	13,8 "	9,0 "
FRASER	18,8 "	5,9 "
CHOU WANG	13,8 "	9,0 "
<u>NUESTROS VALORES</u>	<u>13,9 "</u>	<u>7,5 "</u>

La desificación de los andrógenos urinarios revela que las cantidades son bajas hasta el momento de la pubertad, en que aumentan progresivamente hasta alcanzar su valor máximo en la adul-

tes, al final de la cual comienzan de nuevo a descender hasta llegar a valores relativamente insignificantes en la ancianidad.

Según Kenneth y Hamblen (41), el máximo de excreción se encuentra entre los 35 y los 40 años, notándose una marcada declinación después de los 50 años.

Se han realizado investigaciones para establecer las variaciones que experimenta la eliminación de los 17 este esteroi-  
des y de los andrógenos diariamente y sobre grandes períodos de tiempo. Sidney C. Werner (59) ha hecho estudios para determinar alguna correlación entre los estrógenos y los 17 este esteroi-  
des.

De su estudio, Werner pudo desprender que los estró-  
genos y 17 este esteroi-  
des experimentan fluctuaciones sobre períodos cortos. Además no existe evidencia alguna de ningún ciclo en la eli-  
minación de estas hormonas como tampoco existe entre ellas ninguna  
correlación. Los valores medianos en la eliminación de los 17 este-  
steroides corresponden a los límites asignados a la eliminación de  
las mujeres normales. Esto no concuerda con la generalización de  
Fraser que afirma que los hombres eliminan más que las mujeres basán-  
dose en el hecho que la fracción derivada de la corteza suprarrenal  
es igual en ambos sexos, mientras que en el hombre se agrega una  
cantidad adicional proveniente de los testículos.

**DETERMINACION CUANTITATIVA DE ANDROGENOS URINARIOS EN HOMBRRES ADULTOS**

(hasta 40 años)

**TABLA N° 11**

**METODO DE ZIMMERMANN**

17ceto esteroides en

Muestra Nombre Edad Diuresis Miligramos de androsterona por 24 horas

1	R.M.V.	25 años	1400 cc.	14,60 mg
2	R.R.A.	24 años	1200 "	9,00 "
3	V.C.L.	33 años	1200 "	5,70 "
4	C.M.P.	23 años	1100 "	12,00 "
5	M.R.O.	24 años	1850 "	12,30 "
6	S.G.O.	21 años	1250 "	13,00 "
7	M.E.T.	21 años	1250 "	16,00 "
8	M.N.O.	21 años	1600 "	12,6 "
9	R.C.B.	25 años	1800 "	14,00 "
10	A.V.B.	27 años	2000 "	16,60 "
11	O.J.L.	23 años	1600 "	12,60 "
12	B.M.F.	26 años	1600 "	11,00 "
13	B.L.C.	23 años	1300 "	14,00 "
14	R.V.Z.	25 años	1300 "	7,00 "
15	E.J.B.	27 años	1600 "	12,60 "
16	B.D.C.	26 años	2100 "	17,00 "
17	J.G.M.	23 años	1100 "	8,00 "
18	J.C.G.	19 años	1550 "	16,00 "
19	V.A.M.	30 años	1650 "	10,00 "
20	S.T.S.	36 años	1350 "	11,60 "
21	M.S.I.	30 años	1800 "	12,60 "
22	E.H.B.	26 años	1400 "	15,00 "
23	S.D.G.	38 años	1750 "	9,00 "
24	J.C.N.	22 años	1950 "	8,00 "
25	M.T.S.	21 años	1500 "	16,00 "

PROMEDIO  
13 mg.

**DETERMINACION CUANTITATIVA DE ANDROGENOS URINARIOS EN MUJERES ADULTAS**

(hasta 40 años)

**TABLA Nº 12**

**METODO DE ZIMMERMANN**

17cetoesteroides en  
Miligramos de androsterona por 24 horas

Nuestra	Nombre	Edad	Diuresis	Miligramos de androsterona por 24 horas	
A	L.A.J.	19 años	1560 cc.	7,8 mg.	
B	T.O.S.	24 años	1900 "	4,5 "	
C	C.P.F.	25 años	1700 "	9,8 "	
D	A.M.B.	27 años	1680 "	7,0 "	
E	L.I.M.	21 años	1500 "	10,0 "	
F	B.B.S.	23 años	1320 "	4,6 "	
G	R.B.K.	21 años	1100 "	6,9 "	
H	A.O.A.	37 años	1500 "	7,0 "	
I	T.S.B.	30 años	1680 "	9,9 "	
J	S.Y.K.	24 años	1330 "	3,0 "	
K	E.L.C.	20 años	1300 "	4,5 "	
L	T.R.L.	34 años	1200 "	5,0 "	
M	R.C.A.	27 años	1180 "	5,0 "	
N	T.V.M.	31 años	1700 "	8,7 "	
O	M.E.G.	19 años	1160 "	7,6 "	
P	B.V.M.	18 años	1470 "	7,3 "	
Q	D.J.V.	22 años	1780 "	5,6 "	
R	R.K.P.	26 años	1920 "	4,0 "	
S	M.A.L.	34 años	1200 "	9,0 "	
T	T.P.S.	21 años	1310 "	6,6 "	
U	O.H.B.	37 años	1800 "	3,6 "	
V	L.M.O.	19 años	1140 "	7,0 "	
V	A.L.C.	19 años	1100 "	8,0 "	PROMEDIO
W	L.T.C.	31 años	1560 "	6,0 "	7,5 mg.
X	A.O.P.	27 años	1680 "	8,5 "	

DETERMINACION CUANTITATIVA DE ANDROGENOS URINARIOS EN HOMEBRES ADULTOS

(Mayores de 48 años)

TABLA N° 13

METODO DE ZIMMERMANN

17ceto esteroides en

Muestra	Nombre	Edad	Diuresis	Miligramos de androsterona por 24 horas
1°	A.S.V.	65 años	2600 cc	2,4 mg.
2°	A.M.V.	60 años	1000 "	1,9 "
3°	E.R.O.	64 años	2100 "	1,8 "
4°	J.H.E.	48 años	1500 "	3,6 "
5°	L.A.O.	57 años	1100 "	2,3 "
6°	R.S.H.	53 años	1100 "	0,6 "
7°	E.M.M.	67 años	1700 "	0,7 "
8°	R.M.S.	58 años	1300 "	1,4 "
9°	S.V.L.	57 años	1100 "	1,2 "
10°	L.T.F.	59 años	1300 "	2,6 "

Promedio 1,85 mg.

DETERMINACION CUANTITATIVA DE ANDROGENOS URINARIOS EN MUJERES ADULTAS

(Mayores de 48 años)

METODO DE ZIMMERMANN

TABLA N° 14

17ceto esteroides en

Muestra	Nombre	Edad	Diuresis	Miligramos de androsterona por 24 horas
1°	A.B.B.	49 años	1100 cc.	1,9 mg.
2°	L.S.O.	48 años	1200 "	3,2 "
3°	E.S.H.	50 años	1300 "	1,4 "
4°	R.A.L.	59 años	1200 "	0,45 "
5°	V.R.S.	49 años	1520 "	1,6 "
6°	F.L.M.	48 años	1750 "	2,3 "
7°	G.O.B.	49 años	1300 "	1,6 "
8°	H.P.Q.	54 años	1250 "	1,9 "
9°	A.O.B.	51 años	1300 "	1,8 "
10°	H.O.M.	54 años	1250 "	1,7 "

Promedio 1,80 mg.

DETERMINACION CUANTITATIVA DE ANDROGENOS URINARIOS EN NIÑOS

METODO DE ZIMMERMANN

TABLA N° 15

17ceto esteroides en

Muestra	Nombre	Edad	Diuresis	Miligramos de androsterona por 24 horas
a	C.M.P.	5 años	680 cc.	0,35 mg.
b	C.S.A.	7 años	830 "	0,40 "
c	O.A.L.	8 años	1100 "	0,30 "
d	F.C.M.	5 años	815 "	0,25 "
e	O.S.C.	12 años	1330 "	0,85 "
f	G.A.G.	6 años	800 "	0,66 "

PROMEDIO: 0,45 mg.

DETERMINACION CUANTITATIVA DE ANDROGENOS URINARIOS EN NIÑAS

METODO DE ZIMMERMANN

TABLA N° 16

17ceto esteroides en

Muestra	Nombre	Edad	Diuresis	Miligramos de androsterona por 24 horas
a'	M.E.M.	5 años	730 cc.	0,2 mg.
b'	G.S.T.	5 años	800 "	0,30 "
c'	O.A.G.	12 años	960 "	0,85 "
d'	A.F.A.	6 años	830 "	0,30 "
e'	L.M.P.	6 años	800 "	0,34 "
f'	S.O.R.	10 años	1120 "	0,70 "

PROMEDIO: 0,44 mg.



**DETERMINACION CUANTITATIVA DE ANDROGENOS URINARIOS EN HOMBRES ADULTOS**

(Hasta 40 años)

**TABLA N° 17**

**METODO DE HIDROLISIS Y EXTRACCION COMBINADA**

17ceto esteroides en

Muestra	Nombre	Edad	Diuresis	Miligramos de androsterona por 24 horas
1	R.M.V.	25 años	1400 cc.	12,30 mg.
2	R.E.A.	24 años	1200 "	6,00 "
3	V.C.L.	33 años	1200 "	4,20 "
4	C.M.P.	23 años	1100 "	11,00 "
5	H.R.O.	24 años	1850 "	10,60 "
6	S.G.O.	21 años	1850 "	10,00 "
7	M.E.T.	21 años	1250 "	15,00 "
8	M.M.O.	21 años	1600 "	9,80 "
9	R.C.B.	25 años	1800 "	13,90 "
10	A.V.B.	27 años	2000 "	14,00 "

PROMEDIO: 10,70 mg.

**DETERMINACION CUANTITATIVA DE ANDROGENOS URINARIOS EN MUJERES ADULTAS**

(Hasta 40 años)

**TABLA N° 18**

**METODO DE HIDROLISIS Y EXTRACCION COMBINADA**

17ceto esteroides en

Muestra	Nombre	Edad	Diuresis	Miligramos de androsterona por 24 horas
A	L.A.J.	19 años	1560 cc.	6,2 mg.
B	T.O.S.	24 años	1900 "	4,5 "
C	C.P.F.	26 años	1700 "	7,3 "
D	A.M.B.	27 años	1600 "	5,8 "
E	L.Y.M.	21 años	1500 "	9,0 "
F	B.B.S.	23 años	1320 "	3,8 "
G	R.B.K.	21 años	1100 "	6,0 "
H	A.O.A.	37 años	1500 "	5,7 "
I	T.S.B.	30 años	1680 "	8,1 "
J	S.Y.K.	24 años	1330 "	2,2 "

PROMEDIO: 5,9 mg.

**DETERMINACION CUANTITATIVA DE ANDROGENOS URINARIOS EN HOMBRES ADULTOS**  
(Mayores de 48 años)

**TABLA Nº 19**

**METODO DE HIDROLISIS Y EXTRACCION COMBINADA**

*17ceto esteroides en*

Muestra	Nombre	Edad	Diuresis	Miligramos de androsterona por 24 horas
1°	A.S.V.	65 años	2600 cc.	2,1 mg.
2°	A.M.V.	60 años	1000 "	1,0 "
3°	E.R.O.	64 años	2100 "	1,0 "

PROMEDIO: 1,4 mg.

**DETERMINACION CUANTITATIVA DE ANDROGENOS URINARIOS EN MUJERES ADULTAS**  
(Mayores de 48 años)

**TABLA Nº 20**

**METODO DE HIDROLISIS Y EXTRACCION COMBINADA**

*17ceto esteroides en*

Muestra	Nombre	Edad	Diuresis	Miligramos de androsterona por 24 horas
1°	A.B.B.	49 años	1100 cc.	1,1 mg.
2°	L.S.O.	48 años	1200 "	2,0 "
3°	E.S.N.	50 años	1300 "	0,9 "

PROMEDIO: 1,3 mg.

**DETERMINACION CUANTITATIVA DE ANDROGENOS URINARIOS EN NIÑOS Y NIÑAS**

**TABLA Nº 21**

**METODO DE HIDROLISIS Y EXTRACCION COMBINADA**

*17ceto esteroides en*

Muestra	Nombre	Edad	Diuresis	Miligramos de androsterona por 24 horas
a	C.M.P.	5 años	680 cc.	0,22 mg.
b	C.S.A.	7 años	820 "	0,30 "
a'	M.E.H.	5 años	730 "	0,1 "
b'	C.S.T.	5 años	890 "	0,18 "

PROMEDIO: 0,2 mg.

DETERMINACION CUANTITATIVA DE ANDROGENOS URINARIOS EN HOMBRRES ADULTOS

(Hasta 40 años)

TABLA N° 22

METODO DEL DR. MAC CULLAG Y T.R. MAC LIN

17 ceto esteroides en

Muestra	Nombre	Edad	Diuresis	Miligramos de androsterona por 24 horas
11	O.J.L.	23 años	1500 cc.	10,20 mg.
12	B.M.F.	26 años	1600 "	9,00 "
13	B.L.C.	23 años	1300 "	12,30 "
14	R.V.Z.	25 años	1300 "	6,00 "
15	E.J.B.	27 años	1000 "	10,00
				PROMEDIO: 9,50 mg.

DETERMINACION CUANTITATIVA DE ANDROGENOS URINARIOS EN MUJERES ADULTAS

(Hasta 40 años)

TABLA N° 23

METODO DEL DR. MAC CULLAG Y T.R. MAC LIN

17 ceto esteroides en

Muestra	Nombre	Edad	Diuresis	Miligramos de androsterona por 24 horas
K	E.L.C.	29 años	1300 cc.	2,8 mg.
L	T.R.L.	34 años	1200 "	4,0 "
M	R.C.A.	27 años	1160 "	4,3 "
N	T.V.N.	31 años	1700 "	6,7 "
Ñ	M.Z.G.	19 años	1160 "	5,8 "
				PROMEDIO: 4,70 mg.

DETERMINACION CUANTITATIVA DE ANDROGENOS URINARIOS EN HOMBRRES ADULTOS

(Mayores de 40 años)

TABLA N° 24

METODO DEL DR. MAC CULLAG Y T.R. MAC LIN

17 ceto esteroides en

Muestra	Nombre	Edad	Diuresis	Miligramos de androsterona por 24 horas
4'	J.H.E.	48 años	1500 cc.	2,1 mg.
5'	L.A.O.	57 años	1100 "	1,3 "
6'	R.S.H.	53 años	1100 "	0,4 "
				PROMEDIO: 1,2 mg.

DETERMINACION CUANTITATIVA DE ANDROGENOS URINARIOS EN MUJERES ADULTAS

(Mayores de 48 años)

TABLA N° 25

METODO DEL DR. MAC CULLAG Y T.R. MAC LIN

17 ceto esteroides en  
Miligramos de androsterona  
por 24 horas

Muestra	Nombre	Edad	Diuresis	Miligramos de androsterona por 24 horas
4 <sup>a</sup>	R.A.L.	59 años	1200 cc.	0,30 mg.
5 <sup>a</sup>	V.R.S.	49 años	1520 cc.	1,00 "
6 <sup>a</sup>	F.L.M.	48 años	1780 cc.	1,8 "

PROMEDIO: 1,03 mg.

DETERMINACION CUANTITATIVA DE ANDROGENOS URINARIOS EN NIÑOS Y NIÑAS

TABLA N° 26

METODO DEL DR. MAC CULLAG Y T.R. MAC LIN

17 ceto esteroides en  
Miligramos de androsterona  
por 24 horas

Muestra	Nombre	Edad	Diuresis	Miligramos de androsterona por 24 horas
c	O.A.L.	8 años	1100 cc.	0,20 mg.
d	F.C.M.	5 años	815 "	0,15 "
e'	O.A.G.	12 años	960 "	0,62 "
d'	A.F.A.	6 años	830 "	0,22 "

PROMEDIO: 0,30 mg

**DETERMINACION CUANTITATIVA DE ANDROGENOS URINARIOS EN HOMBRES ADULTOS**  
(Hasta 40 años)

**TABLA Nº 27**

**EXTRACCION EN EMBUDO DE DECAANTACION (TALBOT BUTLER Y MAC LACHLAN)**

Muestra	Nombre	Edad	Diuresis	<sup>17</sup> ceto esteroides en Miligramos de androsterona por 24 horas
16	B.D.C.	26 años	2100 cc.	17,00 mg
17	J.G.M.	23 años	1100 "	7,80 "
18	J.C.G.	19 años	1550 "	15,20 "
19	V.A.M.	30 años	1650 "	10,00 "
20	S.T.S.	36 años	1350 "	11,40 "
21	M.S.I.	30 años	1800 "	12,20 "
22	K.H.B.	26 años	1400 "	14,00 "
23	S.D.G.	38 años	1750 "	9,00 "
24	J.C.M.	22 años	1950 "	7,30 "
25	M.T.S.	21 años	1500 "	15,40 "
				PROMEDIO: 12 mg.

**DETERMINACION CUANTITATIVA DE ANDROGENOS URINARIOS EN MUJERES ADULTAS**  
(Hasta 40 años)

**TABLA Nº 28**

**EXTRACCION EN EMBUDO DE DECAANTACION (TALBOT BUTLER Y MAC LACHLAN)**

Muestra	Nombre	Edad	Diuresis	<sup>17</sup> ceto esteroides en Miligramos de androsterona por 24 horas
O	B.V.M.	18 años	1470 cc.	7,00 mg.
P	D.J.V.	22 años	1780 "	5,6 "
Q	R.K.P.	26 años	1920 "	4,0 "
R	H.A.L.	34 años	1200 "	8,8 "
S	T.P.S.	21 años	1310 "	6,4 "
T.	O.H.B.	37 años	1800 "	3,6 "
U	L.M.O.	19 años	1140 "	7,0 "
V	A.L.G.	19 años	1100 "	7,2 "
W	L.T.C.	31 años	1550 "	5,8 "
X	A.O.P.	27 años	1660 "	8,2 "
				PROMEDIO: 6,40 mg.

**DETERMINACION CUANTITATIVA DE ANDROGENOS URINARIOS EN HOMBRRES ADULTOS**

**(Mayores de 48 años)**

**TABLA N° 22**

**EXTRACCION EN EMBUDO DE DECANACION (TALBOT BUTLER Y MAC LACHLAN)**

Muestra	Nombre	Edad	Diuresis	Miligramos de androsterona por 24 horas
7°	N.M.M.	67 años	1700 cc.	0,7 mg.
8°	R.M.B.	63 años	1300 "	1,3 "
9°	S.V.L.	57 años	1100 "	1,00"
10°	L.T.F.	69 años	1300 "	2,3 "

PROMEDIO: 1,40 mg.

**DETERMINACION CUANTITATIVA DE ANDROGENOS URINARIOS EN MUJERES ADULTAS**

**(Mayores de 48 años)**

**TABLA N° 23**

**EXTRACCION EN EMBUDO DE DECANACION (TALBOT BUTLER Y MAC LACHLAN)**

Muestra	Nombre	Edad	Diuresis	Miligramos de androsterona por 24 horas
7"	G.O.B.	49 años	1300 cc.	1,3 mg.
8"	N.P.K.	54 años	1250 "	0,9 "
9"	A.O.B.	51 años	1300 "	1,5 "
10"	H.O.H.	54 años	1250 "	1,3 "

PROMEDIO: 1,30 mg

**DETERMINACION CUANTITATIVA DE ANDROGENOS URINARIOS EN NIÑOS Y NIÑAS**

**TABLA N° 24**

**EXTRACCION EN EMBUDO DE DECANACION (TALBOT BUTLER Y MAC LACHLAN)**

Muestra	Nombre	Edad	Diuresis	Miligramos de androsterona por 24 horas
e	O.S.C.	12 años	1330 cc.	0,80 mg.
f	G.A.G.	6 años	900 "	0,65 "
e'	L.M.P.	6 años	800 "	0,32 "
f'	S.Q.B.	10 años	1120 "	0,70 "

PROMEDIO: 0,62 mg.

Comparación de las  
tablas pag 54

CONCLUSIONES

- 1) Con el objeto de conseguir un índice fiel de la actividad endocrina de un sujeto, se ha ensayado un método colorimétrico para la determinación cuantitativa de los andrógenos urinarios según la reacción de Zimmermann. Esta reacción está basada en el hecho que los 17 este-esteroides en presencia de álcalis y meta-dinitro-benceno dan una coloración roja característica.
- 2) Para la extracción de los andrógenos urinarios se ha seguido la técnica de Zimmermann, con ligeras modificaciones que se han considerado convenientes. El fundamento de este método de extracción es el siguiente: Hidrólisis fuerte de la orina llevada a pH 1, extracción de los 17 este-esteroides con benceno, fraccionamiento del extracto bencénico con el fin de separar los compuestos androgénicos de otros que los acompañan, captación de los andrógenos en alcohol absoluto y por último la reacción de Zimmermann.
- 3) Las determinaciones se efectuaron en orinas de 24 horas, recogidas con xilol para evitar la descomposición amoniacal.
- 4) El extractor que se ha usado ~~fue construido por el Sr. Klebassa del curso de construcción de vidrio de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales~~ ha resultado de fácil manejo, poco costoso y bastante eficiente pues, en tanto que las primeras extracciones necesitaron 24 horas, en las últimas se logró comprobar que el mismo aparato podía extraer todo el material androgénico en 12 horas, o sea, que el tiempo de extracción se redujo a la mitad.

- 5) Se hicieron experiencias con éter en lugar de benceno, como líquido extractor; el remplazo puede hacerse con ventajas porque aunque el éter es más costoso la marcha de la extracción se hace más corta.
- 6) Las sustancias androgénicas extraídas de la orina se han <sup>exp-tome</sup> ~~exp-~~ <sup>tomado</sup> ~~tomado~~ en 10 cc. de alcohol absoluto, con el objeto de evitar en lo posible la acción del agua sobre los andrógenos; en ésta solución se ha practicado la reacción de Zimmermann.
- 7) Es necesario tomar en consideración los numerosos factores que influyen en el desarrollo de la reacción; si se quiere obtener un buen resultado:
  - a) Meta-dinitro-benceno: Se usa una solución al 2% en alcohol absoluto; con soluciones más diluidas los valores de los andrógenos resultan más bajos; además, este reactivo debe ser practicamente puro y bien cristalizado y debe conservarse en frasco oscuro al abrigo de la luz, manteniendo su estabilidad por 15 a 20 días.
  - b) Solución de HOK: Debe ser exactamente al 2,5 N, pues se ha establecido que la concentración influye sobre el color de la reacción; permanece sin alterarse de 2 a 4 días si se conserva en un refrigerador, y debe dejar de usarse tan pronto como aparece en ella un leve color amarillento. La solución se hace en alcohol absoluto.
  - c) Alcohol absoluto: Debe estar libre de aldehidos. Fue preparado en el laboratorio a partir de alcohol a 95%.



- d) Tiempo de desarrollo de la reacción: El color de la reacción alcanza su máximo a la hora, al cabo de la cual se diluye en alcohol absoluto; se ha constatado que se puede reemplazar con alcohol de 95° siempre que las lecturas al foto-colorímetro se hagan inmediatamente después de la dilución.
- e) Temperatura: La temperatura óptima es de 25°. Con temperaturas superiores a 30° la reacción no se efectúa en buena forma, obteniéndose un color <sup>rojo</sup> escuro pardusco que debe desestimarse; con temperaturas inferiores a 25°, la coloración que da la reacción es menos intensa y, por consiguiente, se obtendrán valores más bajos.
- f) Acción de la luz: La reacción debe realizarse al abrigo de la luz, de lo contrario se obtendrá una coloración menos intensa.
- g) Acción de la luz después de la dilución: Después de diluir la reacción con alcohol absoluto, el color se desvanece lentamente en la oscuridad, lo que se acelera por la exposición a la luz. De tal manera que la lectura al foto colorímetro se puede efectuar después de 25 minutos de la dilución sin que varíen sensiblemente los resultados, siempre que la solución se mantenga en la oscuridad.
- h) Acción de la humedad: El material que se usa para la reacción debe estar completamente seco. Los reactivos deben ser disueltos en alcohol absoluto.
- 8) Para la confección de la curva colorimétrica se ha tomado como punto de partida una solución madre que contenía 15 mg. de an-

drosterona en 10 cc. de alcohol absoluto. Los valores de andros-  
terona en esta escala oscilan entre 0,30 mg. como límite supe-  
rior y 0,0075 mg. como límite inferior. Dada la poca estabili-  
dad de la coloración de ésta escala, se ha fijado con solución  
de sulfato de cobalto y de permanganato de potasio.

- 9) A pesar que por el calentamiento se producen pérdidas que no su-  
ben del 33%, este método presenta ventajas evidentes sobre los  
métodos biológicos, por su mayor sensibilidad, su manipulación  
fácil y el tiempo reducido que se requiere para cada determina-  
ción.
- 10) Al mismo tiempo que se hicieron las determinaciones por el mé-  
todo de Zimmermann se ha tratado de comparar los resultados con  
los métodos de Hidrólisis y extracción combinada, con el método  
del Dr. Mac Gillar y T. S. Mac Ling, y con el método de extrac-  
ción en embudo de decantación dado por Talbot, Butler y Mac  
Lachlan.
- 11) Las determinaciones han sido hechas en orina de niños, adultos  
jóvenes (hasta 40 años) y adultos mayores de 48 años (Incluyen-  
do las últimas décadas de la vida). Todos estos sujetos eran  
normales desde el punto de vista endocrino y sin antecedentes  
patológicos de importancia.

La cantidad de andrógenos que se ha encontrado en los indivi-  
duos normales, varía dentro de los límites relativamente amplios.  
El nivel que han arrojado nuestras determinaciones son los si-  
guientes:

METODO DE ZIMMERMANN

5,70 mg. y 17 mg. por 24 horas en los hombres hasta 40 años, con un promedio de 13 mg. por 24 horas.

Mínimo 3,0 mg. Máximo 10,00 mg. Promedio: 7,5 mg. por 24 horas en mujeres adultas hasta 40 años.

Mínimo 0,6 mg. Máximo 3,6 mg. Promedio: 1,85 mg. por 24 horas en hombres adultos mayores de 48 años.

Mínimo 0,45 mg. Máximo 3,2 mg. Promedio: 1,80 mg. por 24 horas en mujeres adultas mayores de 48 años.

Mínimo 0,25 mg. Máximo 0,85 mg. Promedio: 0,45 mg. por 24 horas en niños.

Mínimo 0,20 mg. Máximo 0,85 mg. Promedio: 0,44 mg. por 24 horas en niñas.

METODO DE HIDROLISIS Y EXTRACCION COMBINADA

Mínimo 4,20 mg. Máximo 15,00 mg. Promedio: 10,70 mg. En hombres adultos hasta 40 años.

Mínimo 2,20 mg. Máximo 9,00 mg. Promedio: 5,9 mg. En hombres adultos hasta 40 años.

Mínimo 1,00 mg. Máximo 2,1 mg. Promedio: 1,4 mg. En hombres adultos mayores de 48 años.

Mínimo 0,9 mg. Máximo 2,0 mg. Promedio: 1,3 mg. En mujeres adultas mayores de 48 años.

Mínimo 0,18 mg.      Máximo: 0,30 mg.      Promedio: 0,2 mg. En niños y niñas.

METODO DEL DR. MAC CULLAG Y T.R. MAC LIN

Mínimo 6,00 mg      Máximo: 12,30 mg.      Promedio: 9,50 mg. En hombres adultos hasta 40 años.

Mínimo 4,0 mg.      Máximo: 6,7 mg.      Promedio: 4,70 mg. En mujeres adultas hasta 40 años.

Mínimo 0,4 mg.      Máximo: 2,1 mg.      Promedio: 1,2 mg. En hombres adultos mayores de 48 años.

Mínimo 0,3 mg.      Máximo: 1,8 mg.      Promedio: 1,03 mg. En mujeres adultas mayores de 48 años.

Mínimo: 0,2 mg.      Máximo: 0,62 mg.      Promedio: 0,30 mg. En niñas y niños.

EXTRACCION EN EMBUDO DE DECAANTACION (TALBOT-BUTLER Y MAC LACHLAN)

Mínimo 7,30 mg.      Máximo: 17,0 mg.      Promedio: 12 mg. En hombres adultos hasta 40 años.

Mínimo 3,6 mg      Máximo: 8,8 mg.      Promedio: 6,40 mg. En mujeres adultas hasta 40 años.

Mínimo 0,7 mg.      Máximo: 2,3 mg.      Promedio: 1,40 mg. En hombres adultos mayores de 48 años.

Mínimo 0,9 mg.      Máximo: 1,5 mg.      Promedio: 1,30 mg. En mujeres adultas mayores de 48 años.

**Mínimo 0,32 mg. Máximo: 0,80 mg. Promedio: 0,62 mg. En niños y niñas.**

- 12) Las dosificaciones revelan que las cantidades de andrógenos son bajas hasta el momento de la pubertad, en que aumentan progresivamente hasta alcanzar su valor máximo en la adultos, al final de la cual comienzan de nuevo a descender hasta llegar a valores relativamente insignificantes.

---

*Elaborado por el Dr. J. J. Rodríguez*

BIBLIOGRAFIA

- (1) Adler A.A.: Nature 133: 798: 1934.- Active and inactive forms of the hormone promoting comb growth.
- (2) Bitté E.: Justus Liebig's Annalen Der Chemie 269:377:1892.- Ueber eine Reaction der Aldehyde und Ketone mit arom Nitroverbindungen.
- (3) Burrows H., Cook J.W., Roe E.M.F., Warren F.L.: Biochemical Journal 31:1:950:1937.- Isolation of  $\Delta^{3:5}$  - Androstadiene-17-one from the urine of a man with a malignant tumour of the adrenal cortex.
- (4) Butenandt A., Tscherning K.: Hoppe-Seyler's Zeitschrift fuer Physiologische Chemie 229: 167: 1934.- Über Androsteron ein krystallisiertes männliches Sexualhormon.
- (5) Butenandt A., Tscherning K.: Hoppe-Seyler's Zeitschrift fuer Physiologische Chemie 229: 185: 1934.- Über Androsteron Seine chemische Charakterisierung.
- (6) Butenandt A., Dannenberg H.: Hoppe-Seyler's Zeitschrift fuer Physiologische Chemie 229: 192: 1934.- Isolierung eines neuen physiologisch unwirksamen Sterinderivates aus Männerharn, seine Verknüpfung mit Dehydroandrosteron und Androsteron: ein Beitrag zur Konstitution des Androsterons.
- (7) Butenandt A., Hanisch G.: Hoppe Seyler's Zeitschrift fuer Physiologische Chemie 237:89:1935.- Umwandlung des Dehydro-Androsterons in Androstendiol und Testosteron ein weg zur Darstellung des Testosterons aus Cholesterin.

- (8) Butenandt A., Tscherning K., Dannenberg H.: Hoppe Seyler's fuer Physiologische Chemie 248: 205; 1937.- Über epi-Ätiocholan-3, 17 aus Männerharn.
- (9) Butler G.C., Marrian G.F.: Nature 142:399;1938.- A simple conversion of trans-dehyde-androsterone into pregnane derivatives.
- (10) Butler G.C., Marrian G.F.: Journal of Biological Chemistry 124: 237; 1938.- Chemical studies on the adreno-genital syndrome. The isolation of 3 ( $\alpha$ ) hydroxyetiocholan-17-one, 3 ( $\beta$ ) hydroxyetiocholan-17-one (isandrosterone), and a new triol from the urine of a woman with an adrenal tumor.
- (11) Calley R.K.: Journal of the Society of Chemical Industry 55: 1030; 1936. Isolation of the male hormone in the urine of a patient with an adrenal tumor.
- (12) Calley R.K., Calley H.H., Emmons C.W.: Biochemical Journal 32: 2: 1312; 1938. Colorimetric determination of substances containing the grouping  $\text{CH}_2\text{CO}$  in urines extracts as an indication of androgen content.
- (13) Calley H.H., Calley R.K., Emmons C.W., Stroud S.W. Endocrinology 24: 1: 76; 1939. Method of extracting compounds related to the steroids hormones from human urine.
- (14) Calley H.H., Calley R.K.: Biochemical Journal 34: 1: 276; 1940.- Excretion of androgens by eunuchs, the isolations of 17-ketosteroids from the urine.
- (15) Calley H.H., Calley R.K.: Biochemical Journal 32: 2: 1759; 1938.- The isolation of androsterone and transdehydroandrosterone from the urine of normal women.

- (16) CALLOW N.H., CALLOW R.K.: Biochemical Journal 33:1: 931:1939.  
The isolation of 17-ketosteroids from the urine of normal women.
- (17) CALLOW N.H.: Biochemical Journal 33:1:559:1939.- The isolation of two transformation products of testosterone from urine.
- (18) COHEN S.L., MARRIEN G.F.: Biochemical Journal 29:2:1577: 1935.  
The hydrolysis of the combined forms of oestrons and oestriol present in human pregnancy urine.
- (19) CONSOLASIO W.V., TALBOT J.H.: Endocrinology 27: 355: 1940.-  
The extraction and determination of 17-KS in urine.
- (20) CRUZ-COKE EDUARDO: La corteza suprarrenal. 1942. Nascimento. Santiago.
- (21) DINSMAN E., LEONARD E.: Biochemical Journal 32: 1:651: 1938.- Estimation of (capen) comb growth hormone in urine.
- (22) DINSMAN E., COOK J.W., HAMILTON J.H.: Journal of Biological Chemistry 130-285: 1939.- Conversion by the human of the testis hormone, testosterone into the urinary androgen, androsterone.
- (23) DAISY E.A., YELER G.D., THAYER E.: Journal of Biological Chemistry 96: 499: 1930.- The preparation of the crystalline ovarian hormone from the urine of pregnant women.
- (24) DRINE D.J., OSTERBERG A.H.: Endocrinology 27:345:1940.- An evaluation of a colorimetric and a biologic method for determining urinary androgens.



- (25) Engel L.L., Thorn G.W., Lewis R.A.: Journal of Biological Chemistry 137: 205: 1941.- Urinary excretion of steroid compounds.
- (26) Fraser R.W., Forbes A.P., Albright F., Solkovich, Hirsch, Reifstein S., Jr.: The Journal of Clinical Endocrinology 28: 1940, 1:3:23:1941.- Colorimetric assay of 17-KS in urine.
- (27) Friedland H., Berman R.: Endocrinology 28:248: 1941.- Effect of water on accuracy of n.d.benzene reaction in the quantitative assay of urinary ketosteroids.
- (28) Friedland H., Whidden H.L.: Endocrinology 27: 258: 1940. Colorimetric determination of crystalline and urinary ketosteroids.
- (29) Glass J., Donald H.L., Wright,: Endocrinology 26: 590: 1940.- Sex hormone studies in male homosexuality.
- (30) Goldzieher M.: The endocrine glands.
- (31) Gradwohl R.B.H.: Clinical laboratory methods and diagnosis. Assay for male sex hormones in urine. 1938.
- (32) Grallmann A.: Essential of endocrinology. Assay of the male hormone.
- (33) Hartman K., Lecher F.: Helvetica Chimica Acta 18: 160: 1935.- Über allo-Pregnan-diol einen neuen alkohol aus den Schwangerenbarn.
- (34) Hamblen E.C., Cuyler W.K., Baptis M.: The Journal of Clinical Endocrinology 1: 9: 763: 1941. Urinary excretion of 17-KS in ovarian failure.

- (35) Hamblen E.C., Ross R.A., Kenneth Cuyler W., Bantis H., Ashley C.: Endocrinology 25: 4: 1939.- Studies of the metabolism of androgens in women.
- (36) Haller E.: The Journal of Clinical Endocrinology 1: 10: 1941. Gonadotropic hormones: Urine assays during the menstrual cycle in normal women.
- (37) Heraberg, Wolfe J.K.: The Journal of Biological Chemistry 141: 1: 1941. A rapid extractor of urinary steroids.
- (38) Hirschman H.L.: Journal of Biological Chemistry 130: 421:1939. Androgens from the urine of ovariectomized women.
- (39) Haskins W.H., Coffman J.R., Koch F.C., Keenan A.T.: Endocrinology 24: 702: 1939. Effect of testosterone propionate on urinary excretion of androgens and estrogens in castratedism.
- (40) Halterf A.F., Koch F.C.: Journal of Biological Chemistry 135: 377: 1940.- The colorimetric estimation of 17-ketosteroids and their application to urine extracts.
- (41) Kenneth Cuyler, Hamblen E.C., Bantis H., Salmon A.A.: The Journal of Clinical Endocrinology 2: 5:318: 1942.- 17 ES excretion and seminal function.
- (42) Kinsley A.C.: The Journal of Clinical Endocrinology 1: 5:424: 1941.- Criteria for a hormonal explanation of the homosexual.
- (43) Koch F.C.: Annual Review of Biochemistry 9: 341:1940.- Hormones.
- (44) Kochiakiian C.H.: Endocrinology 21: 60: 1937.- Excretion of male hormones.

- (45) Koenig Y.: The Journal of Biological Chemistry 141:2:487: 1941.- A colorimetric reaction for the testosterone.
- (46) MC CULLAGH E.P., LILGA H.V.: Endocrinology 26:753: 1940.- Bioassays for urinary androgens.
- (47) MARKER R.E.: Journal of the American Chemical Society 60: 2: 1725: 1938. The origin and interrelations hips of the steroidal hormones.
- (48) Hathanson I., Toms J., Aub J.: Endocrinology 24: 335: 1939.- The daily excretion of urinary androgens in normal children.
- (49) Haterval Ch.R.: The Journal of Biological Chemistry 133:2: 1940.- A small apparatus for extracting urinary androgens.
- (50) Oosting R.B.: Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine 36:504: 1937.- A colorimetric assay for male sex hormones in urine.
- (51) Pincus G., Pearlman W.H.: Endocrinology 29: 413: 1941.- Fractionation of neutral urinary steroids.
- (52) Ruzicka L., Goldberg H.W.: Helvetica Chimica Acta 18: 668: 1935. Ubereinstimmung der sterischen Konfiguration des 3- standigen Hydroxys bei Lithochoesdure und epikopresterin.
- (53) Ruzicka L., Wettstein A.: Helvetica Chimica Acta 18: 1264: 1935. Uber die kunstliche Herstellung des Testikelhormons Testesteron (Androsten 3-on 17-ol).
- (54) Ruzicka L., Goldberg H.W., Brunger H.: Helvetica Chimica Acta 17: 1389: y 1395: 1935. Uber die Gewinnung von 3- chlor und 3 Oxy-atio-allocholanon (17) synthese

einer Verbindung von den Eigenschaften des Testikelhormones (androsteron) und stereoisomer desselben durch Abbau hydrierter Sterine.

- (55) Scott W.H., Cornelius Vermeulen: The Journal of Clinical Endocrinology 2: 7: 1942. Studies on prostatic cancer. Excretion of 17 EB strogens and gonadotropins before and after castration.
- (56) Talbot H.B., Barman R.A., Mac Lachlan E.A.: The Journal of Biological Chemistry 143:1:1942. Elimination of errors in the colorimetric assay of neutral urinary 17 EB by means of a colour correction equation.
- (57) Yennig E.H.: The Journal of Biological Chemistry 119: 473: 1937. Gravimetric method for the determination of co-dium pregnandiol glucuronidate (an excretion product of progesterone).
- (58) Warner S.C.: The Journal of Clinical Investigation 22:3:1943. A quantitative study of the urinary excretion of hypophysical gonadotropin, estrogen and neutral 17 EB of normal men.
- (59) Welf W.: Endocrinology in Modern practice. Second Edition. 1940; Saunders Co.
- (60) Zimmermann M.: Hoppe Seyler's Zeitschrift fuer Physiologische Chemie 233: 267: 1935. Eine Farbreaction des Sexual-hormone und ihre anwendung zur quantitativen colorimetrischen Bestimmung.
- (61) Zimmermann M.: Hoppe Seyler's Zeitschrift fuer Physiologische Chemie 245:47:1937. Colorimetrische Bestimmung der Keindruesenhormone.