

Tesis de Posgrado

Estudio de los corticoides eliminados en el embarazo normal y patológico; su valoración química y caracterización de los componentes por adsorción cromatográfica

Pasqualini, Jorge Raúl

1956

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas 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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Pasqualini, Jorge Raúl. (1956). Estudio de los corticoides eliminados en el embarazo normal y patológico; su valoración química y caracterización de los componentes por adsorción cromatográfica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0877_Pasqualini.pdf

Cita tipo Chicago:

Pasqualini, Jorge Raúl. "Estudio de los corticoides eliminados en el embarazo normal y patológico; su valoración química y caracterización de los componentes por adsorción cromatográfica". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1956. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0877_Pasqualini.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Ministerio de Educación
Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

RESUMEN DE TESIS

presentada para optar al
título de Doctor en Química
por

JORGE RAUL PASQUALINI

ESTUDIO DE LOS CORTICOIDES ELIMINADOS EN EL EMBARAZO NORMAL
Y PATOLOGICO; SU VALORACION QUIMICA Y CARACTERIZACION DE
LOS COMPONENTES POR ADSORCION CROMATOGRAFICA

Res. de tesis : 877

Buenos Aires
1956

R 877

El trabajo realizado comprende dos partes, en la primera de ellas se hace el estudio químico de los corticoides en embarazos normales y patológicos; en la segunda parte se realiza el estudio cromatográfico de los corticoides en iguales casos que los estudiados anteriormente, además se trata de comparar cuantitativamente ambas apreciaciones.

El estudio químico comprende: a) valoraciones de corticoides considerados como termolábiles (Corcoran, 1948); b) valoraciones de corticoides considerados como termoestables (Tompsett, 1953) y c) sustancias consideradas como 17 hidroxicorticoides (Glenn y Nelson, 1952).

Los datos obtenidos en los casos considerados permiten deducir un aumento de la excreción urinaria en razón del doble para los termolábiles, del triple para los termoestables y un poco más del triple para las sustancias consideradas como 17 hidroxicorticoides, hacia el sexto mes de embarazo; algunos casos patológicos estudiados en el período de máxima excreción no muestran mayores desviaciones con respecto a los valores obtenidos en las gestaciones normales.

Las curvas de comparación en las valoraciones se hicieron: para corticoides termolábiles con 11 Dehidro-corticosterona (Kendall A), para corticoides termoestables con acetato de desoxicorticosterona (Reichstein Q), y para 17 hidroxicorticoides con 17 hidroxil- 11 dehidro-corticosterona (Kendall F).

En la cromatografía en papel se siguió la técnica propuesta por Zaffaroni (1951), se hicieron valoraciones con los testigos correspondientes a seis hormonas puras de acción fisiológica conocida que

corresponden a las siguientes sustancias:

11-Dehidrocorticosterona	(Kendall A)
Corticosterona	(Kendall B)
17 hidroxicorticosterona	(Kendall E)
17 hidroxi-11 dehidro- corticosterona	(Kendall F)
Desoxicorticosterona	(Reichstein Q)
17 hidroxi-desoxico- r-ticosterona	(Reichstein S)

Se obtuvieron los valores del índice R_f (cuya tabla figura en el trabajo), siendo los valores hallados poco distintos a los obtenidos por el autor citado.

Se cromatografiaron los extractos urinarios, en diferentes tiempos mostrando que la eliminación corresponde casi exclusivamente a la zona de los compuestos 17 hidroxicorticosterona y 17 hidroxi-11 dehidrocorticosterona.

Apreciaciones aproximadas en los revelados utilizando trifeniltetrazolima (TPTZ) y comparada con las hormonas puras permiten deducir valores comprendidos entre un décimo y un cuarentavo del valor químico correspondiente.

J. H. ...

[Signature]

RESUMEN Y CONCLUSIONES

J. 19-3

- 1º - Se estudió la eliminación urinaria de corticoides durante el embarazo normal y patológico, empleando métodos químicos para la estimación de los corticoides termolábiles, corticoides termoestables y 17 hidroxí-corticoides.
- 2º - Los valores encontrados para dichos corticoides hasta las proximidades del tercer mes de gestación, no difiere de los hallados para las eliminaciones normales intermestruales, aumentando entonces los termolábiles hasta el doble, los termoestables hasta el triple y los 17 hidroxí-corticoides hasta poco más del triple hacia el sexto mes; descendiendo luego para llegar a valores algo mayores que los intermestruales al final de la gestación.
- 3º - Algunos casos patológicos estudiados en el período de máxima excreción no muestran mayores desviaciones con respecto a los datos obtenidos en gestaciones normales.
- 4º - La cromatografía sobre papel, muestra que los corticoides eliminados durante el período de máxima excreción corresponderían a la 17 hidroxí-corticosterona (cuerpo F) y 17 hidroxí-11 dehidrocorticosterona (cuerpo E).
- 5º - Apreciaciones aproximadas en los revelados de los cromatogramas comparados con las sustancias puras, permiten deducir valores comprendidos entre un décimo y un cuarentaavo del valor químico correspondiente a los 17 hidroxí-corticoides.

José Rodríguez

Res de Tesis: 877

Ministerio de Educación
Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

ESTUDIO DE LOS CORTICOIDES ELIMINADOS EN EL EMBARAZO NORMAL Y
PATOLOGICO; SU VALORACION QUIMICA Y CARACTERIZACION DE LOS
COMPONENTES POR ADSORCION CROMATOGRAFICA.

72373. 877

Tesis presentada para optar al
título de Doctor en Química
por

JORGE RAUL PASQUALINI

Buenos Aires
1956

Faciendo de Jefe:

DR. OSVALDO H. REPELLO

NOTA

A mi padrino de Tesis Dr. Osvaldo M. Repetto expreso mi sincera gratitud, por haberme dirigido tan acertadamente en la realización del presente trabajo.

Este trabajo se llevó a cabo en la Sección Organoterapia del Instituto Malbrán y en la Sección Endocrinología del Laboratorio Central del Hospital Rivadavia, a cuyos Jefes Dres. Mario P. Antola y Adolfo Raíces manifiesto mi agradecimiento por todas sus gentilezas.

Igual sentimiento expreso a los Laboratorios Merck, Sharpe y Dohme, por haberme facilitado las hormonas puras; y a todas las personas que con su contribución facilitaron esta tarea.

CAPITULO I

FISIOLOGIA DE LAS HORMONAS DE LA CORTEZA SUPRARRENAL

La función de la corteza suprarrenal es recién reconocida en el año 1854 por Koelliker, quien distingue la diferente estructura de la corteza y la médula suprarrenal.

Thomas Addison en 1855 describe los síntomas de la insuficiencia suprarrenal y un año después Brown y Séquard demostraron los efectos de la insuficiencia suprarrenal en conejos, perros y ratas por extirpación previa de la glándula, en caso que la extirpación era bilateral, los animales morían indefectiblemente.

En 1927 Hartman, Mc Arthur and Hartman, Rogoff y Stewart, obtuvieron extractos de corteza suprarrenal, capaces de mantener la vida en animales adrenalectomizados.

En 1933 Kendall and Grollman aislaron sustancias cristalinas activas y luego Reichstein caracterizó el primer componente que llamó CORTICOSTERONA y el mismo investigador en 1938 descubrió la 11-Dehydrocorticosterona.

La 17 hidroxí-corticosterona fué aislada por Reichstein en 1937 y por Kendall en 1938.

Hasta el presente se han aislado 38 corticoides, (Haines, 1952) de los cuales 7 son considerados con actividad fisiológica definida.

Las funciones de las hormonas de la corteza suprarrenal son varias y entre ellas podemos diferenciar:

I) Actividad mineralo-corticoide:

Las hormonas que tienen esta actividad son: la 11-Desoxicorticosterona (Reichstein A); la 11 Desoxi- 17 hidroxycorticosterona (Reichstein S) y la Aldosterona (Simpson 1953); actúan controlando el equilibrio electrolítico y del agua entre los líquidos celulares y extracelulares, favoreciendo la retención del cloro, sodio y agua y la eliminación del potasio.

En los casos de insuficiencia suprarrenal se comprueba la disminución del ión sodo y cloro en el plasma sanguíneo, como del agua; la disminución que resulta del líquido extracelular por la deshidratación trae por consiguiente una perturbación en la presión oncótica, originándose así un estado de shock en los casos agudos.

Además se comprueba aumento del potasio sanguíneo.

II) Actividad glucocorticoide:

Actúan en el metabolismo de los hidratos de carbono, especialmente de la glucosa, ya sea por gluconeogénesis o por disminución de la glucólisis, especialmente tienen actividad: 17 hidroxycorticosterona (Kendall F); la 11 Dehidro-17 hidroxycorticosterona (Kendall E); y en menor intensidad la 11 Dehidrocorticosterona (Kendall A) y la corticosterona (Kendall B).

En la insuficiencia suprarrenal se observa una mayor sensibilidad e intolerancia a la insulina (Lewis 1924).

En la enfermedad de Addison, típica de la insuficiencia suprarrenal la glucemia se halla disminuida; con valores de 0,75 y hasta 0,60 gr o/oo.

III) Actividad renal

Las hormonas de la corteza suprarrenal contribuyen a regular el volumen plasmático, debido a la acción que ejercen a la altura de los tubos renales de favorecer la reabsorción del ion cloro, sodio y agua y la eliminación del ión potasio.

En la insuficiencia suprarrenal se observa mayor eliminación del sodio y cloro y retención del potasio y sustancia nitrogenadas.

Cuando la insuficiencia entra en la faz aguda se produce oliguria y poliuria.

IV) Actividad sexual

Las hormonas de la corteza suprarrenal participan en la síntesis de los esteroides, en general y en el metabolismo de las hormonas sexuales (Hamblen 1945).

Las alteraciones fisiológicas y anatómicas que las hormonas corticales producen sobre los caracteres sexuales han sido ampliamente demostradas.

En la hiper función córtico suprarrenal en la mujer se producen fenómenos de virilización.

En el hombre se comprueba un síndrome de feminización como lo ha demostrado experimentalmente Hell (1930).

Experimentalmente se ha comprobado que la inyección de desoxicorticosterona provoca acciones progestacionales en el endometrio de conejos y cobayos (Miescherk, 1938).

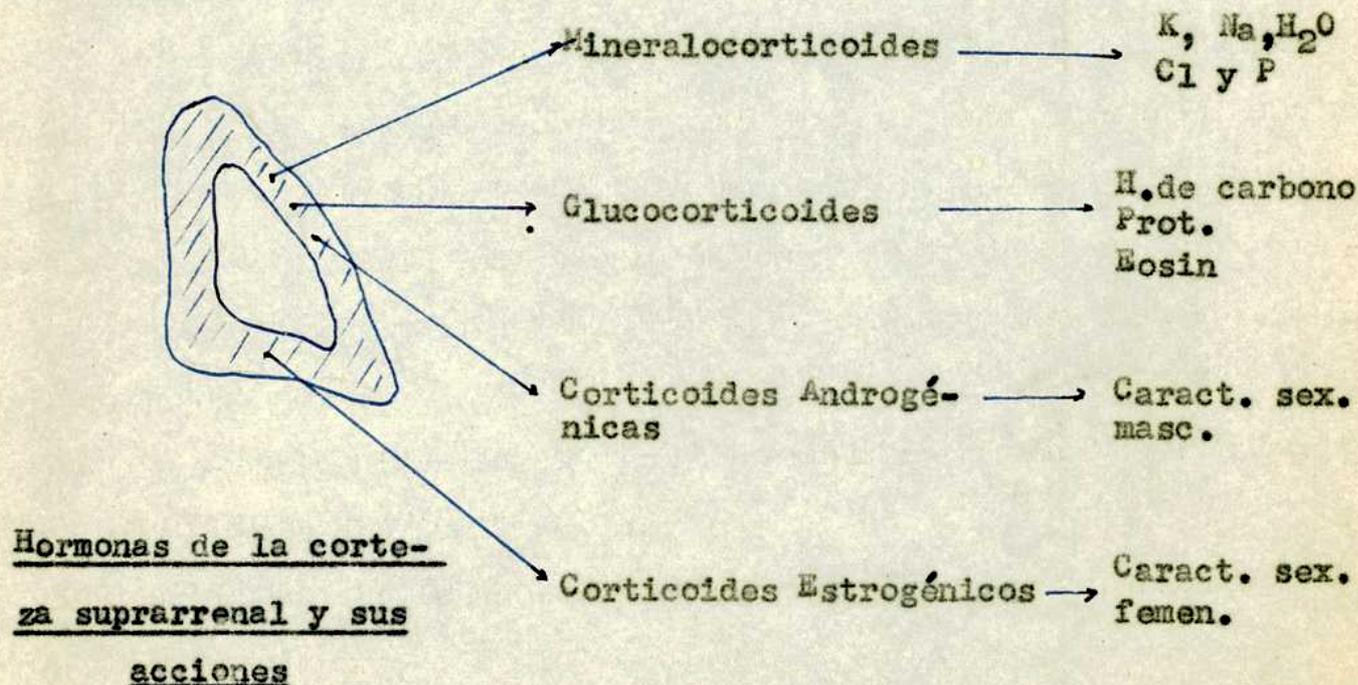
Corroboran estos hechos la presencia de sustancias androgé-

nicas y estrogénicas en el extracto suprarrenal; se aisló la adrenos-
terona en suprarrenales de vacunos (Reichstein 1936), la estrona
(Beall 1939) y progesterona (Beall 1938).

Además se comprobó la eliminación urinaria de estrógenos
en mujeres castradas (Frank 1936).

V) Actividades varias:

Se incluyen entre ellas efectos nerviosos, fenómenos de a-
daptación, capacidad funcional del músculo, crecimiento, presión arte-
rial, sanguíneos (efectos sobre los eosinófilos (Thorn, 1952), permea-
bilidad capilar, metabolismo pigmentario etc.



La diferenciación no es estricta pues algunas hormonas que
tienen acción sobre la retención del ión Na ó Cl, a su vez no la tie-
nen sobre los hidratos de carbono, como lo demuestra el siguiente cua-
dro:

Efectos cuantitativos aproximados de los principios activos
conocidos de la corteza suprarrenal (Ingle 1950)

El valor 1 es mínima y el 5 máxima actividad

	Mantenimiento de la vida (Rata)	Función Renal (Perro)	Metabolismo Electro- litos (Perro)	Trabajo Muscular (Rata)	Glucógeno (Hígado Rata)	Acción Diabético- gona (Rata)
Corticosterona	1-2	2	1-2	3	3	3-4
Dehidrocorticosterona	1-2	2	1-2	2	2	3-4
Dehidro-17 hidroxicorticosterona	2	1	?	4	4	5
Hidroxicorticosterona	2	1	?	5	5	5
Desoxicorticosterona	4	4	5	1	1	1
acción Amorfa	♦ 5	♦ 5	?	1-2	1	?

En dicho cuadro no se incluye la aldosterona recientemente descubierta, y cuya acción es principalmente en el metabolismo de los electrolitos.

Relación con otras glándulas de secreción interna

La fisiología de la corteza suprarrenal está íntimamente relacionada con el lóbulo anterior de la hipófisis, tal que la destrucción de éste provoca una atrofia en la corteza.

Lo mismo puede decirse en el caso de la hiper función hipofisiario que provoca una hipertrofia de la corteza.

En cuanto a la relación entre las glándulas sexuales y la corteza debe suponerse una acción muy estrecha debido a la similitud en los síntomas del síndrome de virilización producido ya sea ^{por} tumores intersticiales de los testículos, por el anenoblastoma de los ovarios y la hiper función suprarrenal.

Además la corteza suprarrenal está estrechamente vinculada a la glándula tiroides y paratiroides.

CAPITULO II

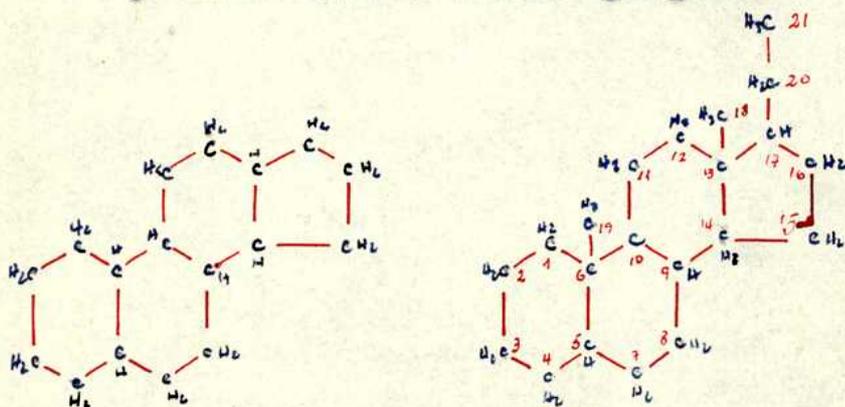
QUIMICA DE LAS HORMONAS DE LA CORTEZA SUPRARENAL

Los primeros extractos de corticoides suprarrenales fueron obtenidos por Stewart y Hogoff, (1928); Hartsen y colaboradores, (1928) y Swingle y Pfiffner (1930).

Dicho extracto está formado por una parte cristalizable 10-15 % y una fracción amorfa 85-90 % (*).

La fracción cristalina comprende hasta el presente 38 compuestos (Haines, 1952); de los cuales 7 tienen actividad fisiológica definida.

Dichos corticoides contienen el ciclo pentano perhidrofenantreno y son derivados del alo pregnano



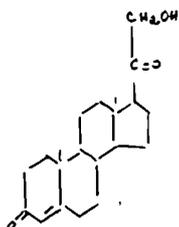
Ciclo perhidropentano-fenantreno

alo-pregnano

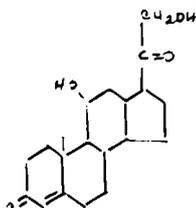
El primero de los compuestos de actividad fisiológica aislado fué la corticosterona (Reichstein 1937) y las fórmulas y nomenclatura de los siete compuestos con acción biológica conocida son:

(*) Los porcentajes de la fracción amorfa probablemente sufren alguna modificación debido al descubrimiento de la Aldosterona (Simpson 1953).

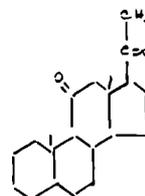
CUADRO Nº II



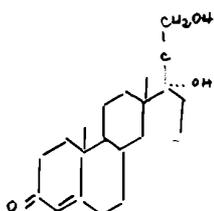
**Desoxicorticosterona
(Reichstein Q)**



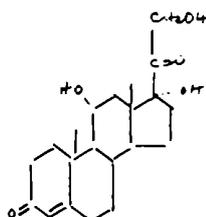
**Corticosterona
(Kendall B)**



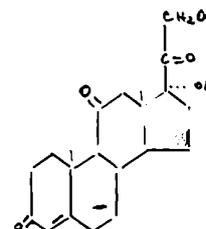
**11-Dehidrocorticosterona
(Kendall A)**



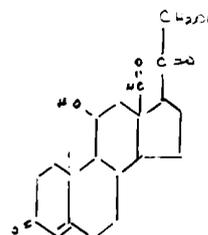
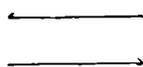
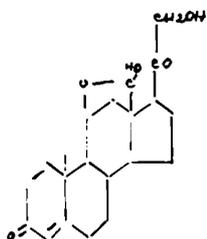
**17Hidroxi-11 Desoxi-
corticosterona
(Reichstein S)**



**17Hidroxi-corti-
costerona
(Kendall F)
(Hidrocortisona)**



**17Hidroxi-11Dehidro-
corticosterona
(Kendall E)
(Cortisona)**



Aldosterona

(Simpson 1954)

Grupos químicos y actividad fisiológica

La presencia de un oxígeno en el C₁₁ o la introducción en dicho carbono de un HO en posición β , da origen a compuestos con ac-

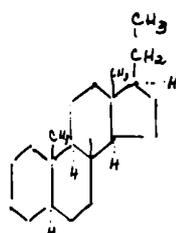
ción sobre los hidratos de carbono (Thorn, 1949), retrasan la fatiga muscular (Ingle, 1949), aumentan el catabolismo proteico (Long 1942).

La eliminación del oxígeno o del oxhidrilo del C_{11} hace desaparecer la acción sobre los hidratos de carbono pero actúan en el metabolismo de los electrolitos (Ej: 11 desoxicorticosterona).

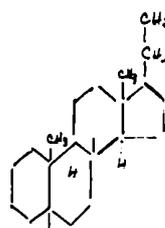
La introducción de un oxhidrilo en el carbono 17 (posición α) favorece la acción sobre los hidratos de carbono, pero los electrolitos tienen acciones algo antagónica a los compuestos que carecen de oxígeno en el C_{11} , Thorn (1951).

Estereoisomería de corticoides

La diferencia entre el pregnano y el alo pregnano es la siguiente



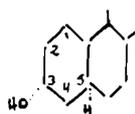
Allo-pregnano



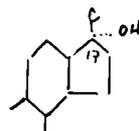
Pregnano

La diferencia corresponde a la posición del hidrógeno del C_5 .

Posiciones α

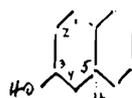


α en C_3

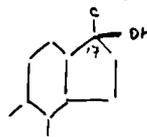


α en C_{17}

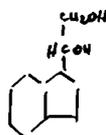
Posiciones β



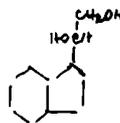
β en C_3



β en C_{17}



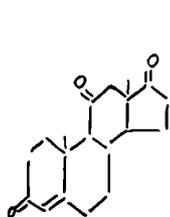
α en C₂₀



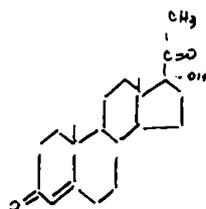
β en C₂₀

Compuestos cuya actividad fisiológica se desconoce (en LA SU *prorencia*)

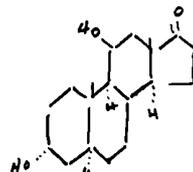
Existe un grupo de esteroides, aislados en la corteza suprarrenal acción sexual androgénica y estrogénica y entre ellas tenemos:



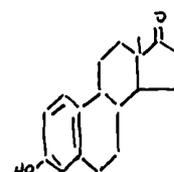
Adrenosterona



17hidroxiprogesterona



11hidroxianandrosterona



estrona

y además la progesterona

(1).

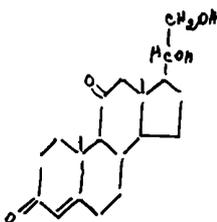
que

En cuanto a los corticoides androgénicos puede decirse dichas hormonas (androsterona, hidroxilandrosterona y la hidroxiprogesterona) aumentan en los casos de hiperfunción cortical y ejercen una acción virilizante.

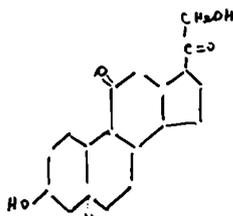
El papel fisiológico de la estrona y progesterona no es conocido.

Otros compuestos cuya actividad biológica se desconoce:

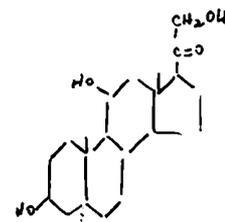
CUADRO NO III (Fieser, 1949)



Reichstein I

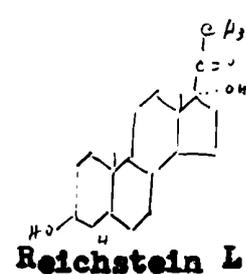
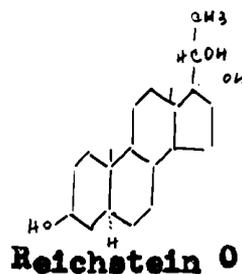
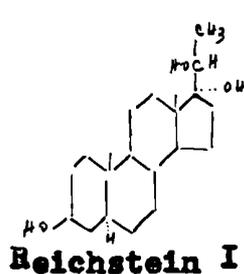
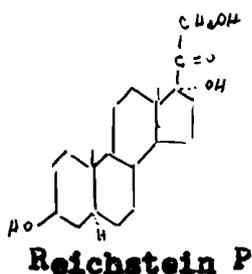
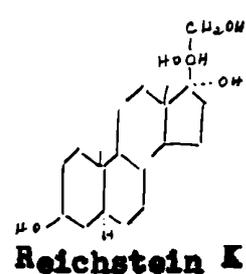
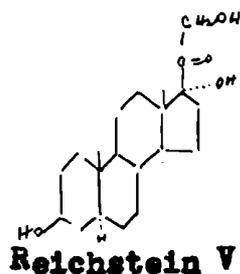
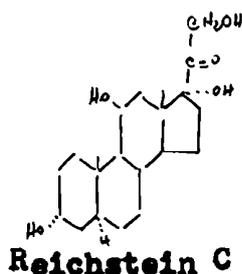
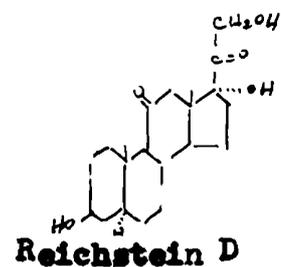
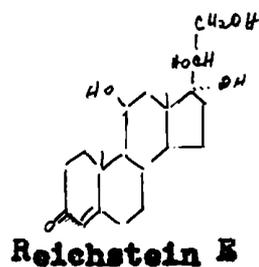
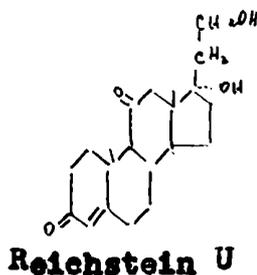


Reichstein II



Reichstein III

(1) La desoxicorticosterona tiene una leve acción estrogénica como lo ha demostrado Salmán 1939.



Dichas sustancias corresponden a las siguientes designaciones químicas.

- | | |
|--------------|--|
| Reichstein T | alopregnane 20 α 21 diol 3-11 dione |
| Reichstein N | alopregnane 3 β 21 diol 11-20 dione |
| Reichstein R | alopregnane 3 β 11 β 21 triol 20 one |
| Reichstein U | alopregnane 17 α 21 diol 3,11 dione |
| Reichstein E | alopregnane 11 β 20 β 21 triol 3-one |

Reichstein D	alopregnane 3 β 17 α 21 triol 11-2 ⁰ dione
Reichstein C	alopregnane 3 α 11 β 17 α 21 tetrol 2 ⁰ one
Reichstein V	alopregnane 3 β 11 β 17 α 21 tetrol 2 ⁰ one
Reichstein A	alopregnane 3 β 11 β 17 α 2 ⁰ β 21 pentol
Reichstein K	alopregnane 3 β 17 α 2 ⁰ β 21 tetrol
Reichstein P	alopregnane 3 β 17 α 21 triol 2 ⁰ one
Reichstein J	alopregnane 3 β 17 α 2 ⁰ β triol
Reichstein O	alopregnane 3 β 17 α 2 ⁰ β triol
Reichstein L	alopregnane 3 β 17 α diol 2 ⁰ one

Excreción urinaria de los corticoides

Las hormonas de la corteza suprarrenal son, en su gran mayoría inactivadas por el hígado y pierden así su actividad biológica, pero una parte conserva la actividad propia de los corticoides, es decir que dichos extractos son capaces de mantener la vida en animales suprarreno privo y además de tener actividad sobre el metabolismo hidrocarbonado, o sea son gluco-corticoides (con oxígeno en el C₁₁).

Según Venning el aumento de la eliminación se debe principalmente a) operaciones, frío, hemorragia b) enfermedad de Cushing c) en el embarazo y la disminución en la a) enfermedad de Addison b) Insuficiencia hipofisiaria (Venning, 1946).

La mayoría de estas hormonas son eliminadas como metabolitos al estado de glucuronatos de sodio y la hormona correspondiente (Cuyler, 1940), además se eliminan bajo formas de ésteres del SO₄H₂, tanto las formas α que no precipitan con digitonina, como las formas β que sí lo hacen (Berblinger, 1935).

Además de estos ésteres de hormonas es eliminada la "frac-

ción amorfa" con actividad biológica y cuyos componentes se cree están relacionados con la corticosterona (Pfiffner, 1942).

CAPITULO III

LOS CORTICOIDES Y LOS 17 CETOESTEROIDES, SU RELACION

Se definen los 17 cetoesteroides como esteroides que tienen por núcleo el ciclo pentafenantreno y poseen una función cetónica en el Carbono 17.

Pueden clasificarse en activos e inactivos según la capacidad de desarrollar la cresta en gallos castrados (Callow, 1938).

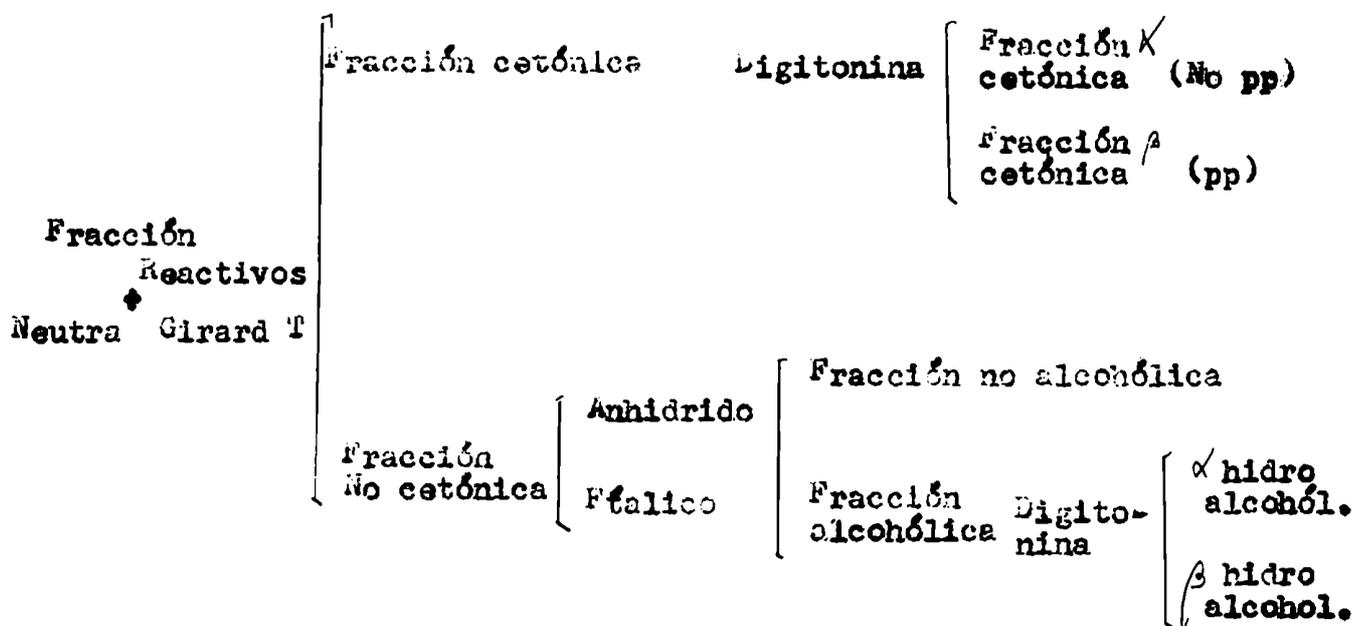
Cuando se hace la hidrólisis ácida en la orina y luego se extrae con cloroformo, como en el presente trabajo, el extracto contiene las siguientes fracciones.

- | | |
|----------------|----------------------|
| | 1) Fracción ácida |
| Extracto total | 2) Fracción neutra |
| | 3) Fracción fenólica |

La fracción ácida probablemente contenga el grupo $-COOH$ y sean derivados del ácido cólico, la fracción fenólica son estrógenos y sustancias que contienen el grupo oxhidrilo fenólico; ambas fracciones son eliminadas con solución de $HONa$.

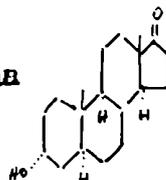
A su vez la fracción neutra contiene sustancias androgénicas es decir 17 cetoesteroides cuyo origen puede ser cortical en su gran parte y gonadal.

La fracción neutra puede ser fraccionada de la siguiente manera (Dobriner, 1948).

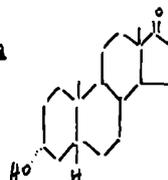


De la fracción total neutra se han aislado cuatro 17-ceto esteroides, en orina y ellos son:

1ª) alfa 17 cetoesteroides: androsterona



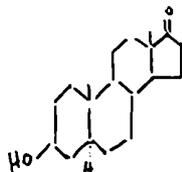
y el etiocolane 3 (alfa) al 17 Ona



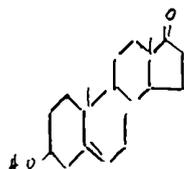
El primero es francamente androgénico, pero el segundo es biológicamente inactivo.

Se considera que en el hombre dichos compuestos se originan en el testículo y en la corteza suprarrenal, pero en la mujer solamente en la corteza suprarrenal (Callow, 1939).

2ª) Las formas beta de 17-cetoesteroides comprenden: isoandrosterona



y la dehidroisandrosterona



Se supone que estas 2 últimas solamente corresponden a un 7% del total y proceden únicamente de la corteza suprarrenal (Talbot, 1940).

Todos estos compuestos son excretados bajo formas de ésteres del ácido sulfúrico (Venning, 1943).

Los miligramos eliminados en el hombre normal, diariamente oscilan entre 13-17 mg y en la mujer 8-12 mg (Fraser, 1941).

Hay aumentos de 17 cetoesteroides en hiperplasia e hipertrofia de la corteza suprarrenal, en el climaterio y durante la gestación, disminuye en la hipofunción, enfermedad de Addison y enfermedad de Simmonds, enfermedades infecciosas (Repetto y Pandolfo 1947).

A los 17 cetoesteroides se los considera productos metabólicos, probablemente derivados de las hormonas de la corteza suprarrenal (Dorfman 1943) y que hasta el presente no han sido aislados en el tejido cortical.

DETERMINACIONES QUÍMICAS DE CORTICOIDES

Introducción al estudio experimental

En el presente trabajo las determinaciones químicas comprenden: A) determinación en orina de sustancias consideradas como 11-oxi-corticoides termolábiles (Corcoran, 1948). B) determinación en orina de sustancias consideradas como corticoides termoestables (Tompsett, 1953). C) determinación en orina de sustancias consideradas como 17-hidroxycorticoides (Glenn y Nelson, 1953).

En cuanto a las dos primeras técnicas la estructura requerida del corticoide es que la cadena lateral sea -COCH₂OH para producir "formaldehído" por oxidación con ácido periódico y valoración por colorimetría.

En cambio la determinación de 17 hidroxycorticoides se basa en la reacción colorimétrica de Silver y Porter (1950) con fenilhidrazina C₁H.

Existen además otras técnicas con reacciones químicas, propiedades físicas y fenómenos fisiológicos.

Métodos químicos

La eliminación urinaria de corticoides se hace bajo la forma combinada de sulfatos y glucuronatos de corticoides, por lo tanto para las determinaciones es necesario hidrolizar previamente, dicha hidrólisis puede ser ácida, alcalina o enzimática.

La hidrólisis alcalina da valores bajos (Tompsett, 1953), la hidrólisis enzimática realizada con β glucuronidasa ha sido estudiada por Glenn y Nelson (1953), y los valores son en general superiores a los obtenidos con hidrólisis ácida.

En cuanto a esta última hidrólisis se trata de comparar la acción hidrolítica en frío y en caliente, cuyas conclusiones se exponen al final del trabajo.

Se ha encontrado que la capacidad de la desoxicorticosterona y de la corticosterona para producir cantidades teóricas de formaldehído cuando es tratada con ácido periódico, es inalterada por previo tratamiento con altas diluciones, de ácidos minerales.

En cambio la capacidad de la cortisona para reaccionar con ácido periódico y producir formaldehído es reducida a cantidades despreciables por tal tratamiento.

El método de valoración de sustancias consideradas como corticoides termoestables está estrechamente vinculado a la determinación de metabolitos considerados como corticosterona y desoxicorticosterona.

Metabolitos relativos a la cortisona y 17 hidroxicorticoides no están incluidos.

La cadena lateral $\begin{matrix} \text{H} & \text{O} \\ | & || \\ \text{C} & - \text{C} - \text{CH}_2\text{OH} \end{matrix}$, tal como se halla en la corticosterona y en la desoxicorticosterona es estable a la acción de los ácidos minerales, en caliente. Compuestos con cadena lateral $\begin{matrix} & & \text{OH} \\ & & | \\ \text{C} & - \text{C} - \text{COH} \\ & & | \\ & & \text{OH} \end{matrix}$ podrían encontrarse y ser también estables. Compuestos con cadena lateral $\begin{matrix} \text{OH} \\ | \\ \text{C} - \text{COCH}_2\text{OH} \\ | \\ \text{H} \end{matrix}$, es decir con un oxhidrilo en el C₁₇, tal como se encuentra en la 17 hidroxil-11 dehidrocorticosterona (cortisona), carecen prácticamente de capacidad para producir formaldehído, por previo tratamiento con ácidos minerales.

Las técnicas que utilizan el ácido molíbdico con producción de sustancias reductoras dan, en general valores altos y poco constantes.

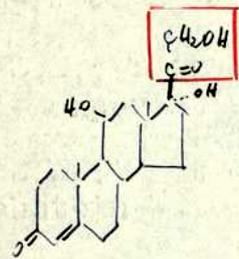
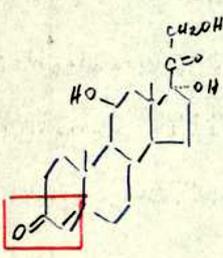
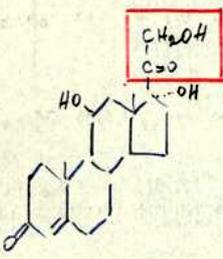
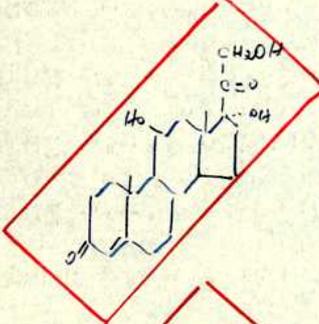
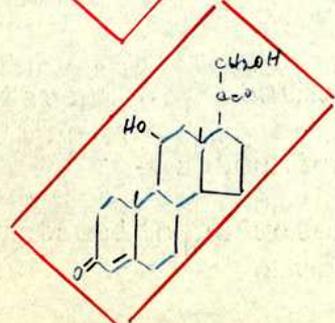
Con respecto a los métodos que utilizan propiedades físicas tenemos: a) valoraciones espectrofotométricas por absorción en el

en el ultravioleta ($240 \pm 2 \text{ m}$); b) valoración basada en el poder rotatorio; c) determinaciones por absorción infrarroja (Haines, 1952).

Resumiendo:

Estructura química requerida

Técnica

- | | | |
|----|---|---|
| 1) |  | 1) $\begin{matrix} \text{H}_2 \\ \\ \text{CO} \end{matrix}$ por oxidación con IO_4H |
| 2) |  | 2) Absorción ultravioleta (Mason 1948) y (Schneider 1950) |
| 3) |  | 3) Por formación de compuestos de reducción del "molibdeno azul" |
| 4) |  | 4) Rotación óptica (Haines, 1952) |
| 5) |  | 5) Absorción infrarroja (Haines, 1952) |

Determinación de sustancias consideradas como corticoides termolábiles en orinas de embarazos normales y patológicos. Corcoran, 1948

Método

Se recoge la orina de 24 horas, se le agrega como conservador 5 cc de cloroformo o 1 cc de mertiolato acuoso 1 %.

Sobre 200 cm³ se lleva pH = 1 con ácido clorhídrico conc.

Se extrae 4 veces con porciones de 50 cc de cloroformo, se agita cada vez durante 15 minutos, se centrifuga para deshacer la emulsión. Se seca por agregado de sulfato de sodio anhidro, se filtra el sobrenadante con lana de vidrio.

Se lava 2 veces con solución 0.1 N. de hidróxido de sodio con relación de volumen 0.1 y 1 vez con agua destilada. Cada lavado se reextrae con un volumen igual de cloroformo. Estos extractos se agregan al extracto cloroformico lavado y se desecan al hidróxido y el agua.

Se evapora a temperatura menor de 50° C, al vacío hasta 10 cc. Se separa en esta solución dos partes iguales y ambas fracciones se evaporan a sequedad.

Colorimetría

1°) Muestra oxidada

Disolver el residuo de uno de los dos frascos en 0.5 cc de ácido acético glacial y humedecer cuidadosamente todo el residuo.

Agregar 8,5 cc de agua y luego 0.5 de solución de ácido periódico.

Dejar a temperatura ambiente 30 minutos. Detener la oxidación con 0.5 cc de solución de cloruro estannoso.

2^a) Muestra no oxidada

A la otra de las mitades en que ha sido fraccionado el extracto se le agrega igual que antes 0.5 cc de ácido acético y agua hasta 9 cc.

Se agrega 0.5 cc de solución de cloruro estannoso y enseguida 0.5 cc de ácido periódico.

3^a) Blanco de reactivos

Se realiza un blanco de reactivos oxidados y no oxidados preparándose con las mismas cantidades ya citadas.

Se conecta el balón con las mezclas anteriores a un aparato de destilación.

El tubo condensador llega debajo del menisco de un cc. de agua en tubo graduado cónico de 10 cc.

Se recoge 8 cc del destilado.

Se toman 3 cc del destilado y se agregan 5 cc de solución de ácido cromotrópico. Se coloca a baño maría hirviendo por 30 minutos. Se enfría rápidamente a 25^a C y se lleva a volumen de 10 cc con ácido sulfúrico 9 M y estabilizado a 25^a C. en baño de agua.

Cálculo:

La densidad de color debido al formaldehído liberado de la muestra no oxidada se sustrae a la densidad de color de la muestra oxidada y se compara con la densidad del color del blanco (testigo).

La cantidad presente de sustancias corticoides en el extracto urinario se refiere a una curva de calibración preparada por oxidación y colorimetría de 11 Dehidrocorticosterona (Kendall &) (Lowenstein 1946).

Se hacen las valoraciones en el fotómetro de Pulfrich (filtro nº 6, λ 570).

$$\frac{\text{Absorción gráfica } N^{\circ} 1 \times \text{diuresis}}{100} = \text{mg/24 hs.}$$

Reactivos

Cloroformo puro

ácido acético glacial

Hidróxido de sodio 0.1 N

Reactivo ácido periódico: periodato de potasio 0.03 M en $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 0.25 N.

Reactivo cloruro estannoso (preparar fresco) 1.4 gr SnCl_2 en 50 cc de HCl 2.5 N. Se valora con solución de almidón tal que 10.2 cc 10.4 N oxide a 10 cc de Cl_2 en 2.

Reactivo ácido cromotrópico. 0.2 gr. de ácido cromotrópico se disuelven en 4 cc de agua, y se lleva a volumen de 100 ml con ácido sulfúrico 13 N.

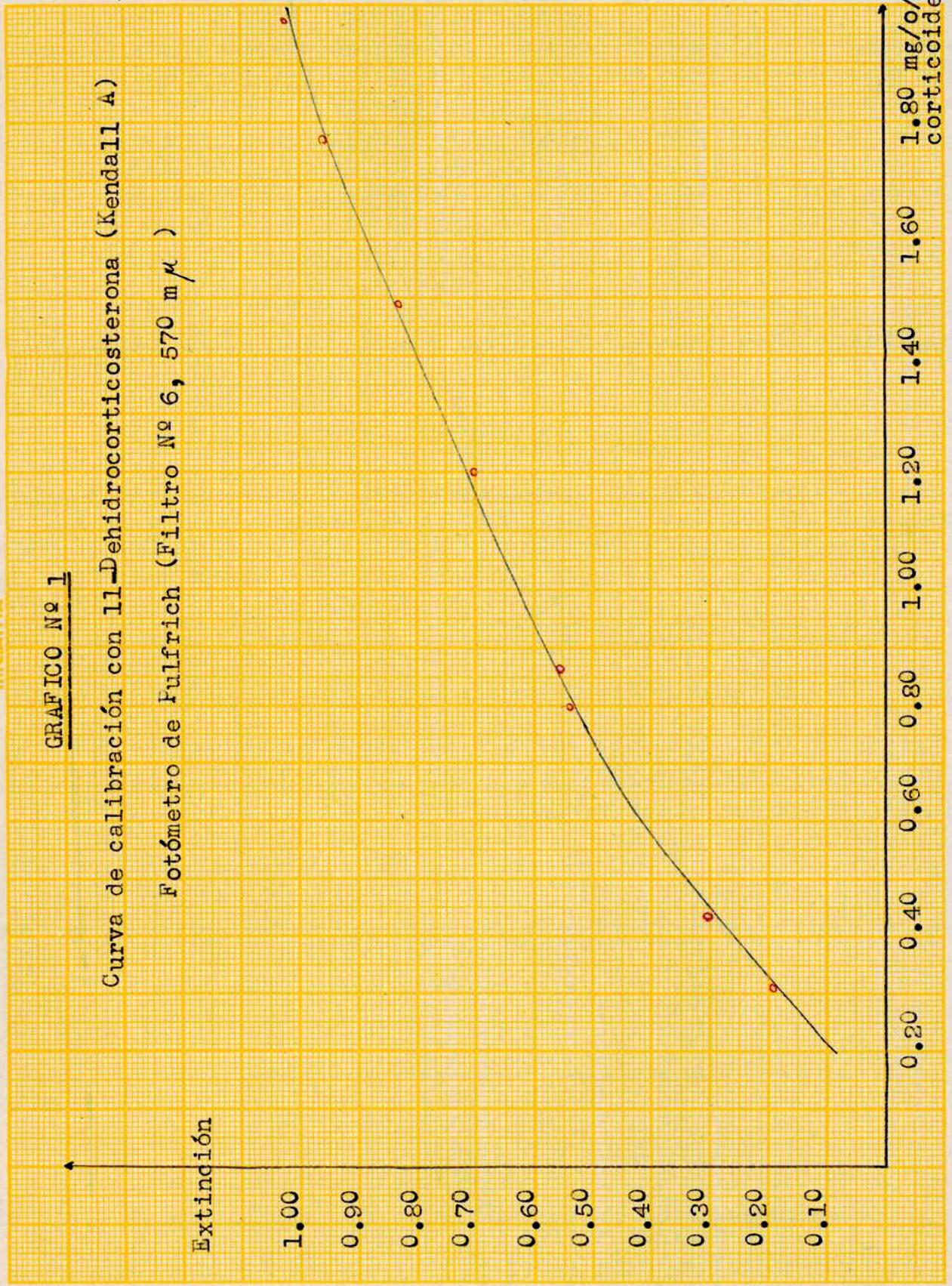
solución de ácido sulfúrico 9 N.

INICIATIVA

GRAFICO Nº 1

Curva de calibración con 11-Dehidrocorticoesterona (Kendall A)

Fotómetro de Fulfrich (Filtro Nº 6, 570 m μ)



Valoraciones obtenidas en tres casos de embarazos normales a través de toda la gestación; y algunos casos patológicos y normales de sustancias consideradas como 11- oxicorticosteroides termolábiles
(Corcoran, 1948) en orina

Caso Nº 1: T .P.G.

<u>Días de embarazo</u>	<u>Diuresis</u>	<u>Extinción</u> (Fotómetro Pulfrich)	mg/24 hs.
60	1180 cc	0.21	0.726
92	1050 cc	0.23	0.735
125	1200 cc	0.23	0.840
148	1500 cc	0.38	1.65
180	1500 cc	0.24	1.11
200	960 cc	0.26	0.760
223	1500 cc	0.20	0.93
236	1150 cc	0.21	0.78
257	1650 cc	0.10	0.672
parto 262 días			
25 días pos- terior	1350 cc	0.16 (200 cc orina)	0.420

Caso Nº 2 I.Z.

30	1300	0.13	0.57
50	1020	0.15	0.50
85	980	0.17	0.593
115	1400	0.22	0.98
150	1050	0.36	1.15

<u>Días de embarazo</u>	<u>Diuresis</u>	<u>Extinción</u>	<u>mg/24 hs.</u>
182	1500	0.40	1.82
220	1200	0.36	1.18
258	950	0.28	0.798

Parto: 275 días

Caso Nº 3 G.M.

70	1200	0.09	0.504
100	1350	0.20	1.08
130	1500	0.18	0.9
185	1150	0.43	1.51
220	1080	0.36	1.16
248	980	0.23	0.71

Parto: 268 días

OTROS CASOS

Nº 4 Emb. 225 días 1250 cc 0.24 0.900

Nº 5

Esterilidad 8 años Emb	180d 1050 cc	0.31	0.945
Trat. hormonal (progesterona y Estro)	210d 1280 cc	0.36	1.54

Nº 6 Emb. 198 días 1680 0.26 1.34
(Abortos naturales)

Nº 7 Emb. 160 días 1710 0.23 1.20
(Partos prematuros)

		<u>Diuresis</u>	<u>Excreción</u>	<u>mg/24 hs.</u>
Nº 8	Emb. 235 días (7 días antes parto)	1615	0.22	0.58
Nº 9	Prob. Cushing	800	0.43	1.040
Nº 10	Emb. 60 días	845	0.09	0.39
Nº 11	Caso normal inter- mestrua	1900	0.09	0.44 (200 de/de orina)
Nº 12	Caso normal inter- mestrua	1300	0.16	0.37
Nº 13	Caso normal inter- mestrua	950	0.30	0.42
Nº 14	Caso normal inter- mestrua	1250	0.32	0.57

B)

Determinación en orina de sustancias, consideradas como corti-
coides termoestables, en embarazos normales y patológicos
y otros casos (Tompsett, 1953)

Método: Hidrólisis y extracción

De la diuresis total se toman 100 ml y se le agregan 20 ml de ácido clorhídrico conc., se calienta a ebullición bajo condensador a reflujo, durante 10 minutos.

Luego se extrae 3 veces con 50 ml de cloroformo, dicho extracto se lava 1 vez con 50 ml de hidróxido de sodio N 1 y 2 veces con 50 ml de agua.

El extracto clorofórmico es deshidratado con sulfato de sodio anhidro y evaporado a seco.

Tratamiento con ácido periódico

El extracto seco se disuelve en un ml de alcohol absoluto. Esta solución es transferida cuantitativamente a un balón de destilación, lavando con agua hasta completar el volumen a 10 ml.

Luego se agrega 5 ml de solución de ácido periódico y 0.5 ml de ácido sulfúrico conc.

el destilado

La mezcla se calienta y se recoge en un tubo cónico conteniendo 1 % de solución de sulfito de sodio, se completa hasta 10 ml.

Un blanco se hace simultáneamente.

Determinación colorimétrica del formaldehído

Se toma 2 ml del destilado, 2 ml de agua destilada y 5 ml de ácido cromotrópico. Se mezcla y se pone en baño maría 1 hora, se

enfria y se completa a 10 ml con ácido sulfúrico 9 M.

Simultáneamente se hace lo mismo con el blanco.

Curva de calibración

Se calibra el fotómetro de Pulfrich con el mismo tratamiento con 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 mg de acetato de desoxicorticosterona.

Reactivos :

Cloroformo puro

Alcohol etílico absoluto

Acido sulfúrico puro

Hidróxido de sodio 0.1 N

Solución de ácido sulfúrico 9 M

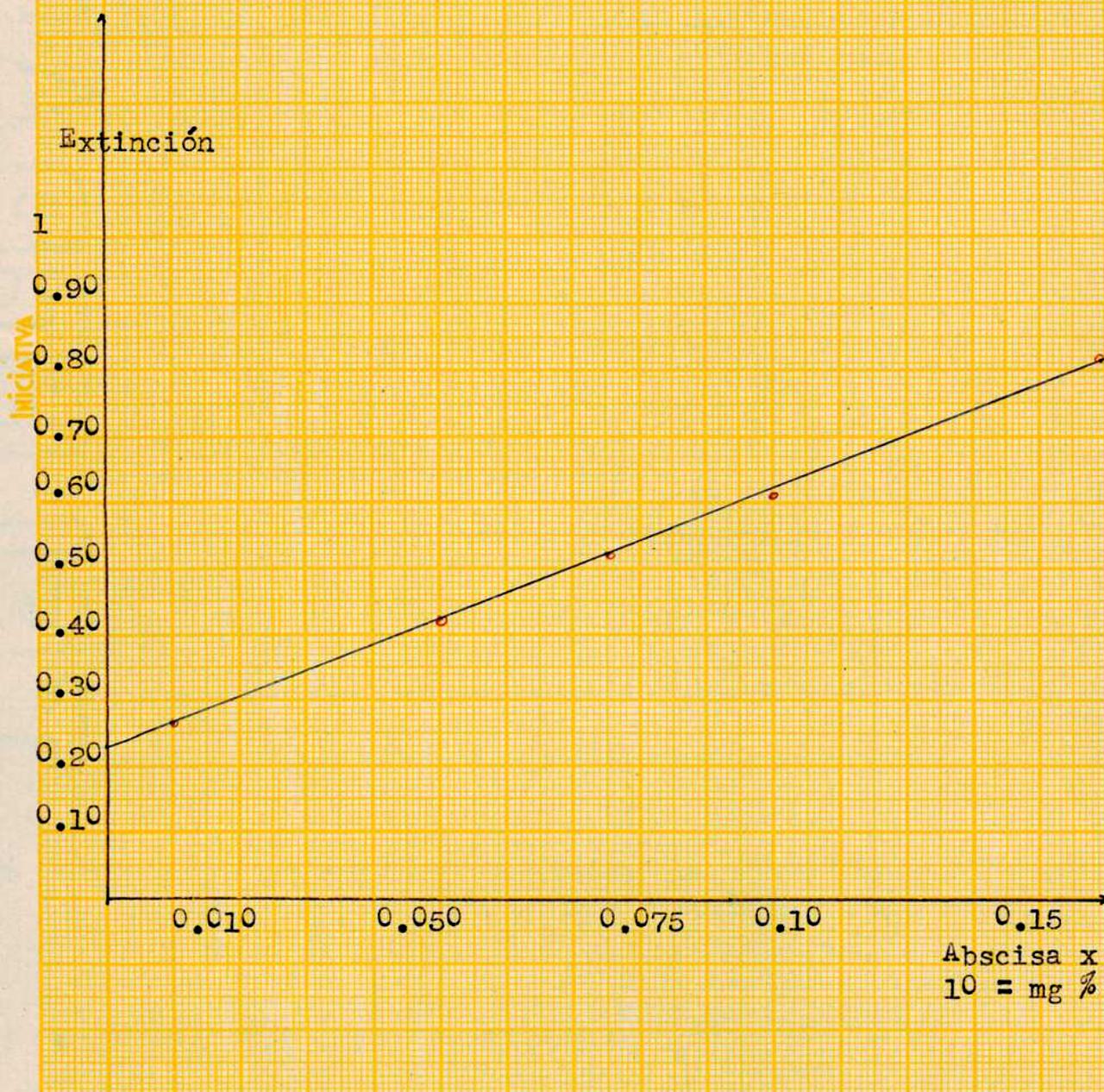
Acido periódico: periodato de potasio 0.01 M en 0.15 M de ácido sulfúrico.

Acido cromotrópico: Es preparado fresco, 0.2 gr de ácido cromotrópico es disuelto en 2 ml de agua y 48 ml de ácido sulfúrico 13 M.

GRAFICO N° 2

Curva de calibración con acetato de Desoxicortico-
sterona (Reichstein Q)

Fotómetro de Pulfrich (Filtro N° 6, 570 m μ)



Valoraciones obtenidas en orina, en tres casos de embarazos normales a través de toda la gestación; y algunos casos patológicos y normales de sustancias consideradas como corticoides termolabiles (Tempsett 1953)

Caso N° 1: T.P.G.

<u>Días de embarazo</u>	<u>Diuresis</u>	<u>Extinción</u> (Fotómetro Fulfrich)	<u>mg/24 hs.</u>
60	1180 cc	0.30	1,1
92	1050 "	0.45	2,2
125	1200 "	0.38	2,04
148	1500 "	0.30	1,5
180	1500 "	0.40	2,64
200	960 "	0.38	1,92
223	1800 "	0.27	1,12
236	1150 "	0.28	0,69
257	1650 "	0.28	1,2
parte 262 días			
25 días pos- parto	1350 "	0.27	0,97

Caso N° 2: I. Z.

30	1300	0.28	0,87
50	1020	0.30	1,00
85	980	0.38	1,62
115	1400	0.30	1,38

<u>Días de embarazo</u>	<u>Diuresis</u>	<u>Extinción</u> (Fotómetro Pulfrich)	<u>ng/24 hs</u>
182	1500	0,40	3,37
220	1200	0,35	2,04
255	950	0,27	0,75
parto 275 días			

Caso Nº 3: G.M.

70	1200	0,26	0,72
100	1350	0,31	1,5
130	1500	0,25	0,75
185	1150	0,56	3,36
220	1080	0,40	2,35
245	980	0,30	0,99
parto 255 días			

OTROS CASOS

Nº 4 emb. 225 días		1250	0,41	3,0
Nº 5				
Esterilidad 8 años	180 d	1050	0,40	2,36
Trat. hormonal (progesterona y Estro.)	Emb. 210 d	1250	0,43	3,12
Nº 6 Emb. 198 días (Abortos naturales)		1680	0,27	1,26
Nº 7 Emb. 160 días (Partos prematuros)		1710	0,30	1,71

		<u>Diuresis</u>	<u>Extinción</u>	<u>mg/24 hs.</u>
Nº 8	Emb. 235 días (7 días antes parto)	1615	0.40	3,70
Nº 9	Prob. Cushing	800	0.59	3,76
Nº 10	Emb. 60 días	845	0.29	0,80
Nº 11	Caso normal inter- mestrua	1900	0.24	0,95
Nº 12	Caso normal inter- mestrua	1300	0.30	1,3
Nº 13	Caso normal inter- mestrua	950	0.32	1,14
Nº 14	Caso normal inter- mestrua	1250	0.28	0,9

C - Determinación en orina de sustancias consideradas como 17 hidrocorticoides, mediante la hidrólisis ácida (Glenn y Nelson, 1953)

Método:

Se recoge la orina de 24 horas, se toma una parte alícuota de 30 ml, se ajusta a pH 1 con 0,3 ml de ácido sulfúrico conc., se deja hidrolizar 24 horas a temperatura ambiente, se extrae 3 veces con 10 cc de cloroformo, la emulsión se elimina por centrifugación.

El extracto es lavado 2 veces con 5 ml de 0,1 N de hidróxido de sodio y una vez con 5 ml de 0,1 N de ácido clorhídrico. Los lavados son reextraídos con cloroformo.

Al extracto cloroformico se le agregan 3 grs de sulfato de sodio anhidro y se filtra a través de papel Whatmann N° 1, el sulfato de sodio es lavado con 5 ml de cloroformo y agregado al extracto.

El cloroformo es evaporado a una temperatura que no sea superior a 50° C.

El extracto seco es disuelto en 5 ml de cloroformo y cromatografiado con florisil (Nelson y Samuels, 1953).

Técnica cromatográfica

A una columna de vidrio de 11 mm de diámetro se agrega lana de vidrio, luego 1,5 gr de florisil y se ajusta con otra porción de lana de vidrio. La columna es humedecida con 5 ml de cloroformo puro y luego se agrega la solución del extracto.

La elusión se realiza de la manera siguiente:

- 1°) Con 25 ml de cloroformo puro.
- 2°) 25 ml de cloroformo y metanol al 4 %; estas fracciones contienen los 17 cetoesteroides libres y los conjugados glucoronidos de la

orina.

3^a) Luego se eluye con 45 ml de solución de metanol al 25 % en cloroformo.

Esta última fracción contiene los 17 hidrocorticoides, se evapora a seco a temperatura no superior a 45° C.

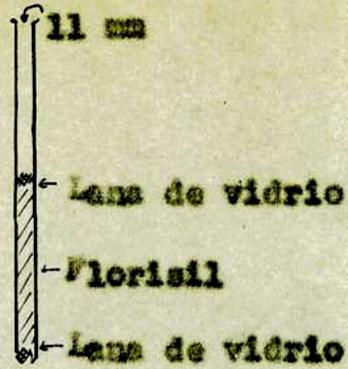
Esta fracción es disuelta en 4 ml de metanol absoluto y dividido en 2 fracciones de 2 ml; al primer tubo se le agrega 3 ml de la solución de fenilhidrazina en ácido sulfúrico 13 N, y al segundo que actúa como testigo se agrega 3 ml de solución de ácido sulfúrico 13 N.

Ambos tubos se colocan en un baño a 60° C durante 1 hora.

Luego se valora en el fotómetro Fulfrich, en filtro N° 12 correspondiente a la longitud de onda 434 m μ y se hace el cálculo mediante la comparación con el gráfico obtenido por calibración con 17 hidroxil-corticosterona (Kendall F) pura, en iguales condiciones.

Reactivos

- 1^a) Cloroformo puro redestilado sobre carbonato de potasio
- 2) Florisil, lavado con etanol absoluto, secado y llevado a 600° C durante 4 hs.
- 3) Metanol, destilado por previo tratamiento con 2-4 dinitrofenilhidrazina.
- 4) Acido sulfúrico 13 N (190 ml de agua + 810 ml de ac. sulf. puro)
- 5) Fenilhidrazina C₆H₅, recristalizado en etanol 4 veces.
- 6) Solución de fenilhidrazina- SO₄H₂; 16 mg de fenilhidrazina en 10 ml de ac. sulfúrico 13 N.
- 7) Testigo: solución de 17 hidroxil-corticosterona (hidrocortisona) en metanol, 1 mg/ml.



El cálculo de acuerdo con el gráfico N° 3 es el siguiente:

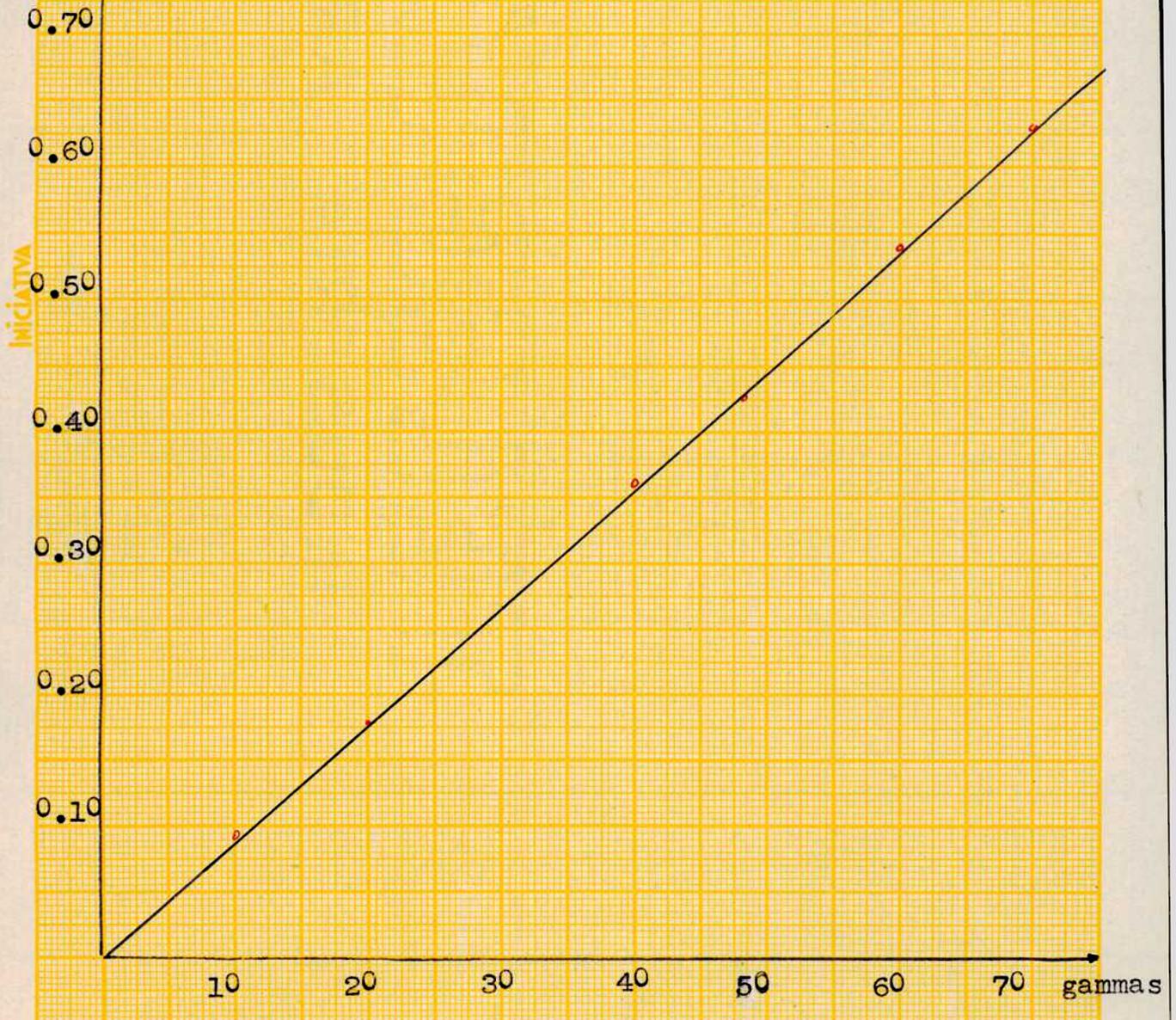
$$\frac{\text{Abcisa gráfico N° 3} \times \text{Diuresis}}{15} = \text{mg/24 hs.}$$

GRAFICO N° 3

Curva de calibración con 17 hidroxi- 11 Dehidro-
corticosterona (Kendall F)

Fotómetro de Pulfrich (Filtro N° 12, 434 m μ)

Extinción



Valoraciones obtenidas en orina, en tres casos de embarazos
normales a través de toda la gestación y algunos casos
patológicos y normales de sustancias consideradas como
17 hidrocorticoides, mediante hidrólisis ácida
(Glenn y Nelson, 1953)

Caso Nº 1: T.P.G.

<u>Días de embarazo</u>	<u>Diuresis</u>	<u>Extinción</u> (Potómetro Fulfrich)	<u>mg/24 ha.</u>
60	1180 cc	0.15	1,15
92	1050 "	0.38	3,15
125	1200 "	0.26	2,08
148	1500 "	0.34	3,80
180	1500 "	0.37	4,13
200	980 "	0.36	2,62
223	1500 "	0.26	2,95
236	1150 "	0.20	1,76
253	1650 "	0.11	1,43
parto 262 días			
25 días pos- parto	1350 "	0.17	1,53

Caso Nº 2: I.Z.

30	1300 "	0.10	1,04
50	1020 "	0.15	1,83
86	980 "	0.28	2,03
115	1400 "	0.16	1,45
150	1050 "	0.19	1,70

<u>Días de embarazo</u>	<u>Diuresis</u>	<u>Extinción</u> (Fotómetro Fulfrich)	<u>mg/24 hs.</u>
182	1500 cc	0.32	3,70
220	1200 "	0.30	2,80
255	950 "	0.26	1,98
parto 275 días			

Caso Nº 3: G. M.

70	1200 "	0.15	1,20
100	1350 "	0.25	2,52
130	1500 "	0.27	3,12
185	1150 "	0.38	3,60
220	1080 "	0.30	2,42
245	980 "	0.21	1,56
parto 255 días			

OTROS CASOS:

Nº 4

Esterilidad 8 años	180 d	1050 "	0.46	5,26
Trat.hormonal (progesterona y Estro.)	Emb. 210 d	1250 "	0.43	4,1

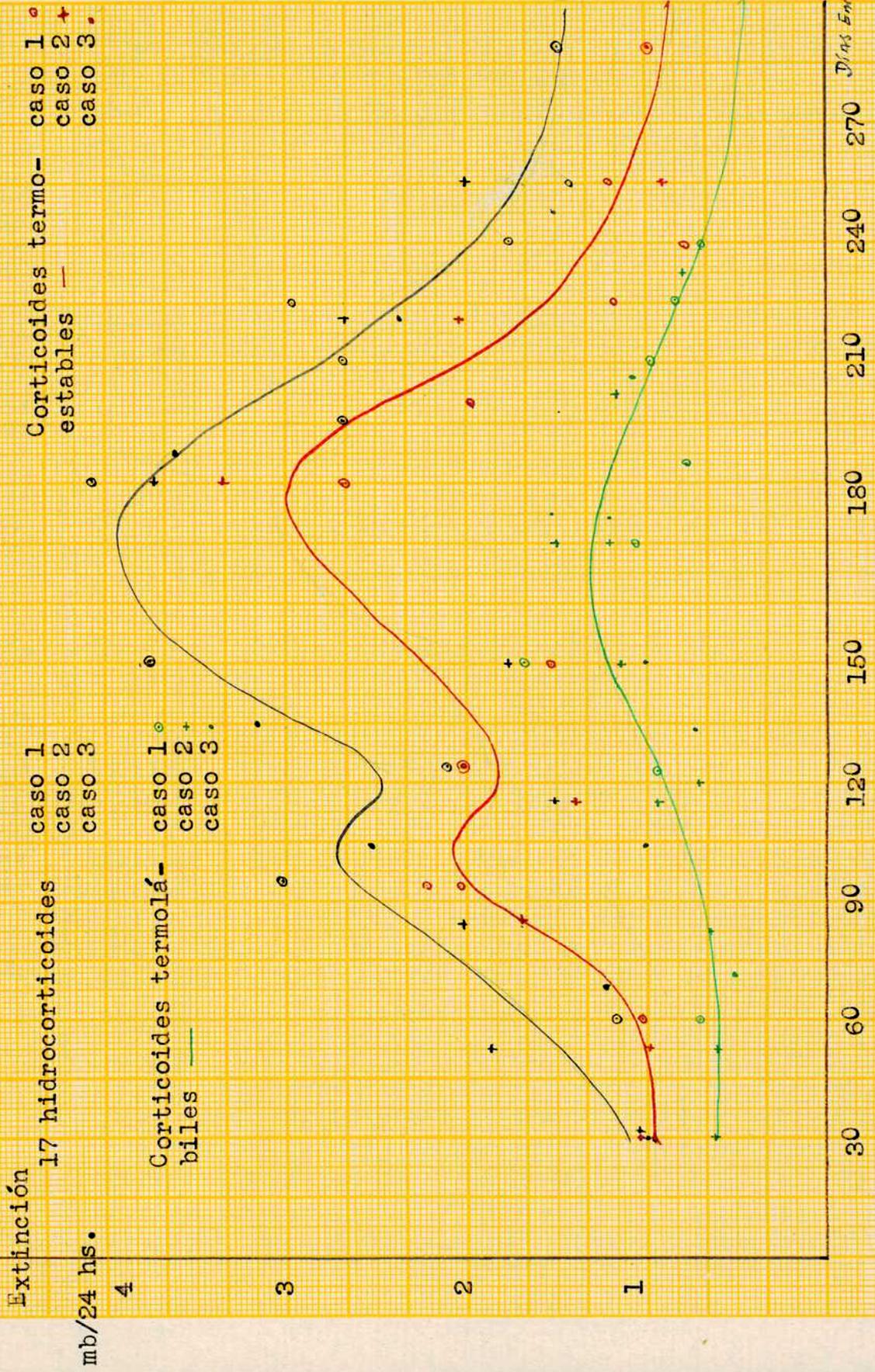
Nº 5	Emb. 160 días	1710 "	0.36	4,7
(Partos prema- turos)				

Nº 6	Emb. 235 días (7 días antes parto)	1615 "	0.15	1,8
------	---------------------------------------	--------	------	-----

		<u>Diuresis</u>	<u>Extinción</u>	<u>mg/24 hs.</u>
Nº 7	Forb. Cushing	800 cc	0,50	3,20
Nº 8	amb. 60 días	845 "	0,33	2,21
Nº 9	normal inter- mestrua	1900 "	0,07	0,88
Nº 10	normal inter- mestrua	1300 "	0,10	1,1
Nº 11	normal inter- mestrua	950	0,11	0,84
Nº 12	normal inter- mestrua	1250	0,12	1,25

INICIATIVA

GRAFICO COMPARATIVO (3 embarazos normales)



Extinción

17 hidrocorticoides

mb/24 hs.

caso 1
caso 2
caso 3

Corticoides termolábiles

caso 1
caso 2
caso 3

Corticoides normales

caso 1
caso 2
caso 3

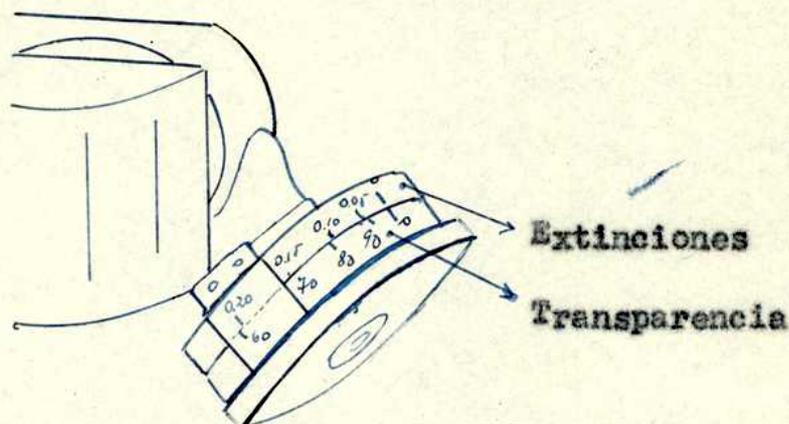
Días Embarazo

Fotómetro de Fulfrich; algunos detalles

Los fotómetros son aparatos destinados a medir comparativamente la intensidad luminosa, transmitida por una sustancia con respecto a la intensidad luminosa incidente, es decir, miden la absorción de la luz.

Algunos detalles necesarios para la realización del presente trabajo:

Se utilizó el fotómetro de la casa Carl Zeiss Jena, con dispositivo horizontal y tambor de medida con doble escala, una de ellas da la transparencia y la otra la extinción, según indica el siguiente esquema.



Entre ambas escalas existe la relación siguiente:

$$\epsilon = \lg \frac{I_0}{I_t} = \lg \frac{100}{T}$$

ϵ = extinción

I_0 = haz monocromática incidente (un espesor de 50 \AA^2)

I_t = haz transmitido

T = transparencia

Características de los filtros espectrales utilizados (Parengi, 1941)

<u>Filtro</u>	<u>Centro de gravedad del filtro util en mμ</u>	<u>Color aproximado</u>
N ^o 1 S 75	750	Rojo
" 2 S 72	729	Rojo brillante
" 3 S 66	666	Rojo brillante
" 4 S 61	619	Anaranjado
" 5 S 59	590	Anar. amarillento
" 6 S 57	572	Anar. verdoso
" 7 S 55	550	Verde
" 8 S 53	530	Verde
" 9 S 50	494	Azul
" 10 S 47	463	Azul violeta
" 11 S 45	450	Violeta
" 12 S 43	434	Violeta

CRONATOGRAFIA, CONSIDERACIONES TECNICAS

En general, definimos la cromatografía como un método físico-químico de análisis el cual permite identificar los componentes de una mezcla por el diferente grado de adsorción.

Las ventajas de este método son tales que permiten la separación de pequeñas cantidades de sustancias (en el orden de las gamas y aún de cientos de átomos como en el caso de los trazadores radiocactivos).

La aplicación de la técnica cromatográfica además de utilizarse para separar los componentes de una mezcla, sirve para comparar sustancias que se consideran idénticas, purificar sustancias, separación cuantitativa de uno de los componentes, determinación de la estructura molecular, etc.

Clasificación general de los métodos analíticos por adsorción cromatográfica

1) Métodos del cromatograma líquido:

Se basa en la extracción por lavado fraccionado de cada uno de los componentes o serie de componentes homólogos, de una mezcla previamente adsorbida.

Ha sido extensamente aplicado por Reichstein (1936 b, 1937, 1938 a, 1939 b) en separación de corticoides y esteroides sexuales.

2) Técnica de cambiadores de iones:

Consiste en la liberación de algún constituyente de la superficie sólida que pasa al disolvente, por un intercambio iónico (Adams, 1936).

3) Cromatografía de frentes

Método ideado por Tiselius en 1940 y consiste en hacer pasar una solución a través de un adsorbente y determinar el índice de refracción del líquido emergente.

4) Separato cromatográfico (Martín y Nyage, 1941)

Consiste en la separación de los componentes de una mezcla, de acuerdo con el diferente grado de adsorción sobre una columna sólida que actúa como soporte.

5) Cromatografía sobre papel

Es semejante al método anterior pero aquí el soporte es papel de filtro.

Sobre el papel se encuentra una fase fija o estática sobre la que correrá la fase móvil. El ambiente en que va a desarrollarse el cromatograma es una atmósfera saturada con ambas fases.

Este método presenta algunas variantes:

Cromatografía monodimensional	Ascendente
	Descendente

Cromatografía bidimensional	Una vez efectuado el corrimiento en una dirección, se seca, se gira 90° y se vuelve a cromatografiar.
-----------------------------	---

En resumen, la cromatografía sobre papel, que es la técnica utilizada en el presente trabajo, permitirá la separación de los diferentes solutos, aprovechando la distinta velocidad de migración sobre un soporte sólido (papel), por impulso de una fase líquida móvil.

Este fenómeno de migración está influenciado por la acción de la capilaridad, pero también si al soluto se lo coloca al influjo de una corriente eléctrica se consigue la separación de los componentes, este fenómeno se llama electroforesis (en general), o en este caso particular recibe el nombre de electrocromatografía y ha sido aplicado al estudio de corticoides

El papel de filtro que se utiliza se considera como un soporte inerte.

Las fases móviles pueden ser:

- a) Disolventes no ionizantes, no polares.
- b) Disolventes polares ionizantes utilizados en cromatografía por intercambio iónico y en electromigración.
- c) Disolventes con afinidad por la fase adsorbente (análisis por desplazamiento).
- d) Disolventes con reactividad frente a los solutes (formación de complejos).

En la cromatografía sobre papel se define el coeficiente R_f como la siguiente relación:

$$R_f = \frac{\text{desplazamiento de un determinado soluto}}{\text{desplazamiento del frente máximo de la fase móvil}}$$

El soporte utilizado es preferentemente papel de filtro de la marca Whatmann (entre ellos los Nos. 1, 4, 42 y los tipos Accelerator y Seed testing).

Al papel se le suele agregar ciertos impregantes con el propósito de conseguir mejores separaciones, entre ellos tenemos: alúmina

(Flood, 1949) aplicada, para separar esteroides (Busch, 1950); acetato - cloruro cromoico (Witchinsky, 1950).

Los métodos de revelados pueden comprender sustancias que reaccionan con los componentes solutos y se demuestra por las manchas coloreadas, o métodos físicos como la fluorescencia a la luz ultravioleta (Phillips, 1948).

CAPITULO VI

PAGE REFERENTIAL

CROMATOGRAFIA DE CORTICOIDES SOBRE PAPEL

Introducción al estudio experimental

Con los valores químicos obtenidos en el trabajo precedente se trató de comparar y hallar zonas de identificación con los testigos, en los corticoides eliminados y valorados semicuantitativamente por adsorción cromatográfica sobre papel.

Los extractos fueron purificados previamente algunos de ellos por cromatografía en columna con florisil (Samuels y Nelson, 1952), esto permitirá la separación de la fracción considerada como 17 hidroxicorticoide, de la fracción considerada como 17 esteroesteroides.

También se tratará previamente con el reactivo del Girard T (Dobriner, 1948) para separar la fracción cetónica de la fracción no cetónica.

Con respecto a la velocidad de migración de cada una de los solutos ésta depende del número y naturaleza de la función oxígeno en la molécula del corticoide (Burton, 1951): la 11 desoxicorticosterona, un compuesto de fórmula $C_{21}^{O_3}$ se desplaza más rápido que los componentes de fórmulas $C_{21}^{O_4}$ y estos más rápidos que los compuestos $C_{21}^{O_5}$; algunas excepciones se encontraron pero no en estos 6 compuestos estudiados en el presente trabajo; así por ejemplo el pregnane 3, 12, 21, triol 20 one y el Δ^4 pregnane 17 α , 20, 21 triol 3 one; 2 compuestos $C_{21}^{O_4}$ se desplazaron más lentamente que la 11 dehidro-17 hidroxicorticosterona, un compuesto $C_{21}^{O_5}$.

La causa probablemente se debe a que el grupo HO ejerce un mayor efecto polar que el grupo cetónico.

La separación de sustancias como Δ^4 pregnane 17 α , 20, 21 triol 3 one del Δ^4 pregnane 17 β , 20, 21, triol 3 one sugiere que la

posición espacial del grupo HO modifica la velocidad de desplazamiento.

En general los ésteres se desplazan más rápidamente que los compuestos libres.

La velocidad de desplazamiento también aumenta cuando el papel impregnado en propilen-glicol se expone más tiempo al aire para ser evaporada.

La forma y capacidad del recipiente interior utilizado para el solvente (fase móvil), también tiene influencia.

Según el trabajo citado la sensibilidad mínima con trifenil-tetrazolium (TPTZ) fué de 15 gammas en cada componente.

ESTUDIO DE LOS CORTICOIDES POR EL METODO CROMATOGRAFICO
SOBRE PAPEL (DESCRIBENTE), EN EXTRACTOS DE ORINAS
DE EMBARAZOS NORMALES, PATOLOGICOS Y OTROS CASOS

Método (Lustscher, 1954)

Extracción:

La orina se recoge de 24 hs., se lleva a pH 8.1 con ácido clorhídrico conc. y dejado hidrolizar 24 hs., a temperatura ambiente, se extrae 4 veces con cloroformo con fracciones de 0.2 en volumen del total de la orina.

Cada extracción se hace en un aparato agitador por espacio de 30 minutos, la emulsión formada se deshace por centrifugación a 2.000 rev./min. durante 3 minutos.

Los extractos cloroformicos se trataron 2 veces con hidróxido de sodio 0.1 N, en volumen 0.1 en relación al total de cloroformo y una vez con agua destilada. A su vez dichos lavados fueron reextraídos 1 vez con 0.2 volumen de cloroformo y unido al extracto anterior.

El extracto cloroformico se seca con sulfato de sodio anhidro y evaporado a seco en aparato de vacío a no más de 40° C. de temperatura.

Reactivos y aparatos (Burton, 1951)

1) Corticoides cristalinos puros (*), se utilizaron los siguientes corticoides disueltos en metanol:

11-Desoxicorticosterona (Reichstein v)

(*) Gentilmente cedidos por Merck-Sharp y Dome International

- 11- Dehidrocorticosterona (Kendall A)
- Corticosterona (Kendall B)
- 17 Hidroxicorticosterona (Kendall F)
- 11 Dehidro-17 hidroxicorticosterona (Kendall E)
- 17 Hidroxi-11 Desoxicorticosterona (Reichstein S).

Todos disueltos en metanol, 2-5 %

2) Solventes

- a) Toluene, bidestilado
- b) Propilen-glicol puro
- c) Metanol absoluto

3) Papel de filtro Whatmann Nº 1

4) Reactivo revelador:

Trifenil tetrasolium clorhidrato (TPTZ); una solución stock conteniendo 0,2 % de TPTZ en agua y conservada en la oscuridad. Inmediatamente antes de usar se mezclan dos partes de esta solución con una parte de solución de hidróxido de sodio 10 %.

5) Pasta de almidón:

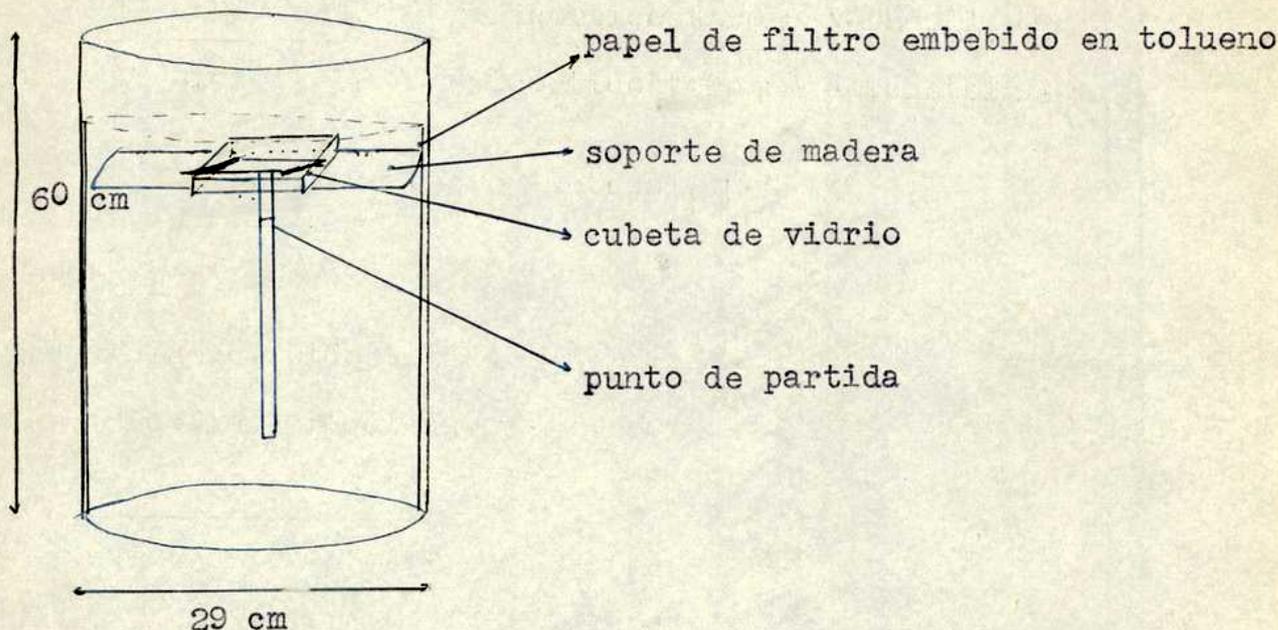
Almidón soluble más glicerina en proporción 9/33 (peso/peso), calentado con agitación a 140^o C y enfriado.

6) Cámara cromatográfica

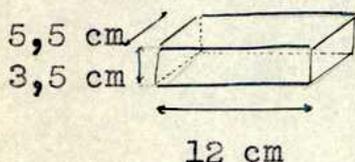
El aparato de vidrio que abajo se detalla es el utilizado en el presente trabajo.

La tapa es de borde esmerilado al cual se le agrega la pasta 5, un soporte de madera sobre el cual se encuentra una cubeta para el solvente, dos platos de vidrio que servirán para apoyar las tiras

de papel según indica el esquema.



Cubeta interior



2 planchas de vidrio de 11 x 7 cm.

Temperatura de la cámara: $25^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ}$

Volumen de la cubeta: 220 cc.

La cubeta interior se nivela perfectamente horizontal, toda la pared interior de la cámara se recubre con papel de filtro embebido en tolueno, lo cual permite saturar la atmósfera interior con dicho solvente. Es necesario esperar 1 hora para obtener el equilibrio.

Las tiras de papel de filtro se impregnan en propilen-glicol y se extraen el exceso colocándolas entre papeles secantes.

La solución de corticoides se aplica unos 10 cm debajo del borde del plato de vidrio, tratando de evaporar el metanol y no permitiendo que el ancho de la mancha sea superior a 1 cm.

Luego de cromatografiado en diferentes períodos se retiran

las tiras y se secan al aire durante 6-8 horas ó en estufa a 105° C, se revelan con TPTZ y luego se lavan con agua destilada.

DETERMINACION EXPERIMENTAL DE LOS INDICES R_F CON LOS TESTIGOS

Se utilizaron tiras de papel de filtro Whatmann N° 1 de 4 x 40 cm y se empleó una mezcla de los 6 componentes y luego tiras con cada uno de los testigos para identificar los componentes de la mezcla.

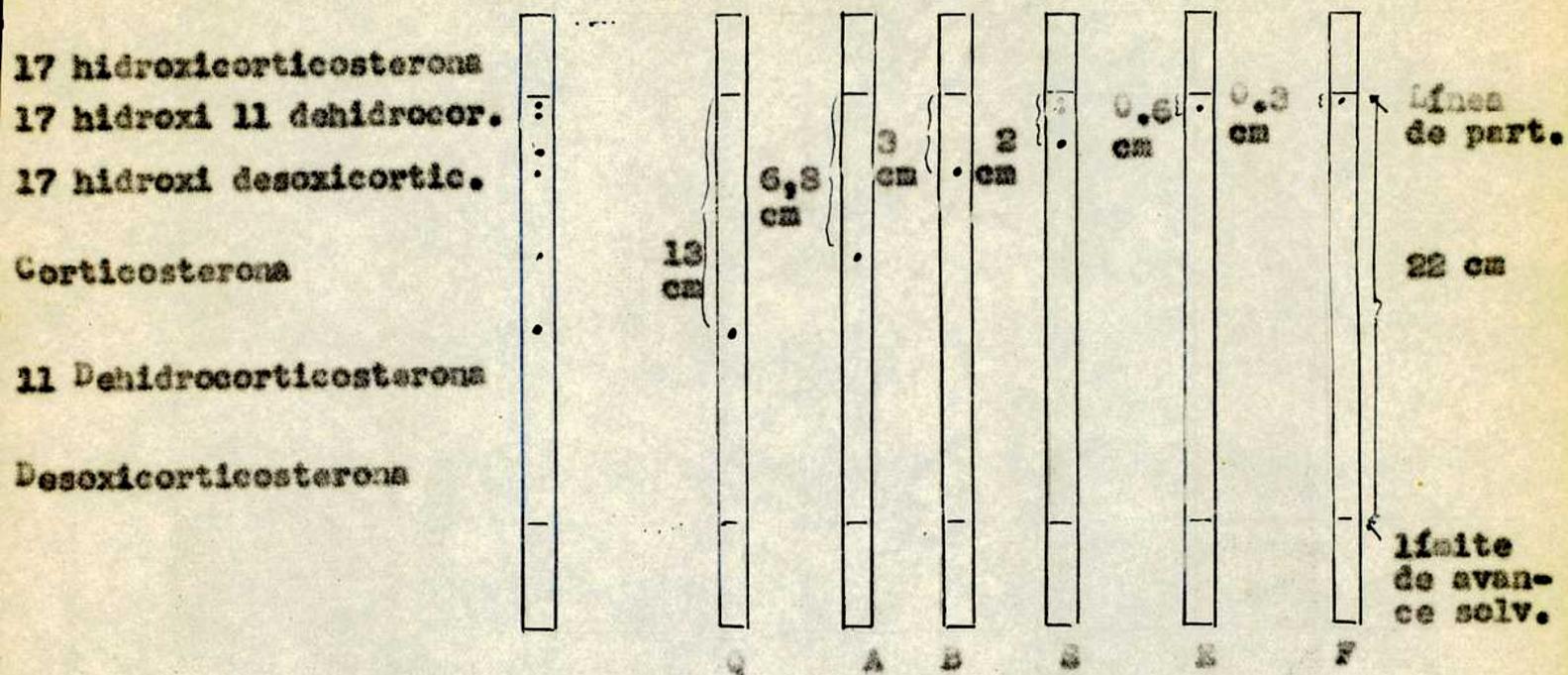
Tiempo de cromatografía 2 horas 40 minutos. Temperatura de la cámara 25° C.

Resultados:

Hormona	R _F	Considerando 11 Desoxicor- tosterona = 1	Datos obtenidos por Zaffaroni, 1951 Desoxicorticost. = 1
11 Desoxicorticostero- na (Reichstein Q)	0.636	1	1
11 Dehidrocorticostero- na (Kendall A)	0.308	0.488	0.500
Corticosterona (Kendall B)	0.137	0.215	0.204
17 Hidroxi- 11 Desoxicor- tosterona (Reichst. S)	0.111	0.174	0.140
17 Hidroxi- 11 Dehidrocortico- tosterona (Kendall E)	0.027	0.042	0.041
17 Hidroxicorticostero- na (Kendall F)	0.013	0.020	0.017

Cantidad de hormona utilizada: 25 gammas en cada componente.

GRAFICO COMPARATIVO CON LOS DIFERENTES TESTIGOS Puros



Para poder hacer una comparación semicuantitativa se realizaron cromatografías con 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 80 y 100 gammas con las diferentes hormonas puras.

Cromatografía sobre papel con los extractos de orina en embarazos normales y patológicos

Para purificar los extractos, algunos de ellos fueron sometidos a un tratamiento con en unos casos con el reactivo de Girard T (cloruro de trimetil acetato de hidrazida amonio) y otros con florisil para separar previamente los 17 hidrocorticoides de los demás corticoides y de los 17 esteroides cuya técnica ya ha sido detallada en la valoración química.

Otros casos fueron cromatografiados directamente y en todos ellos se utilizaron testigos simultáneamente.

La técnica con reactivo Girard T es la siguiente: al extracto urinario se le agrega aproximadamente el doble en peso de dicho reactivo (previamente purificado por recristalización en etanol absoluto), se agrega 2 ml de una solución al 10 % de ácido acético glacial en metanol absoluto. Luego se incuba durante 2 horas a 40° C (Zaffaroni, 1949).

Valores obtenidos

Caso I: embarazo T.P.G.: 180 días ; diuresis 1500 cc.

El extracto de 1/2 diuresis se lo trata previamente con florisil (cromatografía en columna) y luego se lo cromatografía en papel previamente disuelto en metanol.

Se observa a 0.8 cc una mancha que por comparación con testigo corresponde a 35 µ de la suma de 17 hidroxil corticosterona y 17 hidroxil 11 dehidrocorticosterona.

Por lo tanto a la diuresis total le corresponde ~ 0.420 mg.

Además se observa una zona muy tenue a 2,8 cm del punto de partida.

Caso 2 : embarazo T.P.G. 200 días ; diuresis 960 cc

Tratamiento previo con florisil, se observa una mancha a un centímetro del punto de partida que por comparación con testigo corresponde a aproximadamente 0.210 mg en la diuresis total.

Además se observa una mancha muy tenue a 0.5 cm y otra a 3 cm, esta última próxima a la zona de la 17 hidroxil desoxicorticosterona.

Caso 3: Embarazo T.P.G. 223 días; diuresis 1500 cc

Tratamiento previo con florisil, se observa una mancha a 0.6 cm de aproximadamente 20 μ , por lo tanto le corresponde a la diuresis total 0.400 mg.

Además se observa una mancha muy tenue a 3 cm.

Caso 4: embarazo T.P.G. 247 días; diuresis 1650 cc

a) medio extracto tratado con reactivo Girard T.

Se observa a 0.3 cm una mancha de $\sim 15 \mu$, por lo tanto a la diuresis corresponde 0,090 mg.

b) medio extracto tratado con florisil, a 2 cm se observa una mancha de $\sim 25 \mu$ que por comparación corresponde a 0.300 en la diuresis total.

Caso 5: embarazo T.P.G. 236 días; diuresis 1150

Cromatografía directa, se observa una mancha de $\sim 25 \mu$ que corresponde a 0.150 mg en la diuresis total.

Caso 6: T.P.G. 25 días post-parto; diuresis 1350 cc

El extracto se trata previamente con Girard T y se obtiene una mancha de 30 μ correspondiendo a ~ 0.120 mg en la diuresis total.

Caso 7: embarazo T.P.G. 240 días; diuresis 1680

Cromatografía directa, se observa una mancha de 1 cm de distancia del punto de partida de $\sim 20 \mu$ correspondiente a la diuresis total a 0.200 mg.

Además se observan manchas a 3 y 6 cm.

Caso 8: embarazo 160 días (partos prematuros); diuresis 1710

Cromatografía directa, se observa una mancha de $\sim 15 \mu$ a 1 cm que corresponde a 0.480 mg en la diuresis total.

Caso 9: embarazo 180 días; esterilidad 8 años (tratamiento hormonal); diuresis 1050 cc.

Cromatografía directa, se observa una mancha de 25 μ correspondiente a la zona de los compuestos Kendall E y Kendall F; a la diuresis total le corresponde 100 .

Caso 10: embarazo M.G. 235 días; diuresis 1615 cc

Tratamiento previo con florisil; se observa una mancha de $\sim 20 \mu$ a 0.7 cm que corresponden a 0.100 mg en la diuresis total.

Además se cromatografiaron en 41 horas y se observaron manchas de $\sim 30 \mu$ en la zona de las sustancias E y F. y 15μ en la zona de la sustancia S que corresponde respectivamente a 0.130 y 0.065 en la diuresis total.

Caso 11: embarazo L.A. 60 días; diuresis 845 cc

Cromatografía directa. Se observa una mancha de ~ 20 μ en la zona de la sustancia F, a la diuresis total le corresponde ~ 60 μ

Caso 12: R.G. intermenstrual; diuresis 1900.

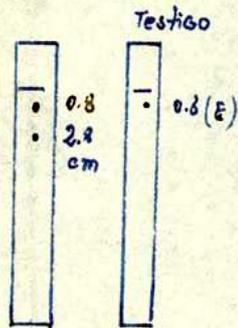
Se observa una mancha de 25 μ que corresponde a ~ 30 μ en la diuresis total.

Caso 13: Prob. Cushing. Tratamiento previo con floriail, se cromatografiaron los extractos en diferentes tiempos y se observó valores de 1,1 mg en la diuresis total correspondiente a la zona de las sustancias E y F, es decir como excepción valores muy próximos al dato químico correspondiente.

CROMATOGRAFIA SOBRE PAPEL EN EMBARAZOS NORMALES Y PATOLOGICOS

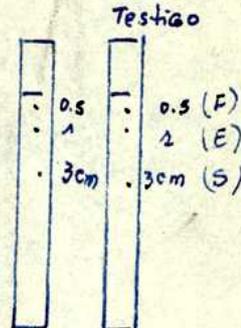
Gráfico de los valores obtenidos

Caso 1



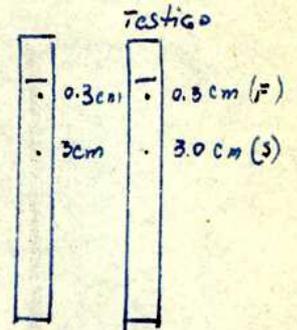
7 hs.

Caso 2



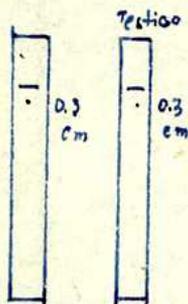
6 hs. 30'

Caso 3



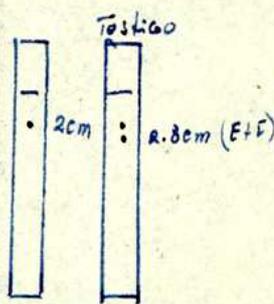
6 hs. 30'

Caso 4 a)



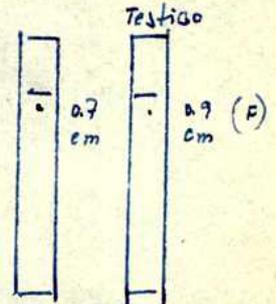
5 hs.

Caso 4 b)



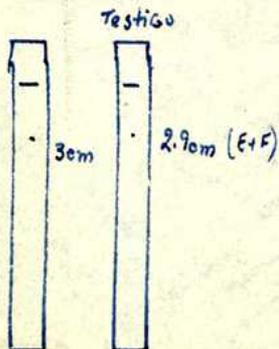
70 hs.

Caso 5



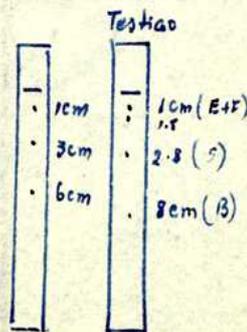
15 hs.

Caso 6



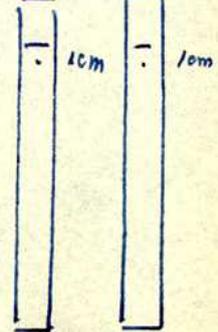
70 hs.

Caso 7



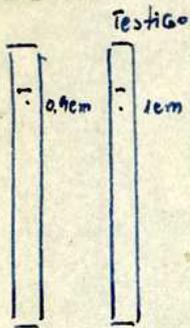
22 hs.

Caso 8



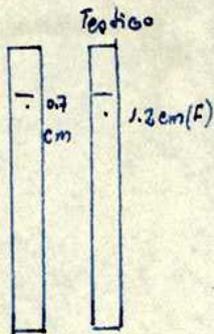
10 hs.

Caso 9



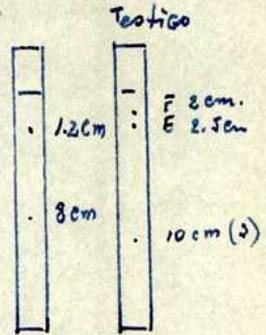
12 hs

Caso 10 a)



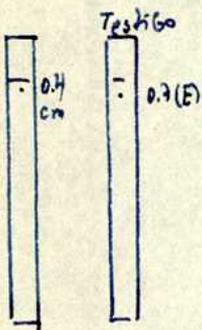
20 hs.

Caso 10 b)



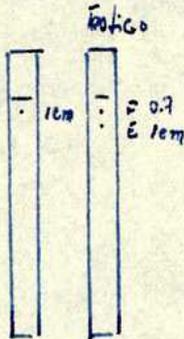
41 hs.

Caso 11



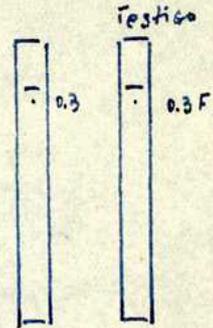
6 hs. 30'

Caso 12



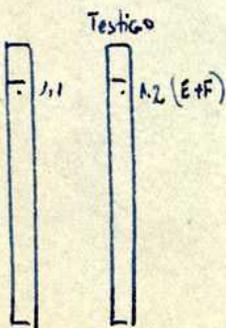
6 hs. 30'

Caso 13 a)



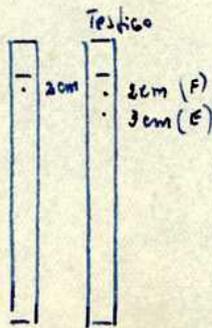
7 hs.

Caso 13 b)



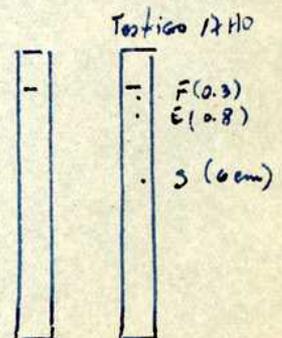
21 hs.

Caso 13 c)



70 hs.

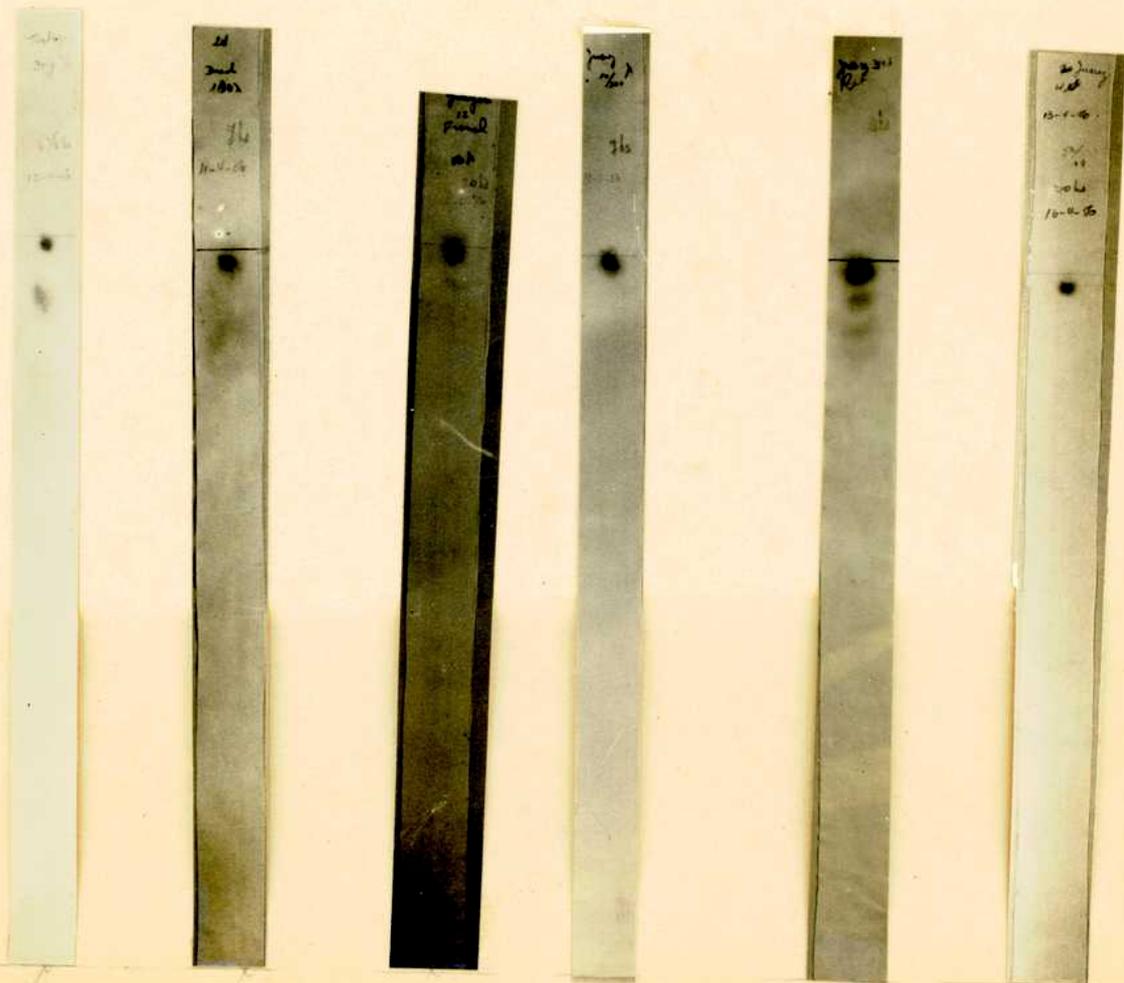
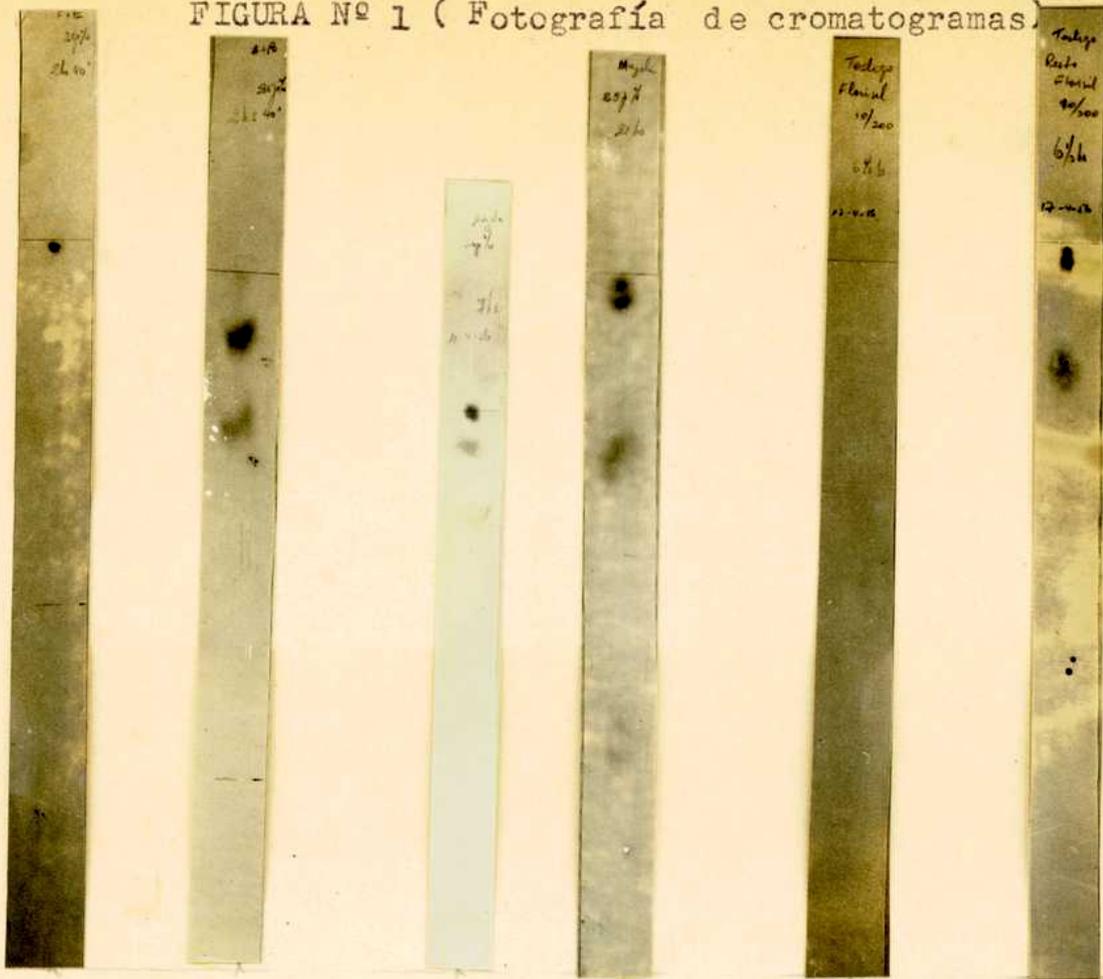
Testigos (trat. floridil)



6 hs. 30'

Frac. 17 OR

FIGURA Nº 1 (Fotografía de cromatogramas)



EXPLICACION DE LA FIGURA 1

Dicha figura representa algunos de los cromatogramas obtenidos revelados con trifeniltetrazolium (') .

	Tiempo	Cant. de sustancia
1) Testigos (E y F)	2 hs 40'	25 μ c/u
2) Testigos (A y B)	2 hs 40'	25 μ c/u
3) Testigos (E, F, S y B)	7 hs	20 μ c/u
4) Testigos (E, F y S)	21 hs	25 μ c/u
5) Testigos tratados con florisil fracción resto de hormonas con oxhidrilo en el C ₁₇	6 hs 30'	
6) Testigos tratados con florisil fracción correspondiente a las hormonas con oxhidrilo en el C ₁₇	6 hs 30'	40 μ c/u
7) Testigos (E, F y S)	6 hs 30'	30 μ c/u
8) Emb. 180 días T.P.G.	7 hs	35 μ (zona E y F)
9) Emb. 235 días M.G.	6 hs 30'	20 μ (zona E y F)
10) L.J. (prob. Cushing)	7 hs 5	50 μ (zona E y F)
11) L.J. (prob. Cushing)	21 hs	70 μ (zona E y F)
12) L.J. (prob. Cushing)	70 hs	25 μ (zona E y F)

Nomenclatura: E = 17 hidroxil 11 dehidrocorticosterona; F = 17 hidroxicorticosterona; B = corticosterona; A = 11 dehidrocorticosterona; S = 17 hidroxil 11 desoxicorticosterona.

(') Muchos de los cromatogramas no se pudieron incluir por no ser suficientemente nítidas las fotografías respectivas.

Casos	Cromatografía	Valoraciones químicas
10 - Emb.(235 días) M.G. directo	0.115 mg	1.8 mg
11 - Emb. (60 días) L.N. directo	0.06 mg	2.21 mg.
12 - H.G. (intermes- trual) directo	0.05 mg	0.88 mg
13 - Prob. Cushing Trat. florisil directo	1.1 mg F = 1.1 X = 1.5	3.20 mg

BIBLIOGRAFIA

- Adams B.A. y Holmes E.L. - J. Soc. Chem. Ind. 54, 1 (1935)
- Addison T. - The constitutional and local effects of diseases of the suprarenal capsules, S. Hignley, London (1855)
- Beall D., Reichstein T. - Nature 142, 479 (1938)
- Beall D. - Nature 144, 76 (1939)
- Berblinger W.- Citado por Schwarz E. in Halban-Seitz - Biología y Patología de la mujer. Ed. "Plus Ultra" - Madrid 13, 245 (1935)
- Burton R.B., Zaffaroni A. and Keutman H. - J. Biol. Chem. 188, 763 (1951)
- Busch I.M. - Nature 166, 445 (1950)
- Calatroni, C. J., Ruiz V., Di Paola G. - Endocrinología sexual femenina Ed. El Ateneo Bs.As. (1947)
- Callow N. H., Callow R. K., Emmens C.W. - Biochem. J. 32-1312 (1938)
- Callow N. H. - Biochem. J. 33, 559 (1939)
- Corcoran A.C. and Page I.H. - J. Lab. and Clin. Med. 33, 1326 (1948)
- Cuyler W.R., Ashley C., Hamblen E.C. - Endocrinol. 30,48 (1942)
- Dobriner K., Lieberman S., Rhoads P., Hill B.R. and Fieser L.F. - J. Biol. Chem. - 172, 243 (1948)
- Dorfman R.L., Horwitt B.N. - Feder. Proceed. 2, 60 (1943)
- Frank R.T., Goldberger M.A., Salmun V. J. - Proceed. Soc. Exper. Biol. and Med. 33, 615 (1936)
- Fraser R. W., Forbes A.P., Albright F. and Reifenstein E.C. - J. Clin. Endoc. 1, 234 (1941)
- Fieser L.F. and Fieser M. - Natural products related to phenanthrene. Reinhold Publishing Corporation pág. 425 N.Y. (1949)
- Flood H. - Disc. Faraday Soc. 7, 180 (1949)
- Glenn E. M. and Nelson H. - J. Clin. Endoc. and Metab. - vol. 13,911 (1953)
- Grollman A. - The Adrenals, Ed. Williams and Wilkins Co. Baltimore pág. 56 (1936).

- Haines W. J. - Recent Progress in hormone Research - Vol. VII, 256 (1962)
- Hamblen A.C. - Endocrinology of Women. Ed. Ch. C. Thomas - Springfield
pág. 22 (1945)
- Hartman F. A., Brownell A.A., Dean G.A., Mc Arthur C.G. - J. Physiol.
86, 353 (1928)
- Hell C. - Dtsch. Wtschr. Chir. 226, 276 (1930)
- Moussay B.A., Lewis J., Orias O., Braun Hernandez M., Aug M., Foglia V.,
Leloir L.F. - Fisiología Humana 3ª Ed. Ed. Ateneo Bs. As. (1954)
- Ingle D.J. - Endocrinology 34, 191 (1944)
- Ingle D.J. - Ann. New York Acad. Sci. 50, 576 (1949)
- Ingle D.J. - Symposium on Steroid Hormones -1950
- Mendall C., Mason H.O. and Moehn A.M. - J. Biol. Chem. 124, 459 (1938)
- Knitchevsky D., Calvin H. - J. Am. Chem. Soc. 72, 4330 (1950)
- Lewis J.T., Magenta M. - Rev. Soc. Arg. Biol. 10, 28 (1924)
- Long C.M.M. - Endocrinol. 30, 870 (1942)
- Lovenstein B.B., Corcoran A.C. and Page H.I. - Endocrinology 30, 82
(1946)
- Luetscher J.A. and Johnson B.J. - J. Clin. Invest. 33, 276 (1954)
- Marenzi A. D. - Fotometría y su aplic. al anál. Biol. Ed. Ed. Ateneo
Bs. As. (1941)
- Martin A.J. y Syngé H.L.M. - Bioch. J. 35, 1358 (1941)
- Mason H. L. - J. Biol. Chem. 132, 131 (1940)
- Miescher K., Fisher W. H., Tschopp E. - Nature 142, 435 (1938)
- Nelson D.M. and Samuels L.T. - J. Clin. Endocrinol. and Metab. 12, 519
(1952)
- Pfiffner J.J. - Advances in Enzymology 2, 331 (1942)
- Phillips D.H.P. - Nature 161, 53 (1948)
- Porter C.C. and Silver H.M. - J. Biol. Chem. 185, 201 (1950)
- Reichstein S. - Helv. Chim. Acta 19, 402 (1936 a)
- Reichstein S. - Helv. Chim. Acta 19, 1107 (1936 b)

- Reichstein S. - *Helv. Chim. Acta* - 20, 953 (1937)
- Reichstein S. and von Euw - *Helv. Chim. Acta* 21, 1197 (1938 a)
- Reichstein S. and Gätzi L. - *Helv. Chim. Acta* 21, 1185 (1938 b)
- Repetto C. y Pandolfo - *Revist. Inst. Malbrán* 13, 405 (1945-1948)
- Salmún V.J. - *Proced. Soc. Exp. Biol. y med.* 41, 515 (1939)
- Schneider J.J. - *J. Biol. Chem.* 183, 365 (1950)
- Simpson S.A., Tait J.F., Wettstein A., Weher R., v. Euw J. and Reichstein T. - *Experientia* 9, 333 (1953)
- Simpson S.A., Tait J.F., Wettstein A., Weher R., v. Euw J., Schindler O. and Reichstein T. - *Helv. Chim. Acta* 37, 1163 (1954)
- Soffer J.L. - *Diseases of the Adrenals*, Philadelphia (1946)
- Stewart G.M., Rogoff I.M. - *Am. J. Physiol.* 84, 660 (1928)
- Swingle W.W., Pfiffner J.J. - *Science* 71, 321 (1930)
- Talbot N.B., Saltzman A. H., Wixom R.L. and Wolfe J.K. - *J. Biol. Chem.* 160, 535 (1945)
- Thorn G.W. - *The diagnosis and treatment of adrenal insufficiency*, Publ. No 29 Amer. Lect. Series C.C. Thomas (1949)
- Thorn G. y col. - *J. Clin. Endocrinol.* 11, 774 (1951)
- Thorn G.W., Renald A.E., Jenkins D., Foisham P.H. - *J. Clin. Endocrinol.* 12, 763 (1952)
- Tompsett S. L. - *J. Clin. Pathology* vol. 6, 74 (1953)
- Venning E. - *Cit. por Pincus* - *J. Clin. Endocrin.* 3, 301 (1943)
- Venning E.H., Browne J.S.L. - *J. Clin. Invest.* 25, 935 (1946 a)
- Venning E.H. - *Endocrinology* 39, 203, (1946 b)
- Williams R. H., Saunders B. W. - *Textbook of Endocrinology* - Company Philadelphia, Londo (1950).
- Zaffaroni A., Keutman H. and Burton R.B. - *J. Biol. Chem.* 188, 763 (1951)
- Zaffaroni A., Burton R. and Keutman H.E. - *J. Biol. Chem.* 177, 109 (1949)

I N D I C E ...

	Página
<u>CAPITULO I</u>	
Fisiología de las hormonas de la corteza suprarrenal	1
<u>CAPITULO II</u>	
Química de las hormonas de la corteza suprarrenal	7
<u>CAPITULO III</u>	
Los corticoides y los 17 cetocotercidos, su relación	14
<u>CAPITULO IV</u>	
Parte experimental: Introducción al estudio experimental	17
a) Determinación química de corticoides termolábiles	20
b) Determinación química de corticoides termoestables	26
c) Determinación química de 17 hidróxi-corticoides	31
Potómetro de Pulfrich; algunos detalles	37
<u>CAPITULO V</u>	
Cromatografía: consideraciones teóricas	39
Cromatografía de corticoides, sobre papel, introducción al estudio experimental	43
Estudio de corticoides, en cromatografía sobre papel	45
Cuadro comparativo de valoraciones químicas y cromatográficos	57
Conclusiones	59
Bibliografía	60