

Tesis de Posgrado

Valoración de urobilina y de urobilinógeno en la orina

De Buono, Jorge Pablo

1959

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:

De Buono, Jorge Pablo. (1959). Valoración de urobilina y de urobilinógeno en la orina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0991_DeBuono.pdf

Cita tipo Chicago:

De Buono, Jorge Pablo. "Valoración de urobilina y de urobilinógeno en la orina". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1959.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0991_DeBuono.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

VALORACION DE UROBILINA Y DE UROBILINOGENO EN LA ORINA

por

JORGE PABLO DE BUONO

TESIS

para optar al título de

DOCTOR EN QUIMICA

(orientación Química Analítica)

Buenos Aires

1959

TESIS: 991

991
J. 19-3

RESUMEN DE TESIS

VALORACION DE UROBILINA Y DE UROBILINOGENO EN LA ORINA

por

Jorge Pablo De Buono

Tesis para optar al título de Doctor en Química
(orientación Química Analítica)

Padrino de tesis: Dr. Ventura Morera

Introducción.

En el presente trabajo se indican las teorías expuestas por diversos autores sobre el origen de la urobilina urinaria, así como las relaciones químicas y fisiológicas que existen entre los urobilinoideos.

Se mencionan también las propiedades de las urobilinas y de los urobilinógenos y los métodos propuestos por diversos autores para la investigación y valoración en la orina de dichos compuestos.

Resultados experimentales.

Se ha efectuado una comparación de los dos tipos de métodos empleados más corrientemente para la valoración de urobilinoideos en la orina, el fluorescimétrico (con sales de cinc) y el colorimétrico (con para-dimetilaminobenzaldehído).

Se comprobó que el uso de comparadores fluorescimétricos a visión directa, como el que se usa en la técnica de Royer, da lugar a pronunciados errores por hallarse muy indefinido el punto final de la valoración fluorescimétrica. Puesto que la técnica de Royer sólo puede considerarse semicuantitativa sugerimos expresar los resultados en Unidades Schlesinger (U.S.) y no en mg. de urobilina

Res. de Tesis 991

por mil ml. de orina.

Mediante la técnica de Royer se ha determinado la urobilinuria en una serie de sujetos normales y se han encontrado valores comprendidos entre 0.2 y 0.6 U.S. por mil ml. de orina en el 85.7% de los casos, entre 0.6 y 0.7 en el 3.6% de los casos y entre 0.7 y 0.8 en el 10.7% de los casos.

Dado que existen sustancias medicamentosas que son excretadas en la orina y que poseen fluorescencia natural que interfiere en la investigación o valoración de urobilinoïdes por el método fluorescimétrico, se ha experimentado la técnica de Naumann para investigar urobilina en presencia de riboflavina, aplicando dicha técnica a mezclas experimentales de riboflavina con orinas normales y patológicas, asimismo se ha determinado que el pH más conveniente para observar la fluorescencia de la riboflavina es 7.0. También se ensayó la técnica de Naumann para investigar urobilina en presencia de acriflavina.

Se ha administrado riboflavina por vía bucal a sujetos normales y se observó que existe una eliminación apreciable de dicha sustancia en la orina durante algunos días luego de suprimida la ingestión de riboflavina.

La aplicación de la técnica de Royer en orinas de sujetos sometidos a la ingestión de riboflavina conduce a errores que pueden llegar al 100%. Por ello, es aconsejable realizar siempre una investigación cualitativa previa en duplicado, con y sin sales de cinc, en la forma que se detalla en el texto.

En el caso de orinas donde se comprueba la presencia de sustancias fluorescentes extrañas proponemos realizar la valoración de urobilina mediante alguna de las dos técnicas personales que se

detallan a continuación, las cuales sólo permiten obtener resultados aproximados:

- a) mediante la técnica de Royer, se valora el contenido de urobilina por diferencia entre la fluorescencia total de la orina (fluorescencias interferentes y fluorescencia de la urobilina) y la fluorescencia natural de la orina (fluorescencia interferentes).
- b) se separa la urobilina de las sustancias fluorescentes extrañas mediante una extracción clorofórmica y se extrae luego la urobilina disuelta en el cloroformo con soluciones alcalinas diluídas. La fase acuosa se neutraliza y se valora según la técnica de Royer.

Se ha estudiado el método de Schwartz, Sborov y Watson para valorar el contenido de urobilinógeno en la orina mediante estimación de la intensidad del color desarrollado en la reacción del urobilinógeno con el para-dimetilaminobenzaldehído.

Personalmente creemos que la lectura en el colorímetro fotoeléctrico de las muestras tratadas, puede efectuarse dentro de los 15 minutos de terminadas las operaciones que indica la técnica, los autores indican un plazo no mayor de 5 minutos. La reproducibilidad de los resultados que se obtienen para una misma muestra es muy buena.

Se describe la construcción de un comparador colorimétrico, utilizable en este método o en el de Watson, Schwartz, Sborov y Bertie cuando se carece de colorímetro fotoeléctrico. Los resultados obtenidos mediante una u otra técnica de lectura presentan una buena concordancia.

Mediante el método de Schwartz, Sborov y Watson hemos determinado el contenido de urobilinógeno en sujetos normales y

hemos hallado valores que oscilan entre 0.3 y 0.8 mg. de urobilinógeno por mil ml. de orina en el 89.2% de los casos, entre 0.8 y 1.0 en el 3.6% de los casos y entre 1.0 y 1.2 en el 7.2% de los casos.

Se ha experimentado el método de Watson, Schwartz, Sborov y Bertie, el cual por su menor especificidad acusa resultados más elevados que el método de Schwartz, Sborov y Watson.

Se ha observado que la lectura de las muestras tratadas debe efectuarse dentro de los 10 minutos de terminadas las operaciones previas que indica la técnica, pues luego se observan variaciones apreciables en la intensidad del color desarrollado.

Mediante este método se han obtenido en sujetos normales cifras comprendidas entre 2 y 10 Unidades Ehrlich por mil ml. de orina.

Nuestro criterio personal sobre la aplicación de las técnicas que se han estudiado es el siguiente. Se efectúa una determinación según la técnica de Royer, si el resultado indica una urobilinuria fisiológica se puede informar el valor obtenido por esta técnica pues el error es pequeño, pero si el resultado indica una urobilinuria patológica se debe efectuar una nueva valoración por la técnica de Schwartz, Sborov y Watson. En todos los casos en que se desee un resultado correcto también se ha de aplicar esta última técnica.

— o —

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'J. Royer', written over a horizontal line.

SECRET

PABLO DE VEGAS

DR. VENTURA MORERA

Expreso mi reconocimiento amplio y sincero al Dr. Ventura Morera, Profesor titular de Análisis Biológicas, por haber tomado bajo su dirección el presente trabajo, orientándolo constantemente con sus valiosas indicaciones.

Me es grato asimismo, dejar constancia de mi agradecimiento a la Dra. Rosa M. Ferró por su amabilidad de colaborar en la corrección de los originales de este tesis, como también al Dr. M. Grinstein quien tuvo la gentileza de revisar las conclusiones de este trabajo.

INDICE

	Página
CAPITULO I.- Teorías sobre el origen de la urobilina urinaria.....	1
CAPITULO II.- Urobilinoíden. (Urobilina y urobilinoídenos). Relaciones químicas y fisiológicas.....	13
CAPITULO III.- Urobilinas. Propiedades. Métodos de investigación y de valoración.....	29
CAPITULO IV.- Urobilinoídenos. Propiedades. Métodos de investigación y de valoración....	49
CAPITULO V.- Resultados experimentales.....	71
CONCLUSIONES.....	147



1077A

CAPITULO I

TRONCAS SOBRE EL ORIGEN DE LA UROKLINA URINARIA.

TEORIAS SOBRE EL ORIGEN DE LA UROBILINA URINARIA

Existen seis teorías diferentes. Cuatro de ellas: histógena, renal, hemática e intestinal carecen de valor como lo demuestran los estudios experimentales, en tanto que las otras dos: hepática y enterohepática, son las más coherentes con los hechos reales, aún cuando no están exentas de objeciones experimentales.

Las teorías detalladas pueden encontrarse en la tesis de Boyer (1); nosotros efectuaremos un resumen de las cuatro primeras, tratando en extenso las dos últimas.

TEORIA HISTOGENA

Principio.— Los pigmentos biliares serían reducidos al nivel de los tejidos dando origen a la urobilina.

Fundamentos.— Por inyección de azul de alizarina en un animal se comprobó que el suero se coloreaba en tanto que los tejidos no, lo que corroboraría el poder reductor de los tejidos. Por inyección de sangre en la cavidad peritoneal, se observó la aparición de urobilina.

Objeciones.— Hayem (2) y Tissier (3) encontraron urobilinas escasas en personas que no sufrían de ictericia. Por otra parte, Hayem (loc.cit.) y Winter (4) no hallaron urobilina en la piel de los ictericos, encontrando solo bilirrubina. Algunos autores aducen que la piel puede no ser reductora en tanto que otros tejidos sí.

TEORIA RENAL

Principio.— La función reductora estaría a cargo del tejido renal y la urobilina se originaría a expensas de la bilirrubina sanguínea.

Fundamentos. Gilbert y Herscher (5) han defendido esta teoría en numerosos trabajos y sostienen que cuando hay urobilinuria no se observe urobilinemia; afirman asimismo que cuando hay urobilinuria no se halla urobilina en el líquido ascítico.

Objeciones. En realidad hay a menudo urobilinemia, como lo han demostrado diversos autores tales como Hayem (loc.cit.) y Tissier (loc.cit.), quienes han encontrado urobilinemia junto con urobilinuria. Por otra parte, Carrié (6) ha encontrado urobilina en líquidos ascíticos.

Los hechos precedentes demuestran que ha habido falla en la técnica que emplearon Gilbert y Herscher (loc.cit.) para investigar urobilina en la sangre y en el líquido ascítico.

El azul de metileno inyectado por vía intravenosa sufre una reducción y se halla en el organismo como cromógeno. Sin embargo es excretado por vía renal el estado de colorante, lo cual indicaría que el riñón posee cierto poder oxidante.

Royer (loc. cit.) estudió un perro con ligadura de colédoco y observó que la urobilinuria casi desaparece lo mismo que la urobilinemia; por otra parte, la bilirrubinemia aumenta pero la urobilinuria no. Además efectuó experiencias con otro perro que poseía una fístula biliar, la cual producía la desaparición de urobilina en la orina y en las heces, y comprobó que por inyección intravenosa de bilirrubina no había aparición de urobilina.

ria. En ambas experiencias los resultados están en desacuerdo con la teoría.

TEORIA HEMATICA

Principio.-- La urobilina se originaría en el medio sanguíneo a partir de la hemoglobina.

Fundamentos.-- Obtención de la urobilina a partir de la hemoglobina, "in vitro": Koppe Seyler (7), Meneki y Sieber (8) la prepararon por reducción de la hematina y de la hemetoporfirina.

Obtención de la urobilina a partir de la hemoglobina "in vivo": Mayen (9) y Aielle (10) encontraron urobilina en focos de hemorragia cerebral, en hematocela retrouterina y en derrames hemorrágicos.

Widal, Abramí y Brulé (11) y Treisman (12) encontraron urobilinuria en casos de ictericia hemolítica con gran destrucción glomerular.

Objeciones.-- Klian y Mc Master (13) señalaron en 1925, que en animales libres de urobilina por fístula biliar total, en condiciones de sepsis, no se observaba aparición de urobilina durante y luego de una intensa destrucción sanguínea causada por inyección intravenosa de agua destilado o de la propia sangre del animal extraída y hemolizada "in vitro". Pero cuando el flujo de bilis llega al intestino en forma continua, se observa urobilinuria durante la destrucción sanguínea, siendo su importancia paralela a la del proceso hemolítico, en magnitud y en duración.

Dichos investigadores señalan que la urobilina de origen hemolítico es fundamentalmente el resultado de una excreción aumentada de bilirrubina, la cual origina un incremento elevado de urobili-

na, en el intestino. En consecuencia, el hígado no alcanza a extraer todo el pigmento que llega por la vía porta, el excedente es reabsorbido y una fracción alcanza los riñones y pasa a la orina.

TEORIA INTESTINAL

Principio.- El autor de esta teoría, Müller (14), supone que la estercobilina se forma en el intestino por reducción bacteriana de la bilirrubina y luego pasa por difusión al resto del organismo. Por lo tanto, la urobilinuria sería proporcional a la cantidad de estercobilina.

Esta teoría fué abandonada por sus defensores al adoptar la teoría enterohéptica, con la cual está relacionada.

TEORIA HEPATICA

Principio.- Se supone que puede haber dos procesos, o bien se produciría urobilina como consecuencia de una insuficiencia del hígado para transformar la bilirrubina o bien por reducción de ésta por la grasa hepática. Fué enunciada por Hayem (2) en 1887-1889 y por Fischler (15) en 1889.

Fundamentos.- En 1906, Fischler (16) afirma la formación de la urobilina por el hígado lesionado. Trabaja con perros que poseen fístula biliar, a los cuales lesiona el hígado con una mezcla de fósforo y alcohol amílico, y observa un gran aumento en la urobilinocelia y luego disminución cuando cede la intoxicación.

En 1911, Oshima (17) trabaja con conejos a los cuales lesiona el hígado con cloroforme o con tetracloruro de carbono, observando un aumento de urobilina luego de la lesión. Por otra parte, inyec-

ta agentes hemolíticos a conejos con fístula biliar y observe un aumento de la urobilina y de la bilirrubina biliar. Como no llega bilis al intestino, el autor supone una transformación hepática de la hemoglobina en urobilina.

Objeciones.- En general las causas de error se deben a dos factores: cuando se estudian animales con fístula biliar crónica es muy fácil que la bilis se infecte y que aumente la urobilinocelia a expensas de la bilirrubina biliar, en tanto que cuando se observan animales con fístula biliar aguda, la urobilinocelia o la urobilinuria aumentadas pueden deberse a una disminución en la capacidad funcional del hígado para fijar el pigmento, y a la reserva de estercobilina que sigue la circulación enterohepática. El primer factor de error puede aplicarse a la experiencia de Fischler (loc.cit.) y el segundo a las experiencias de Oshima (loc. cit.).

En 1925, Elman y Mc Mester (18) experimentan con perros privados de estercobilina en el intestino por medio de una fístula biliar total y comprueban la ausencia de urobilinuria o de urobilinocelia, las que aparecen si se realiza una fístula biliar parcial en vez de total. En otras experiencias emplean la "altercursive intubation" mediante la cual puede efectuarse una desviación intermitente del flujo biliar, desde el intestino a un aparato colector. Señalan entonces que se observa la presencia de urobilina en la bilis hepática en tanto los pigmentos biliares lleguen al hígado, pero dicha urobilina desaparece cuando se desvía la bilis al aparato colector.

En otro trabajo de 1925, los citados autores (19) presentan una prueba de la absorción de pigmentos biliares desde el tracto in-

testinal, pues experimentan con perros a los cuales hacen ingerir raciones de bilirrubina pura y observan un gran aumento de urobilina en la bilis hepática. En una investigación posterior del mismo año (20), estudian enjiles con fístula biliar total, las cuales permanecen libres de urobilina aún después de producirles severas lesiones hepáticas experimentales; luego de la lesión hepática no se observe urobilinuria salvo que aún hubiera pigmentos biliares en el intestino. Cuando las heces se hacen ecólicas, la administración de una pequeña cantidad de bilirrubina libre de urobilina por vía bucal produce una rápida urobilinuria.

Conclusiones. Eiman y Mc Master (20) afirman que la urobilinemia y la urobilinuria que aparecen por lesión hepática experimental, indican la inhabilidad de las células hepáticas para retener todo el pigmento que llega al hígado por la circulación porta, consecuentemente el pigmento alcanza el riñón y llega a la orina.

TEORIA ENTEROHEPATICA

Principio.- El estercobilinógeno llega por la vía porta hasta el hígado, donde una parte es fijada y transformada en bilirrubina, mientras que otra parte, la menor, no sufre transformación; ambas fracciones son segregadas nuevamente en el intestino a través de los conductos biliares. Cuando hay una lesión hepática aumenta la proporción de estercobilinógeno que no es fijado y en consecuencia una cantidad mayor del cromógeno es llevado por la circulación general ha-

ta el riñón, de donde pasa a la orina. Esta teoría fué enunciada por Müller (21) en 1892 y por Fischler (loc.cit.) en 1906.

Fundamentos.— En 1892, Müller (21) administra bilis exenta de urobilina, por vía bucal, a enfermos con escolia completa y observa la aparición de urobilinuria luego de la ingestión. Fué criticado en 1923 por Weltmann (22) quien sostenía que la bilis contenía urobilinógeno y afirmaba que no se observa urobilinuria al trabajar como bilis exenta de urobilina y de urobilinógeno. Este a su vez es refutado por Boyer (loc. cit.) que administra bilirrubina por vía bucal a un enfermo con fístula biliar y observa una acentuada urobilinuria.

En 1908, Briand y Bauer (23) y en 1914, Labbé y Carrié (24) intoxican un conejo con alcohol e con cloroforme, lo cual produce una considerable urobilinuria, y observan que ésta disminuye rápidamente cuando se interrumpe la llegada de bilis al intestino por ligadura del colédoco.

Todo ello indica que la urobilinuria depende de la existencia de estercobilina en el intestino y del estado funcional del hígado. Boyer (loc.cit.) ha confirmado los trabajos anteriores, experimentando con perros con fístula biliar observa una disminución y posterior desaparición de la urobilinuria, paralela a la variación de la estercobilina.

En 1930, Roger Hollan (25) analiza muestras del contenido intestinal tomadas a diversos niveles del intestino delgado y determina su contenido de bilirrubina y de urobilinógeno, al mismo tiempo que valora ambos compuestos en las heces. Por comparación de los resultados se observa que la bilirrubina se halla en concentraciones relativamente elevadas en el íleon terminal pero se halla ausente en las heces, en tanto que la concentración de

urobilinógeno es baja en todo el intestino delgado pero relativamente alta en las heces. De ello se deduce que la reducción de bilirrubina a urobilinógeno ocurre fundamentalmente en el colon, debido a la acción de las bacterias que existen en dicha zona, lo que está de acuerdo con el hecho de que la ingestión de drogas bactericidas produce una disminución del contenido de urobilinógeno y un aumento del de bilirrubina en las heces.

Objeciones.- En 1921, Brulé (26) señala que la teoría enterohepática no puede explicar la urobilinuria de la ictericia hemolítica, la cual, según todos los autores, no va acompañada de insuficiencia hepática.

En 1926, Mc Master y Elman (27) realizan una infección experimental del tracto biliar entubado de un perro con partículas de heces y observan la formación de urobilina a expensas de la bilirrubina a medida que ésta fluye a través de los conductos. En tales condiciones, no hay urobilinuria e incluso se produce una obstrucción biliar temporaria e se lesiona el parénquima hepático, en esos casos se desarrolla urobilinuria a pesar de que la bilis no está llegando al intestino, no habiendo por lo tanto formación intestinal de urobilina.

Esta urobilinuria es más pronunciada en animales con una vesícula biliar sana que en animales con vesícula biliar enferma. Este hecho sugiere que puede haber una eliminación del pigmento desde dentro de la vesícula biliar normal, lo que está de acuerdo con la gran difusibilidad del pigmento y con el hecho de que las células de las paredes no se hallan alteradas por ninguna lesión.

Royer (loc.cit.) cita el caso de perros con fístula biliar y por tanto sin estercobilina en las heces, en los cuales encuentra una pequeña urobilinuria y le atribuye a una liberación de la urobilina acumulada en los órganos. Pero una objeción más importante es la del comportamiento anormal de animales con fístula de Eck, ya que si el hígado fija la urobilina que llega por la vía porta, al desviar ésta se debe esperar un aumento considerable de la urobilinuria, sin embargo este aumento no se observa e es muy pequeño según han comprobado, en 1928, Cornejo Saravia y Royer (28). Quizá podría explicarse este débil urobilinuria post-operatoria en base a una fijación de la mayor parte de la urobilina sanguínea por otros tejidos, en particular el muscular.

Conclusiones.--En la mayoría de los casos se puede afirmar que la urobilina urinaria tiene en origen en la estercobilina intestinal, la cual se origina por reducción bacteriana de los pigmentos biliares.

En algunos casos especiales la urobilina urinaria parecería que puede tener un origen extraintestinal.

BIBLIOGRAFIA

- (1) ROYER, M. La urobilina al estado normal y patológico. Tema. Trabajo del Institute de Fisiología de la Facultad de Ciencias Médicas, (1929).
La urobilina en el estado normal y patológico, 2a. edición, El Ateneo, (1943).
- (2) HAYEM, G. Sur la valeur diagnostique et pronostique de l'urobiline, Gaz. des Hop. 62, 1314, (1889). Citado por Royer.
- (3) FISSIER, P. De l'urobilinurie, Gaz. des Hop. 64, 745, (1891). Citado por Royer.
- (4) WINTER, J. Observations relatives a la recherche de l'urobiline dans la bile, G.R. Soc. Biol. 41, 139, (1889). Citado por Royer.
- (5) GILBERT, A. y MERSCHER, M. L'ictère hémaphérique, Presse Méd. 10, 1239, (1902).
- (6) GARRIE, P. L'urobiline. Recherches cliniques et experimentales, Thèse Faculté Médecine, Paris, (1914).
- (7) HOPPE-SYLER. Ueber die Ausscheidung des Urobilins in Krankheiten, Virchow's Arch. 124, 30 (1891). Citado por Royer.
- (8) WENCKE y SIPPER. Ueber das Hämastoporphyrin, Arch. Exptl. Path. Pharmacol. 24, 442, (1888). Citado por Royer.
- (9) HAYEM, G. De l'urobilinurie des tuberculeux, Soc. Méd. Hop. Paris, 11, 195, (1896). Citado por Royer.
- (10) AIELLO, G. Contributo sperimentale alle genemi dell'urobiline nei liquidi cistici, trascudati ed essudati, II Morgagni, 722, (1893). Citado por Lencire.

- (11) VIDAL, ABRAMI y BRULE. Les ictères d'origine hémolytique, Arch. Mal. Coeur. 1, 191, (1909). Citado por Boyer.
- (12) TROISIÈRE, J. Urobilinurie d'origine hémolytique, C.R. Soc. Biol. 66, 739, (1909).
- (13) KIMAN, R. y Mc MASTER, P.D. The relation between urobilin and conditions involving red cells destruction, J. Exptl. Med. 42, 619-640, (1925).
- (14) MULLER, P. Untersuchungen über Icterus, Z. Klin. Med. 12, 43, (1887)
- (15) TISSIER, P. Sur la pathogénie de la sécrétion biliaire, Thèse, (1889).
- (16) FISCHLER, P. Das Urobilin und seine klinische Bedeutung, Munch. Med. Wochenschr. 53, (1906). Citado por Boyer.
- (17) OSHIMA, M. The urine-, bile- and blood-urobilin bodies in cases of experimental hepatic disturbances, Japan. J. Gastroenterology 1, 67-70, (1911).
- (18) Mc MASTER, P.D. y KIMAN, R. Studies on urobilin physiology and pathology. II. Derivation of urobilin. Relation of the bile to the presence of urobilin in the body, J. Exptl. Med. 41, 511-534, (1925).
- (19) Mc MASTER, P.D. y KIMAN, R. III. Absorption of pigments of biliary derivation from the intestine, J. Exptl. Med. 41, 719-738 (1925).
- (20) KIMAN, R. y Mc MASTER, P.D. IV. Urobilin and the damaged liver, J. Exptl. Med. 42, 99-122, (1925).
- (21) MULLER, P. Ueber Icterus, Med. Abtheilung 1, (1892). Citado por Boyer.

- (22) WILTMANN, O. y LOEWENSTEIN, W. Wiener. Arch. Inn. Med. 6, 387, (1923).
- (23) BRINSAUD y BAUER, Recherches experimentals sur les relations de entre l'elimination des pigments biliaires, de l'urobilinone et de l'urobilinogen chez le lapin, C.R. Soc. Biol. 64, 809 (1908).
- (24) LABBE y GARRIE, L'urobilinurie, sa valeur semiologique. Ann. de Méd. 1, 643, (1914).
- (25) ROGER HOLLAN, O. The site of formation of urobilinogen in the intact human gastrointestinal tract, Gastroenterology 16, 418-424, (1950).
- (26) BRULE, M. Etude critique de la theorie enterohepatique de l'urobilinurie, Rev. de Méd. (1921)
- (27) Mc MASTER, P.D. y ELMAN, R. VI. The relation of biliary infections to the genesis and excretion of urobilin, J. Exp. Med. 43, 753-783, (1926).
- (28) CORNEJO SARAVIA, E. y ROYER, M. La urobilinemia de los perros privados de higado, Rev. Soc. Arg. Biol. 4, 27, (1928).
-

CAPITULO XI

UROBILINOGENOS. (UROBILINAS Y UROBILINOGENOS)

RELACIONES QUIMICAS Y FISIOLOGICAS.

ANTECEDENTES

Antiguamente se creía en la existencia de dos urobilinas distintas: la urobilina urinaria o urobilina y la urobilina fecal o stercobilina, estudios posteriores revelaron que ambas son idénticas y corresponden al mismo compuesto químico, pero se descubrieron dos nuevas urobilinas que difieren de la anterior y que son la urobilina IX \times y la dextrourobilina.

Royer (1), al hablar en su libro sobre la unidad de la urobilina, resume las teorías sobre la urobilina urinaria y la urobilina IX \times y decide rechazar de lleno, hasta tanto no se aporten pruebas definitivas, la existencia de un dualismo de la urobilina, considerando la aceptación de éste como una complicación gratuita de un asunto de por sí complejo.

El concepto antes enunciado es erróneo y en general la bibliografía sobre el tema es confusa y contradictoria en cuanto se refiere a la relación entre las diversas urobilinas y sus cromógenos, como a la nomenclatura de los mismos. Ello nos ha llevado a creer útil hacer una revisión de la relación de dichos compuestos entre sí como también de su origen biológico, en la medida que los investigadores han podido determinar. Asimismo, incluimos la estructura química de los diversos compuestos dado que ayuda a observar la relación existente entre ellos.

Las etapas fundamentales en el descubrimiento y estudio de las urobilinas, por orden cronológico, son las siguientes.

1868-1869: Jaffé (2) descubre un pigmento en la bilis y en la orina y lo denomina urobilina en razón de su presencia simultánea en orina y bilis.

1871: Van Laër y Magnus (3) aialan de las heces un pigmento, que suponen distinto del anterior, y lo denominan estercobilina. Durante un largo período se persiste en la creencia de la no identidad de la urobilina y de la estercobilina. En 1910, Descompe (4) inicia su tesis expresando que "...hidrobilirrubina, urobilina y estercobilina son los nombres sinónimos de una misma sustancia: el pigmento de Jaffé..." pero no aporta ninguna prueba al respecto. Finalmente, en 1932, se llega a las experiencias de Watson (5) que aclaran diversos interrogantes:

1932: Watson (5) logra obtener de las heces la estercobilina cristalizada.

1933: El mismo investigador (6) consigue extraer de la orina de un paciente con congestión hepática, una urobilina cristalizada y comprueba la identidad de la estercobilina y de la urobilina. En 1935, Watson (7) publica una extensa discusión acerca de dicha identidad y cita entre otras pruebas el hecho de que ambas sustancias dan el mismo producto de adición cristalizado con cloruro férrico, en el cual la razón N/Fe es de 4/1 la que indica la presencia de cuatro núcleos pirrólicos; otra prueba radica en que ambas pigmentos dan el mismo bromhidrato de cristales característicos.

1934: Neilmeyer y Krebs (8) corroboran la identidad demostrada por Watson (6).

1936: Siedel y Meyer (9) preparan una urobilina sintética y la denominan urobilina IX α , la cual se demostrará más tarde que es distinta de la urobilina (estercobilina).

1942: Watson y Schwartz (10) investigan la tercera forma de la urobilina, que difiere de la urobilina IX α y de la urobilina (esterobilina) en su poder rotatorio.

PIGMENTOS BILIARES. SU ORIGEN Y METABOLISMO (11)

La bilirrubina es el pigmento más importante de la biliar, contiene en su molécula cuatro núcleos pirrólicos sustituidos unidos en forma lineal, lo que revela su relación con el grupo prostético de la hemoglobina.

La biliverdina es la dehidrobilirrubina presente en la biliar, se denomina también úteroverdina por hallarse en la placenta de perros. Se la considera como precursora de la bilirrubina, a la cual originaría por reducción debido a la acción de sistemas enzimáticos.

El origen principal de la bilirrubina se halla en el hemo de la hemoglobina de los glóbulos rojos que se destruyen, pero también, aunque en menor proporción, puede provenir de otras sustancias que contienen el grupo hemo y son distintas de la hemoglobina. La contribución más importante a la producción de bilirrubina se debe al hígado, pero no se descarta la formación extrahepática como se comprueba en animales hepatectomizados, en los cuales hay aumento de bilirrubinemia.

En cuanto al mecanismo de la transformación se ha observado que la hemoglobina oxidada con peróxido de hidrógeno en presencia de ácido ascórbico origina una sustancia del grupo de los verde-hemo-cromógenos denominada coeoglobina. En este compuesto el núcleo tetrapirrólico se ha abierto, pero sigue unido a la globina y al hierro. La acción de los ácidos elimina al hierro y separa la globina, formándose

la biliverdina. Esta sustancia, por reducción, origina la bilirrubina. Todas estas experiencias son realizadas "in vitro", pero no existe la seguridad de que ocurren "in vivo".

El esquema A de la página 17 resume esta serie de transformaciones.

UROBILINOIDES. RELACIONES QUIMICAS Y FISIOLOGICAS.

Antiguamente se aceptaba que el mesobilirrubinógeno era el cromógeno de la urobilina urinaria, pero en 1936, Watson (12) obtiene por reducción de la estercobilina un cromógeno distinto del mesobilirrubinógeno al que denomina estercobilinógeno; éste es el verdadero cromógeno de la urobilina urinaria.

En 1938, Lemberg, Lockwood y Windham (13) estudian las diferencias que presenta el mesobilirrubinógeno y el estercobilinógeno (urobilinógeno), en la que se refiere a las bandas de absorción de los compuestos en solución alcohólica ácida. También estudian las diferencias que existen entre la urobilina $\text{IX } \alpha$ y la estercobilina (urobilina), que son los respectivos productos de oxidación de los anteriores cromógenos.

Los mismos autores afirman que la estercobilina (urobilina) forma, por lo menos, un 90% de las urobilinas totales de la orina normal y por lo menos, un 80% de las urobilinas totales de las orinas patológicas.

Por oxidación adecuada del estercobilinógeno (urobilinógeno) se obtiene la estercobilina (urobilina), en tanto que la oxidación al aire del mesobilirrubinógeno produce la urobilina $\text{IX } \alpha$. La nomenclatura de este compuesto se debe a que IX corresponde al número de la mesoporfirina de origen y α significa que al abrirse el ciclo se ha perdido el grupo $-\text{CH}_2-$ correspondiente al carbono α del núcleo tetrapirrólico.

Una de las diferencias que existen entre la estercobilina (urobilina) y la urobilina $\text{IX } \alpha$ es su comportamiento frente

al plano de la luz polarizada, pues mientras la primera es fuertemente levógiro la segunda es inactiva y no desvía dicho plano.

La tercera urobilina fué observada por Mc Munn (14) en 1889 y recién estudiada por Watson y Schwartz (10) en 1942, quienes observaron su presencia en muestras de bilis fistular humana infectada. En el mismo año, Schwartz, Shorov y Watson (15) observaron una formación parcial de esta urobilina, al añadir mesobilirrubinógeno a muestras de bilis humanas, libre e no de estereobilina (urobilina).

Esta tercera urobilina difiere de las anteriores en ser dextrógiro, y proviene de la oxidación de un dextrourobilinógeno.

Los mismos investigadores describen una reacción que parece ser específica para la dextrourobilina. A una solución en dioxano se agregan 1-2 gotas de ácido clorhídrico 10% y se calienta a baño de maría durante unos minutos, en presencia de dextrourobilina el color cambia sucesivamente de anaranjado a violado, luego a azul y finalmente a verde. La estereobilina (urobilina) no da reacción, la urobilina IX da primero color violado pero luego se decolora y la bilirrubina da color verde transitorio.

En 1939, Fischer y Libowitzky (16) por reducción esteo-lítica de la bilirrubina, y en 1942, Watson y Schwartz (17) por reducción con amalgamo de sodio de muestras de bilis fistular humana infectada, observan que el compuesto que se forma siempre es el mesobilirrubinógeno pero no el estereobilinógeno (urobilinógeno).

Esto hace suponer a Watson y Schwartz (17) que el mesobilirrubinógeno es el cromógeno primario, en tanto que el estercobilinógeno (urobilinógeno) y el dextroerobilinógeno son cromógenos secundarios.

Es por tanto probable la existencia de factores desconocidos en la bilis y en las heces, que regularían el proceso de formación de los cromógenos. El mecanismo sería el siguiente: una parte de la bilirrubina que llega al intestino es absorbida y el resto es reducida a mesobilirrubinógeno, éste es el cromógeno primario y por acción de sistemas enzimáticos de las bacterias y en presencia de un factor biliar origina el dextroerobilinógeno, mientras que en presencia de un factor biliar más un factor fecal origina el estercobilinógeno (urobilinógeno). Tanto en la orina como en las heces siempre existe algo de mesobilirrubinógeno junto con el estercobilinógeno (urobilinógeno). En el esquema B de la página 24 se pueden observar estas relaciones.

En 1951, Shorev, Jay y Watson (18) estudiaron el efecto de un antibiótico sobre la flora fecal y por tanto sobre la formación del estercobilinógeno (urobilinógeno). Hallaron que dosis terapéuticas de aureomicina producen una rápida desaparición del cromógeno en heces, bilis y orina; al mismo tiempo hay aparición de bilirrubina en las heces. Todo esto va asociado con la desaparición de organismos coliformes y con una disminución de clostridias en las heces. También hallaron el dextroerobilinógeno luego de una terapia extensa o luego de una interrupción reciente de la misma.

Esta desaparición del estercobilinógeno (urobilinógeno) motivada por un antibiótico consolida la teoría enterohepática y

el concepto de la formación bacteriana del urobilínogeno.

En 1951, Baumgärtel y Zahn (19) observan que la reducción de la bilirrubina a estercobilinógeno (urobilinógeno) por medio de una suspensión de células hepáticas, es inhibida por la aureomicina. Señalan también que la administración de estreptomicina en casos de enfermedad hepática no produce la desaparición de la urobilinogenuria, a pesar de la completa esterilización de las heces. Dichos autores afirman que el proceso normal de formación del estercobilinógeno (urobilinógeno) ocurre en el intestino, pero no descartan un posible origen parcial de carácter extraintestinal.

En 1954, Lowry y sus colaboradores (20) demuestran la reducción de mesobilirrubinógeno a estercobilinógeno (urobilinógeno) por acción de las bacterias fecales "in vivo" e "in vitro". La prueba más decisiva fué posible por el uso de pigmentos biliares marcados con H-15. La reducción se realizó en recipientes abiertos e en atmósfera de hidrógeno y dióxido de carbono.

Asimismo en 1954, Watson y sus colaboradores (21), obtienen una bilirrubina marcada con H-15 de un enfermo que padecía una grave ictericia hemolítica, el cual había recibido dosis diarias de terramicina durante un determinado período de tiempo, al cabo del cual se le administró una dosis de glicina marcada con H-15. Luego de unos días las heces contenían mucha bilirrubina y poco estercobilinógeno (urobilinógeno), por extracción de las heces se obtuvo esa bilirrubina marcada con H-15, la que se redujo a mesobilirrubinógeno con amalgama de sodio. Las bacterias fecales normales, actuando "in vitro", convirtieron el mesobilirrubinógeno en estercobilinógeno (urobilinógeno) luego de una incuba-

ción de 48 horas.

También realizaron una experiencia "in vivo". Un sujeto normal recibió unos mg. del mesobilirrubinógeno marcado con N-15 disueltos en solución diluida de carbonato de sodio, que le fué administrada por el tubo duodenal; de las heces evacuadas 50 horas más tarde se pudo aislar un estereobilinógeno (urobilinógeno) cristalizado que contenía una apreciable cantidad de N-15.

Los mismos autores expresan, en otra parte del mismo trabajo, que han observado la presencia de dextrourobilinógeno en las heces de personas tratadas con aureomicina o con terramicina; por reducción con amalgamo de sodio el dextrourobilinógeno produce mesobilirrubinógeno.

En el mismo trabajo se propone una reacción con cloruro férrico para diferenciar las tres urobilinas: con la dextrourobilina el reactivo da color verde, con la urobilina IX λ de color azul, en tanto que con la estereobilina (urobilina) no se observa color.

En 1956, Lowry y sus colaboradores (22) obtienen el dextrourobilinógeno cristalizado por dos caminos: a partir de las heces de pacientes que han recibido aureomicina o terramicina, por extracciones sucesivas con alcohol etílico y recristalizaciones de cloroformo, o bien por medio de una reducción breve con amalgamo de sodio de la dextrourobilina; si la reducción se prolonga se obtiene el mesobilirrubinógeno. En el trabajo original se pueden observar fotografías de los cristales de dextrourobilinógeno, cuya forma depende del solvente del cual se recristalizan.

En 1957, Gray y Nicholson (23) estudian un pigmento excre-

tedos en grandes cantidades por un paciente que sufría de talasemia (según los autores ésta es una enfermedad caracterizada por la presencia de una hemoglobina anormal). Dicho paciente no había recibido ninguna clase de antibióticos. El clorhidrato del pigmento en solución cloroformica era dextrorrotatorio y el pigmento parecía ser, en todos los aspectos, dextrourobilina.

La oxidación de dicho pigmento con ácido crómico convirtió al 34% del nitrógeno en amoníaco o en compuestos aminales lábiles, lo que indicaría la destrucción del núcleo tetrapirrólico; por cromatografía sobre papel de los productos restantes, se identificaron los siguientes compuestos: hematinimida, ácido succínico y metiletilmaleimida.

Los autores afirman que la dextrourobilina es un urobilinoide por sus propiedades físicas y químicas, pero no es la forma enantiomorfa de la estercobilina (urobilina); la dextrourobilina es isómera con la mesobilirrubina y con la mesobiliviolina. (C₃₃H₄₂N₄O₆).

En base a los datos experimentales y a consideraciones de orden teórico, los autores proponen una estructura para la dextrourobilina, la cual puede observarse en el esquema B de la página 24.-

TERMINOLOGÍA MODERNA

Finalmente, creemos que sería de gran valor que toda la bibliografía adoptase una nomenclatura general para nombrar los diversos compuestos mencionados en este capítulo.

Con tal objeto, ofrecemos a continuación la terminología que consideramos más moderna y apropiada, subrayando los términos que deben emplearse y colocando entre paréntesis los vocablos sinónimos. Hemos tomado dicha nomenclatura de la adoptada recientemente por Watson y sus colaboradores (loc. cit.) y de la empleada por With (24).

Se denomina urobilinoides a todos los compuestos urobilínicos (pigmentos y cromógenos); el término urobilinas se utiliza para los pigmentos y el término urobilinógenos se reserva para los cromógenos.

Urobilina (bilanos).

l-urobilina (urobilina IX α , mesobilano b)

d-urobilina (urobilina dextrorrotatoria)

l-urobilina (estereobilina, tetrahidromesobilano b)

Urobilinógenos (bilanos)

l-urobilinógeno (urobilinógeno IX α , mesobilirrubinógeno, mesobilano)

d-urobilinógeno (cromógeno de la d-urobilina)

l-urobilinógeno (estereobilinógeno, tetrahidromesobilano)

En adición a estos términos suele denominarse k-urobilina a la obtenida "in vitro" a partir del mesobilirrubinógeno.

En la terminología anterior, l significa ópticamente inactivo, d significa dextrógiro y l significa levógiro.

BIBLIOGRAFIA

- (1) ROYER, M. La urobilina en el estado normal y patológico, 2a. edición, El Ateneo, (1943).
- (2) JAFFE, N. Ueber die Fluorescenz des Harnfarbstoff, Zentralb.med. Wissen. 7, (1869). Citado por Royer.
- (3) VAN LAIR y MASIUS, Zentralb.med. Wissen. 2, 465, (1871). Citado por Garrod y Hopkins.
- (4) DESCOMPS, P. Sur un nouveau procede de dosage de l'urobilin et de la stercobilin, Thèse, Paris, (1910).
- (5) WATSON, G.J. An improved method for the isolation of crystallinestercobilin, J. Biol. Chem. 105, 469-472, (1934).
- (6) WATSON, G.J. Isolation of crystalline urobilin from human urine, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 30, 1210, (1933).
- (7) WATSON, G.J. Crystalline stercobilin or urobilin, Z. physiol. Chem. 211, 39-58, (1935).
- (8) HEIMFYER, L. y KIEBS, W. Ueber krystallisiertes Urobilin, Z. physiol. Chem. 228, 46-49 (1934).
- (9) BIEDL y MEIER. Synthesis of urobilin (urobilin IX α), Z. physiol. Chem. 242, 101-132, (1936).
- (10) SCHWARTZ, S. y WATSON, G.J. Isolation of a d-rotatory urobilin from human bile, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 49, 641-643, (1942).
- (11) DEJLOFFU, V. y MAIENZI, A.D. Curso de Química Biológica, 7a. edición, El Ateneo, (1953).
- (12) WATSON, G.J. The origin of natural crystalline urobilin (stercobilin), J. Biol. Chem. 114, (1936).

- (13) LEMBERG, S., LOCKWOOD, W. y WYNDHAM, R.A. Urobilins and urobilinogens, Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci. 16, 169-180, (1938).
- (14) Mc MUNN, C.A. On the origin of urobilinogen and of normal and pathological urobilin in the organism, J. Physiol. 10, 71, (1889).
- (15) SCHWARTZ, S., SBOROV, V. y WATSON, C.J. Formation of d-urobilin from mesobilirubinogen in human bile, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 49, 643-647, (1942).
- (16) FISCHER, H. y FISOWITZKY, H. Bile pigments. XXVI. Stercobilin, Z. Physiol. Chem. 258, 255, (1939).
- (17) WATSON, C.J. y SCHWARTZ, S. Nature of urobilin obtained after amalgam reduction of human fistula bile, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 49, 636-640 (1942).
- (18) SBOROV, V., JAY, A.R. y WATSON, C.J. Effect of aureomycin on urobilinogen formation and the fecal flora, J. Lab. Clin. Med. 17, 52-59 (1951).
- (19) BAUMGARTEL, T. y ZAHN, D. The influence of aureomycin on bacterial and cellular enzymes, Klin. Wochschr. 29, 646 (1951).
- (20) LOWRY, P., ZIEGLER, N., CARDINAL, A. y WATSON, C.J. The conversion of H-15 labeled mesobilirubinogen to stercobilinogen by fecal bacteria, J. Biol. Chem. 208, 543-548, (1954).
- (21) WATSON, C.J. LOWRY, P., COLLINS, S., GRAHAM, A. y ZIEGLER, N. The intestinal formation and interrelationship of members of the urobilinogen group with special reference to the d-rotatory form, Trans. Assoc. Am.

Physicians 67, 242-249, (1954).

- (22) LOWRY, P. CARDINAL, R., COLLINS, S. y WATSON, C.J. The isolation of crystalline deuterobilinogen, J. Biol. Chem. 218, 641 (1956).
- (23) GRAY, G.H. y NICHOLSON, D.G. Structure of 4-urobilin, Nature 180, 136-137, (1957).-
- (24) WITH, T.K. Biology of bile pigments, pág. 17. Ed. Arne Frost-Hansen, Copenhagen, (1954).



CAPITULO III

URBILINAS

PROPIEDADES. METODOS DE INVESTIGACION Y DE VALORACION.

UROBILINAS. PROPIEDADES

Watson (1) ha preparado una urobilina cristalizada a partir de la bilirrubina; se forma primero i-urobilinógeno, al cual se deshidrogena por la acción de yodo en éter de petróleo y se origina i-urobilina, la que pasa a la fase acuosa en tanto que el yodo permanece en la fase etérea.

El proceso es el siguiente: se añaden 0.2 ml. de hidróxido de sodio 0.1 N y 0.8 ml. de agua destilada a 50 mg. de bilirrubina, se agita la mezcla durante una hora con 5 g. de amalgama de sodio al 4%, luego se diluye con agua destilada, se agregan 100 ml. de éter de petróleo, se acidifica la fase acuosa a pH 5.0-6.0 con 4 partes de ácido acético y 1 parte de solución saturada de acetato de sodio y se determina el i-urobilinógeno en 1 ml. de la mezcla, pues por cada mg. de dicho compuesto se deben añadir 0.45 mg. de yodo. La cantidad calculada se agrega en cuatro porciones de 50 ml. de agua destilada y se agita. Los extractos acuosos se acidifican con ácido clorhídrico 7.5 N hasta llegar a una acidez aproximadamente 1 N y se extrae entonces con cloroformo, luego se concentra el extracto al vacío hasta un volumen de 1 ó 2 ml. y al diluir con acetona caliente se obtiene el clorhidrato del pigmento con un rendimiento de 32%. El compuesto así obtenido es ópticamente inactivo, es decir que se trata de i-urobilina.

En presencia de sales de cinc las urobilinas presentan una fluorescencia verde. En 1910, Descomps (2) estudió diversas sales de cinc y recomienda el uso del valerianato y del acetato, aunque en la práctica otorga alguna preferencia al primero. Por otra parte, Waits (3) aconseja el uso del acetato, del valerianato y del lactato observando que el empleo del cloruro, del sulfato y del

carbonato básico no da buenos resultados; afirma que la sensibilidad es mayor si se espera 1 ó 2 horas antes de filtrar.

El uso del cloruro puede dar lugar a error cuando la muestra contiene una cantidad apreciable de fosfatos, pues al alcalizar la orina con hidróxido de amonio para formar el complejo amoniacal de cina precipita el fosfato de cina en copos blancos esquelados, con reflejos que pueden tomarse como fluorescencia.

Dicha causa de error desaparece cuando se emplea el acetato pues esta sal se usa siempre en medio ácido, en el cual el fosfato de cina es soluble.

En 1932, Dhéré y Roché (4) observaron que el uso de las sales de cina permite distinguir la L-urobilina del i-urobilinógeno y de la mesobiliviolina, pues la primera presenta una fluorescencia verde claro en tanto que el i-urobilinógeno y la mesobiliviolina producen una intensa fluorescencia amarillo verdoso.

En 1933, Audert y Heilmeyer (5) señalan que la oxidación altera las propiedades ópticas de la L-urobilina, lo que permite determinar espectrofotométricamente varias fases de oxidación. La extinción característica a todas las fases se produce para una longitud de onda de 4900 Å, siendo menor que para la forma no oxidada; la absorción máxima se corre hacia el rojo y se produce para una longitud de onda de 5100 Å cuando la urobilina en solución ácida o alcohólica se convierte en su forma aleulina por edición de hidróxido de sodio o de amonio a la solución.

En 1954, Yoshida (6) estudió la L-urobilina y la i-urobilina en sus formas indirectas (como ácido libre) y halló que sus espectros de absorción son idénticos, teniendo el máximo en 4940 Å trabajando en solución cloroformica; por saponificación de las formas indirectas con potasa alcohólica se obtienen las formas directas (como éster), las cuales no presentan un máximo de absor-

ción.

Siempre que se encuentre el término "urobilina" (o "pigmento") en las páginas restantes de este capítulo y del siguiente, debe entenderse que nos referimos a la l-urobilina, que constituye la casi totalidad de las urobilinas urinarias, y a la i-urobilina, que solo representa una pequeña fracción de las mismas. Si empleamos el término "urobilina" (o "pigmento") es solo por comodidad de escritura.

La misma salvedad puede hacerse para el término "urobilinógeno" (o "aromógeno"), el cual indica que nos referimos al l-urobilinógeno y al i-urobilinógeno, insistiendo en el hecho de que el primero constituye la casi totalidad de los urobilinógenos urinarios mientras que el segundo representa una pequeña proporción de los mismos.

MÉTODOS DE INVESTIGACION

e) técnicas por espectroscopia.

e,1.- Método de Denigés, 1897. (7)

Emples el "reactivo al sulfato mercurico" que se prepara disolviendo 5 g. de óxido mercurico en 20 ml. de ácido sulfúrico 17%. Se añade 1 vol. de reactivo por cada 2 vol. de orina, se agita, deja reposar y filtra para separar las combinaciones mercuricas insolubles. El filtrado se observa al espectroscopio.

e,2.- Método de Florence, 1910. (8).

Emples un reactivo constituido por 50 g. de piridina, 50 g. de alcohol etílico y 50 g. de cloroformo; se añaden 2 vol. de reactivo por cada vol. de orina. Se agita, deja reposar y se observa la capa cloroformica al espectroscopio.

b) técnicas por fluorescencia.

b,1.- Método de Nivo, 1894. (9)

Se mezclan volúmenes iguales de orina y de alcohol etílico. Se decanta la fase alcohólica y se añaden unos cristales de cloruro de cinc y luego hidróxido de amonio. Una fluorescencia verde denota urobilina.

b,2.- Método de Lépinois, 1897 (10).

Se añade 1 vol. de cloruro de cinc 10% por cada 4 vol. de orina, luego se agrega 1 vol. de hidróxido de amonio 25% y se filtra. Una fluorescencia verde indica urobilina. Este método es útil en el caso de orinas fuertemente pigmentadas, pues los pigmentos extraños quedan retenidos sobre el filtro con el precipitado de hidróxido de cinc.

b,3.- Método de Lemaire, 1905. (11)

Se emplea un reactivo formado por 1 g. de cloruro de cinc, 30 ml. de alcohol etílico de 90°, 30 ml. de alcohol amílico e hidróxido de sodio en cantidad suficiente para redissolver el precipitado de hidróxido de cinc que se forma en un comienzo; se añaden 3 vol. de reactivo por cada vol. de orina y se filtra. Una fluorescencia verde denota urobilina.

b,4.- Método de SCHLESINGER, 1903 (12).

Se mezclan volúmenes iguales de alcohol etílico y de orina acidificada, se añaden cristales de acetato de cinc y se agita para facilitar la oxidación del urobilinógeno. Se filtra y se observa el filtrado en la oscuridad con una fuerte iluminación lateral.

b,5.- Método de Kirkpatrick, 1953, (13).

Se extrae el complejo de cinc-urobilina con cloroformo y se observa el extracto a la luz ultravioleta, una fluorescencia amarillo-oro indica urobilina, una fluorescencia azul o blanca es negativa, la bilirrubina da color amarillo al cloroformo pero no presenta fluorescencia. Para examinar pequeñas cantidades de urobilina se destruye el complejo en una porción del extracto agregando un cristal de ácido tricloroacético y se compara con otra porción igual del extracto pero a la cual no se ha agregado dicho ácido.

c) técnicas por extracción previa del pigmento.

c,1.- Método de Mehd, 1878. (14).

Se acidifica la orina con ácido sulfúrico 3 N y se satura con sulfato de amonio. El pigmento precipita y se separa por filtración, se disuelve en alcohol etílico de 96° calentado a 50°C y sobre la solución se procede según a) ó b).

e, 2.- Método de Mc Munn, 1880 (15)

Se filtra la orina sobre subacetato y acetato de plomo. El precipitado se trata con alcohol etílico acidificado con ácido sulfúrico H_2SO_4 , el extracto alcohólico se agita con cloroformo para extraer el pigmento, el cual se obtiene dejando evaporar el cloroformo.

e, 3.- Método de Nencki y Sieber, 1882, (16)

Se mezclan 2 vol. de alcohol amílico con 1 vol. de orina acidificada con ácido clorhídrico y se agita, el extracto alcohólico se investiga según a) ó b)

e, 4.- Método de Grimbert, 1888. (17)

Se mezclan volúmenes iguales de orina y de ácido clorhídrico concentrado. Se calienta, se deja enfriar y se extrae con éter etílico. Sobre el extracto se procede según a) ó b).

e, 5.- Método de Kraus, 1896 (18)

Se basa en el hecho de que el fenol mezclado con la orina y calentado a 90° extrae la urobilina y otros pigmentos. Se deja reposar, se decanta la capa fenólica y se extrae con éter etílico. El extracto etéreo se investiga según a) ó b).

e, 6.- Método de Roman y Delluc, 1900 (19)

Se extraen 100 ml. de orina, acidificada con ácido clorhídrico, con 20 ml. de cloroformo. A este extracto se añade una solución de acetato de cinc 0.1% en alcohol etílico de 96° .

e, 7.- Método de Grimbert, 1904 (20).

A 30 ml. de orina se añaden 20 ml. del reactivo al sulfato mercuríco, se deja reposar 5 minutos y se filtra. El filtrado se extrae con 5 ml de cloroformo y el extracto se añade una solu-

ción alcohólica de acetato de cine. El método es adecuado para orinas ricas en pigmentos biliares y en indoxilo.

e,8.-Método de Auché, 1907, (21)

Se extrae la urobilina con cloroforme tintado al 15% aprovechando el gran poder extractor del timol. Se añaden 2 ml. del reactivo a 15 ml. de orina acidificada, se agita, se decanta la fase cloroformica y se añade una solución alcohólica saturada de acetato de cine.

e,9.-Método de Grigut, 1909. (22)

Es similar al método de Auché, pero antes de extraer oxida el cromógeno con una solución constituida por 5 gotas de cloruro férrico oficial, 20 ml. de ácido acético 10% y 80 ml. de agua destilada.

e,10.-Método de Gautier y Monod, 1909. (23)

A 10 ml. de orina acidificada con ácido acético se añaden 5 gotas de tintura de yodo 1% y se extrae con 1 ml. del reactivo de Auché, se agita, se decanta y se añade a la fase cloroformica un volumen igual de una solución de acetato de cine 0.6% en alcohol etílico de 96°.

Los métodos espectroscópicos son prácticos pero no lo suficientemente sensibles como para revelar la urobilinaria fisiológica.

Los métodos que investigan la fluorescencia y que emplean el acetato de cine en medio ligeramente ácido son los mejores.

La principal objeción que se puede hacer a dichos métodos es la no especificidad del ensayo, puesto que diversas sustancias presentan fluorescencia con las sales de cine e son naturalmente

to fluorescentes, tales como riboflavina, cariflavina, fluoresceína, eosina, quinina, mercurocroma, methicilate, etc.

MÉTODOS DE VALORACION

e) técnicas espectrométricas.

a,1.- Método de Hancock, 1891. (24)

Se observa la banda de absorción correspondiente a la urobilina, examinando los líquidos bajo espesores variables. Se determina bajo que espesor puede observarse netamente la banda característica y por medio de tablas preparadas anteriormente se calcula el contenido de urobilina.

a,2.- Método de Gautrelet, 1896, (25)

Use un aparato de invención propia al que denomina uropigmentómetro, que consiste en un espectroscopio de espesor variable, graduado de modo que el contenido de urobilinas por litro de orina se lee sobre un disco horizontal.

a,3.- Método de Müller-Gerhardt, 1899. (26)

Se precipita la bilirrubina y otros pigmentos con una mezcla de 1 vol. de solución saturada de cloruro de calcio y 2 vol. de solución saturada de hidróxido de bario. En el filtrado se elimina el exceso de hidróxido de bario con sulfato de sodio, se filtra nuevamente y el filtrado se acidifica con ácido sulfúrico y se satura con sulfato de amonio. La urobilina precipitada se separa, se seca y se disuelve en una mezcla de éter y de alcohol etílico. La solución se valora en el espectroscopio.

a,4.- Método de Tsuchiya, 1910. (27).

Es similar el método anterior pero emplea para la observación final el espectrofotómetro de Marten.

a,5.- Método de Wilbur y Addis, 1914. (28).

Se recoge la orina en la oscuridad durante 24 horas y se mide el volumen total emitido, añadiendo timol como conservador. Se toman 10 ml. del total y se mezclan con 10 ml. de solución alcohólica saturada de acetato de cinc, se filtra y se agrega 1 ml. de reactivo de Ehrlich e 10 ml. del filtrado. Se deja en reposo 10 minutos y luego se observa en el espectroscopio, haciendo diluciones progresivas del filtrado hasta observar la desaparición de la banda de absorción del pigmento. (Con este método se pueden valorar simultáneamente urobilina y urobilínogeno).

b) técnicas fluoroscópicas

b.1.- Método de Viglezio, 1891 (29).

La orina acidificada con ácido sulfúrico se satura con sulfato de amonio. Se separa el pigmento y se disuelve en alcohol etílico, esta solución se vierte en una probeta que contiene una solución de cloruro de cinc 1% en alcohol etílico de 60° alcalizado con hidróxido de amonio, hasta que el líquido presente una fluorescencia verde.

b.2.- Método de Grimm, 1893 (30).

La orina acidificada se extrae con cloroformo e acetato de etilo, el solvente se evapora y el residuo se trata con hidróxido de amonio. Se agrega cloruro de cinc para provocar la fluorescencia y se diluye la solución hasta observar la desaparición de la fluorescencia.

b.3.- Método de SCHLESINGER, 1903. (loc. cit.)

Se añade 1 vol. de solución alcohólica de acetato de cinc a 2 vol. de orina, la solución obtenida se diluye con alcohol etílico o agua hasta llegar a la fluorescencia límite. El autor

recomienda usar siempre la misma fuente luminosa.

b, 4.- Método de Descomps, 1910. (loc. cit.)

La orina acidificada con ácido sulfúrico se trata con solución yodo-yodurada para oxidar el cromógeno, se agrega sulfato de amonio y se deja en reposo por 2 horas, luego se extrae con alcohol amílico. El extracto alcohólico se vierte, gota a gota, sobre una solución de valerianato de cinc iluminada con una lámpara de arco, hasta observar la aparición de una fluorescencia verde que no presente turbiedad.

Esto es lo que el autor denomina fluorescencia límite y corresponde a 1 mg. de urobilina por litro de solución.

b, 5.- Método de Marcussen y Hansen, 1918. (11)

Se miden 10 ml. de orina en un tubo I y se añaden 3 gotas de tintura de yodo 1%, se agita, se toma 1 ml. de la mezcla y se coloca en un tubo II. Se añaden al tubo I 9 ml. de alcohol absoluto y 1 g. de acetato de cinc, se filtra luego que la sal se disuelve y se observa el filtrado. Si la dilución 1/2 es fluorescente se añaden a II 3 ml. de agua, 1 ml. de solución acuosa de acetato de cinc 20% y 5 ml. de alcohol absoluto, se filtra y si el filtrado 1/10 es fluorescente se hace una dilución 1/20 y si también ésta es fluorescente se efectúan diluciones 1/40 y 1/80.

El valor 1/10 es normal, el 1/20 es el límite para urobilinuria fisiológica, el 1/40, el 1/80 y mayores diluciones indican afecciones hepáticas.

Antes de iniciar el ensayo la orina se debe acidificar con ácido acético, neutralizando previamente si la orina es muy ácida.

La proporción de alcohol etílico no debe ser menor de 50%.

b, 6.- Método de Pincussen, 1922, (12).

Prevece la fluorescencia igual que en el método de Schlesinger y la compara con la que poseen una serie de diluciones crecientes de una solución de fluoresceína 1/1000. El método permite reconocer aproximadamente 0.1 mg. de urobilina en 100 ml. de solución.

b, 7.- Método de Adler y Schubert, 1922. (33)

Prevece la fluorescencia por el método de Schlesinger y diluye el filtrado con una solución alcohólica de acetato de cinc hasta que la fluorescencia desaparece. En ese instante la concentración de la urobilina es de 0.085 mg. por 100 ml. de solución.

b, 8.- Método de Descomps, Griffon y Broussé, 1924. (34).

Se oxida el cromógeno con una solución yodo-yodurada 5% usando una solución de almidón soluble como indicador. Se defeca la orina con alcohol etílico de 96°, se filtra y el filtrado se mezcla con un volumen igual de una solución alcohólica saturada de acetato de cinc. La solución así obtenida se diluye con solución de hidróxido de sodio N en alcohol etílico de 45° hasta igualar la fluorescencia de un testigo de urobilina pura.

En otro trabajo, los autores (35) describen un aparato para efectuar la valoración. Se trata de una caja oscura que posee dos recipientes a través de los cuales pasa un haz de rayos luminosos que proviene de una lámpara de 200 bujías, en un recipiente se coloca la solución a valorar y en el otro el testigo. La solución a valorar se diluye con agua destilada hasta igualar la fluorescencia del testigo.

b, 9.- Método de Flinn y Mc Master, 1925. (36)

Se acidifican ligeramente 25 ml. de orina y se añade una solución saturada de acetato de cinc en alcohol etílico de 96° hasta

llevar el volumen de la solución a 50 ml., luego se agrega 1 g. de la sal sólida para asegurar un exceso, se agita, se filtra y se agrega al filtrado 1-2 gotas de tintura de yodo para oxidar el cromógeno.

Cuando la bilirrubinuria es intenso se agrega cloruro de calcio en medio alcalino, se separa el bilirrubinato de calcio por centrifugación y se toman 25 ml. del líquido sobrenadante. Para efectuar la valoración se colocan 15 ml. de una solución de dilución constituida por 50 g. de acetato de cinc, 2000 ml. de alcohol etílico de 60° y 2 ml. de ácido clorhídrico concentrado, en tubos de igual diámetro, a los cuales se añaden cantidades crecientes: 0,50, 0,55 y 0,60 ml. de la solución fluorescente obtenida. Se compara entonces con la solución testigo de scriflavina contenida en tubos que se hallan colocados alternadamente a 3 cm. de los anteriores. Ambas series de tubos se ubican en una caja a la cual llega la luz de una lámpara de 200 wattios que está colocada a 1 metro de distancia por debajo de la caja. Los tubos se examinan por una hendidura lateral.

La solución madre que se emplee contiene 1 mg. de scriflavina en 1000 ml., mientras que la solución testigo se prepara diluyendo 1 ml. de la anterior, con agua destilada, hasta 30 ml.

b, 10.-Método de Royer, 1929. (37)

Consta de dos etapas, en la primera se provoca la fluorescencia en el líquido que se va a valorar, mientras que en la segunda se efectúa la valoración. En el caso de una orina el proceso es el siguiente.

la. operación.- Si la orina contiene pigmentos biliares se alcaliza con solución saturada de carbonato de amonio y se

añade solución de cloruro de calcio e de bario 10% en cantidad igual al volumen de orina, luego se filtra.

A 10 ml. de orina o del filtrado anterior, se añaden 2 gotas de tintura de yodo 3% y unos cristales de acetato de cinc, se lleva a 20 ml. con alcohol puro o saturado con acetato de cinc, se agita y se filtra hasta obtener un líquido límpido.

2a. operación. Se emplea un aparato diseñado por el autor, que consiste en una caja de forma rectangular dividida por un tabique horizontal, el cual tiene dos perforaciones que permiten el paso de los rayos luminosos provenientes de una lámpara colocada en la cámara inferior. Estos rayos atraviesan longitudinalmente a dos tubos que contienen la solución de dilución, sobre la que se agrega el líquido a valorar. Para que el eje de los tubos coincida con el eje de los rayos luminosos se intercala una lámina perforada entre el tabique horizontal y la tapa, ésta posee dos perforaciones del mismo diámetro que las de la lámina pero más separadas entre sí, de forma que los tubos quedan formando un ángulo agudo. Para mayores detalles de construcción puede consultarse la publicación original.

La solución madre que se emplea contiene 10 mg. de triptoflavina en 1000 ml. y la solución testigo se prepara diluyendo 5 ml. de la anterior hasta un volumen de 1000 ml., con agua destilada.

Se puede apreciar que la solución testigo de Royer es muy similar a la de Elman y Mc Master, ya que poriflavina y triptoflavina son los nombres sinónimos de una misma sustancia, y haciendo los cálculos correspondientes se observa que la

concentración de dicha sustancia es de 0.050 gammas por ml. en la solución testigo de Royer y de 0.033 gammas por ml. en la solución testigo de Elman y Mc Master.

La solución de dilución debe colocarse a la urobilina en las condiciones ópticas para su fluorescencia, esto se logra cuando la urobilina se halla en una solución que contiene 50% de alcohol etílico y 2.5% de acetato de cinc, según Marcussen y Hansen, y un pH de 6.0, según Elman y Mc Master.

La solución de dilución que emplea Royer tiene también un pH de 6.0 pero posee mayor poder buffer que la solución de dilución de Elman y Mc Master, y esta constituida por 25 g. de acetato de cinc, 70 g. de acetato de sodio, 4 ml. de ácido clorhídrico concentrado y alcohol etílico de 80° en cantidad suficiente para llevar el volumen final de la solución a 1000 ml.

Para realizar la valoración se comienza por verificar el aparato, para lo cual se coloca la solución testigo en ambos tubos y se observa si la fluorescencia es igual en ambos, si no lo es se varía la posición de la fuente luminosa hasta lograr la igualdad. Luego se vacía uno de los tubos y se coloca en su interior una cantidad medida de solución de dilución, sobre la cual se vierte la solución a valorar con una pipeta de 1 ml. graduada al 1/100 agregando gota a gota hasta igualar la fluorescencia del testigo. Se lee el volumen empleado y se procede al cálculo correspondiente.

La fluorescencia de 1 ml. de la solución testigo equivale a la de 0.0128 gammas de urobilina. Este valor fué determinado por el autor por comparación de la solución testigo con una solución de urobilina cristalizada.

En 1940, Oester y López García (38) valoran la fluorescencia del

testigo con el fotómetro de Pulfrich, en el que se mide la fluorescencia, la reflexión y la absorción de la luz, y estiman el valor equivalente de 1 ml. de la solución testigo en 0.0136 gammas de urobilina.

b,11.- Método de Belotov, 1936.(39)

Se mezclan 3 ml de orina acidificada, con un volumen igual de alcohol etílico de 96° y se añaden 3 g. de sulfato de cinc y 1 gota de tintura de yodo, luego que el sulfato de cinc se ha disuelto se filtra y se recibe el filtrado en un tubo de fondo plano de 15 x 50 mm.

Dicho tubo se coloca sobre el condensador de un microscopio y se resguarda de la fuente luminosa mediante una cartulina. El condensador se ilumina totalmente con ayuda del espejo y el cono de luz se observa a través del tubo. En presencia de urobilina el cono luminoso, cuyo ancho se regula con el diafragma, se observa coloreado de verde. El límite de sensibilidad es de 0.085 mg. de urobilina por 100 ml. de solución.

Para realizar una valoración aproximada se colocan 3 ml. de acetato de cinc 10% en alcohol etílico de 50° en un tubo similar al anterior y sobre esta solución se añade lentamente el filtrado fluorescente, usando una pipeta de 1 ml. graduada al 1/100, hasta observar una débil fluorescencia. Se efectúa el cálculo considerando el límite de sensibilidad antes mencionado.-

BIBLIOGRAFIA

- (1) WATSON, G.J. The direct preparation of crystalline urobilin from bilirubin, J.Biol.Med. 200, 691, (1953).
- (2) DESCOMPS, P. Sur un nouveau procede de dosage de l'urobiline et de la stercobiline, Thèse, Paris, (1910).
- (3) WEITZ, R. Use of the various zinc salts on the characterization of urobilin, J.Pharm.Chim. 1, 533-538, (1910).
- (4) DHERY, G. y ROCHE, G. The fluorescence and specially the fluorescent spectra of the pigments of the urobilin group, Bull. Soc.Chim.Biol. 13, 987-992, (1931).
- (5) RULBERT y HEILMEYER. Spectrophotometric studies on urobilin, Biochem. 1, 145, 336-352, (1933).
- (6) YOSHIOKA, T. Spectrochemical studies on bilirubinsoids, Igeku Kenkyu 24, 1395, (1954), C.A. 49, 1121, (1955).
- (7) DENIGES, M.G. Recherche sur l'urobiline, C.R.Soc.Biol. 49, 289, (1897)
- (8) FLORENCE, A. Recetif chimique de l'urobiline, de l'urobilinogen et du sang, J.Pharm.Chim. 2, 160, (1910).
- (9) RIVA, A. Ges.med.di Torino, (1894). Citado por Royer.
- (10) LEPINOIS, M.E. Recherche de l'urobiline et des pigments biliaires, J.pharm.chim. 189, (1897).
- (11) LEMAIRE, L. L'urobiline, sa valeur semiologique, Thèse, Paris, (1905).
- (12) SCHLESINGER, W. Zur klinischen Nachweis des Urobilins, Deut.Med. Wochschr. 29, 561, (1903). C.Z. 3, 855, (1903).

- (13) KIRKPATRICK, H. A modified Schlesinger test for urobilin in urine, Langst 264, 71, (1953).
- (14) MFHU, G. L'urobiline, Bull. de l'Acad. de Med. 7, 761, (1878)
Citado por Lencire.
- (15) Mc MUNN, G.A. Proceeding of the King Society, London, (1880).
- (16) MFHCKI y SIEBER. Z.prakt.Chem. 26, 336, (1882). Citado per Reyer.
- (17) GRIMBERT, L. Sur un nouveau mode de recherche de l'urobiline dans l'urine, J.pharm.Chim. 481, (1888).
- (18) KRAMM, W. Deut. med. Wochschr. 22, 25, (1896)
- (19) ROMAN, T. y DELLUC, G. Sur la recherche de l'urobiline dans l'urine, J.pharm.Chim. 49, (1900).
- (20) GRIMBERT, L. Recherche de l'urobiline dans les urines, J.pharm.Chim. 425, (1904).
- (21) AUCHT, A. Sur un nouvelle methode pour rechercher et separer l'urobiline et son chromogene, C.R.Soc.Biol. 61, 713, (1903)
- (22) BRICAUT, A. Recherche de l'urobiline dans le sang et les humeurs de l'organism, C.R.Soc.Biol. 66, 725-727, (1909).
- (23) GAUTIER, G. y MONOD, O. Procede de recherche des corps du groupe de l'urobiline dans l'urine, C.R.Soc.Biol. 66, 211, (1909).
- (24) HENOCQUE, A. Spectroscopie de l'urine et des pigments, (1891)
Citado per Descomps.
- (25) GAUTRELET. Technologie de l'urobiline, Rev.Maladies de la Nutrition, 450, (1896). Citado per Descomps.

- (26) MULLER y GERHARDT. Z.Klin.Med. 12, 103, (1889).
- (27) TSUCHIYA, Beitrage zur Frage der Urobilin ausscheidung, Z.Exptl. Path.Thes. 7, 352, (1910).
- (28) WILBUR, R.L. y ADDIS, T. Urobilin, its clinical significance, Arch.Int.Med. 11, 235, (1914).
- (29) VIGLEZIO, A. Sulla patogenesi dell'urobilinuria. Studio clinico. Lo Sperimentale 45, 225, (1891).
- (30) GRIMM, F. Ueber Urobilin im Harn, Virchow's Arch. 112, 246, (1893).
- (31) MARCUSSEN, S. y HANSEN, S. The determination of urobiline in urine, J. Biol. Chem. 16, 381-389, (1918).
- (32) PINCUSSEN, L. Quantitative Schatzung des Urobilins, Deut.med. Wochschr. 48, 1074-1075, (1922).
- (33) ADLER, A. y SCHUBERT, E. Ueber Urobilin bestimmung in den Fäces, Biochem.Z. 114, 533-540, (1922).
- (34) DESCOMPS, GOIFFON y BROUSSER, Methode pour la determination de l'urobiline, C.R. Soc. Biol. 90, 490-492, (1924).
- (35) DESCOMPS, GOIFFON y BROUSSER, Dosage de l'urobiline urinaire, C.R. Soc. Biol. 90, 554-556, (1924).
- (36) HEMAN, R. y Mc MASTER, P.D. Studies on urobilin physiology and pathology. I. The quantitative determination of urobilin, J. Exptl. Med. 41, 503-512, (1925).
- (37) HOYER, M. Le urobilina en el estado normal y patológico, 2a. edición El Ateneo, (1943).
- (38) CASTEL, M.R. y LOPEZ GARCIA, A. Estudio de una técnica para el dosage de la urobilina por fluorescencia utilizando el

refleómetro de Zeiss aplicado al fotómetro de
Pulfrich, Anales del Instituto de Investigaciones
Físicas aplicadas a la patología humana, 17-16,
(1940).

(39) BOLOTOV, M.P. Determination of urobilin with the aid of a
microscope on the basis of fluorescence, Laborn-
tarnes Dale 2, n° 3, 18-19, (1956).



CAPITULO IV

PROPIEDADES,

MÉTODOS DE INVESTIGACION Y DE VALORACION

UROBILINOGENOS. PROPIEDADES

En 1911, Fischer (1) obtuvo el 1-urobilinógeno cristalizado por el siguiente procedimiento. Se parte de una orina patológica que posea reacción de Ehrlich fuertemente positiva, se acidifica con ácido acético hasta reacción ácida al tornasol y se extrae varias veces con cloroforme agitando fuertemente en cada oportunidad. Se separa la fase cloroformica y se concentra al vacío hasta consistencia siruposa, se disuelve el volumen restante en una pequeña cantidad de acetato de etilo y se filtra. Luego de un reposo de 24 horas se obtienen los cristales del cromógeno.

En 1923, Fischer y Niemann (2) obtuvieron el 1-urobilinógeno a partir de la bilirrubina. Se prepara una solución de bilirrubina, se alcaliza con hidróxido de sodio y se reduce con hidrógeno en presencia de paladio coloidal. La solución anterior se acidifica y se extrae con cloroforme, este extracto se trata con éter de petróleo, se separan ambas fases y se evapora el extracto etéreo. El residuo que se obtiene se recristaliza de acetato de etilo y se obtienen los cristales de cromógeno.

Deulofen y Marenni (3) señalan que el 1-urobilinógeno es una sustancia cristalizada, soluble en agua, cuyas soluciones en cloroforme o en éter etílico no presentan ninguna banda de absorción característica cuando son observadas al espectroscopio. Dicho cromógeno se transforma en 1-urobilina por acción de la luz, del oxígeno del aire y de otros oxidantes, tales como el peróxido de hidrógeno y la tintura de yodo.

Schrumpf (4) afirma que el principal factor en la oxidación del cromógeno a pigmento es la reducción bacteriana de los

nitratos a nitritos, en la cual se libera oxígeno que sería el verdadero factor oxidante; el microorganismo actuante es el colibacilo.

El 1-urobilinógeno reacciona con una solución de para-dimetilaminobenzaldehído para dar un compuesto de color rojo violado, lo que constituye la reacción de Ehrlich.

Marensi, Cardini, Vilallonga y Banfi (5) manifiestan que la coloración roja fué atribuida en un principio a los compuestos del indol pero Neubauer demostró en 1903 que se debía al urobilinógeno.

Es importante señalar que la reacción también se produce con el 1-urobilinógeno obteniéndose el mismo color rojo violado.

En condiciones normales el 1-urobilinógeno forma la casi totalidad de los cromógenos urinarios, pudiendo haber o no una pequeña cantidad de 1-urobilinógeno, pero en condiciones patológicas la proporción de este último puede aumentar apreciablemente.

Las investigaciones de Gösman (6) le han permitido establecer la naturaleza del producto que se forma al tratar las orinas normales con el reactivo de Ehrlich, la técnica es la siguiente. La orina de emisión reciente se concentra hasta 1/8 de su volumen calentando a ebullición en atmósfera de dióxido de carbono y se trata con una solución de para-dimetilaminobenzaldehído de 2.5% en ácido clorhídrico 25%. Se deja en reposo 30 minutos y se añade a la orina una solución saturada de carbonato de sodio hasta obtener un pH de 6.0, se extrae con cloroformo y el

extracto se concentra al vacío. El volumen restante se seca sobre sulfato de sodio y se filtra a través de una columna corta de alúmina, el filtrado se evapora a sequedad y el residuo se disuelve en benceno y la solución así obtenida es cromatografiada sobre una columna de alúmina. En el comienzo de la columna se forma una zona de color rojo intenso seguida por una de color amarillo que se debe al reactivo de Ehrlich, la primera zona es eluida con una mezcla de cloroformo y benceno, la solución se evapora y el residuo se recristaliza de una mezcla de acetona y agua, obteniéndose agujas finas de color rojo granate, que descomponen a 231°C. Se atribuye al pigmento la siguiente composición: 2-(para-dimetilaminobenziliden) pseudoindoxile: oxidando al pigmento con una mezcla de ácido nítrico y ácido dicrómico se obtiene isatina.

En un trabajo posterior, el mismo autor (7) señala que el pigmento identificado antes es el producto que resulta de calentar una orina normal con el reactivo de Ehrlich y presumiblemente representa un producto de condensación del indoxile, indican^{DO} o triptofano metabolizados, en tanto que el producto rojo que se forma en frío al adicionar el reactivo de Ehrlich a una orina patológica es distinto del anterior y se debe a los diversos cromógenos urinarios.

Según los estudios de Makagawa (8) en 1953 y los estudios posteriores de Yamada y colaboradores (9) en 1956, la adición del clorhidrato de para-dimetilaminobenzaldehído ocurre posiblemente sobre el punto metilénico central del cromógeno, que sería el más activo, y va acompañada de deshidrogenación en las cadenas laterales, dando como resultado que el núcleo ben-

cénico del para-dimetilaminobenzaldehído se transforma en un núcleo del tipo para-quinona, mientras que el cromógeno se convierte en pigmento por oxidación del puente metilénico central.

Por otra parte, los autores mencionados señalan que la reacción no se produce si hay una adición previa de formaldehído.

Hemos extraído de Levinson-Mc Fete (10) y de Fisher (11) la interpretación clínica de las variaciones que se pueden observar en el contenido de urobilinoídes urinarias.

El aumento de urobilinoídes obedese principalmente a dos factores:

- a) incapacidad de la célula hepática para transformar los urobilinoídes que llegan desde el intestino por vía porta. Dicha incapacidad se presenta en todas las formas de cirrosis, en las hepatitis, en las lesiones hepáticas por acción de toxinas, venenos e medicamentos, en enfermedades infecciosas agudas e crónicas, en el carcinoma hepático, etc.
- b) formación excesiva de urobilinoídes consecutiva a procesos de destrucción sanguínea exagerada. Dichos procesos se verifican en la ictericia hemolítica, en la anemia perniciosa, en la absorción de derrames e infartos hemorrágicos, etc.

La disminución o ausencia de urobilinoídes se observa en los trastornos renales graves como en el caso de las nefritis avanzadas e bien en la ictericia hepática obstructiva la cual puede deberse a la presencia de cálculos o a compresiones tumorales. En el primer caso hay una producción elevada de urobilinoídes pero el riñón está incapacitado para eliminarlos, mientras que en el segundo caso no se pueden formar los urobilinoídes pues los pigmentos biliares no llegan al intestino.

MÉTODOS DE INVESTIGACION

1.- Método de Ehrlich, 1901 (12)

Se añade a la orina una solución de para-dimetilaminobenzaldehído 2% en ácido clorhídrico 1 N. Una coloración roja revela la presencia del cromógeno.

2.- Método de Charas, 1909. (13)

La orina acidificada con ácido tartárico se extrae con éter etílico, se agregan al extracto étereo unos mg. de para-dimetilamino ensaldehído sólido y 5 gotas de ácido clorhídrico concentrado, se agita y se añaden 2 ó 3 ml. de agua. Si se halla presente el cromógeno se desarrolla una coloración violada que presenta una banda de absorción en 5670-5520 Å.

3.- Método de Kusni y Kosima, 1939 (14).

Emplean un reactivo de la siguiente composición: 2 g. de para-dimetilaminobenzaldehído, 60 ml. de ácido clorhídrico concentrado y 100 ml. de agua. La reacción se efectúa agregando 10 gotas del reactivo a 5 ml de orina, se agita y se observa el color luego de 5 minutos. De acuerdo a la intensidad del color la reacción se clasifica según el siguiente criterio.

Color original de la orina o anaranjado..	ensayo negativo (-)
anaranjado rojizo.....	dudoso (+)
rojo claro.....	débil (•)
rojo.....	positivo (++)

4.- Método de Klein, 1942, (15)

Se mezclan 5 ml. de orina con 5 ml. del reactivo de Schlesinger y se filtra, haciendo que al extremo del embudo quede

apoyado sobre la pared de un tubo de ensayos que contiene 2-3 ml. del reactivo de Ehrlich. Los líquidos deben formar dos capas superpuestas, de modo que en la zona de contacto se observe la formación de un anillo de color rojo en caso de que el cromógeno se halle ligeramente aumentado, o una banda de 2-3 mm. de color rojo oscuro si el cromógeno se halla en mayores concentraciones. Si hay urobilina se desarrolla una fluorescencia verde en la capa superior.

Todos los métodos son modificaciones de la reacción original de Ehrlich. Los autores proponen diversas variaciones del reactivo de Ehrlich en cuanto a su composición cuantitativa pero utilizan siempre las sustancias indicadas por Ehrlich. (loc.cit.).

Dichas modificaciones se traducen en una variación muy amplia en los valores de la concentración final de para-dimetilamino-benzaldehído y de ácido clorhídrico, como se puede observar en el siguiente cuadro, que presenta algunas de las variantes del reactivo de Ehrlich que se emplean en los métodos de valoración y de investigación.

Técnico de	Concentración en el reactivo de		Volumen de reactivo ml.	Volumen de orina ml.	Concentración final de	
	p-dim.	ClH			p-dim.	ClH
	g.º ml.				g.º ml.	
Wallace-Diamond	2.0	20.0	1.0	10.0	0.18	1.8
Naumann	1.0	36.0	0.15	2.0	0.07	2.5
Sperkman	6.6	18.0	1.0	10.0	0.60	1.6
Watson	0.28	22.0	2.5	2.5	0.14	11.0
Wilson Davidson	0.87	6.0	1.0	5.0	0.14	1.0

El reactivo empleado por Wilson y Davidson (16) tiene la siguiente composición: 4 g. de para-dimetilamino ensaldehído, 100 ml. de alcohol absoluto y 80 ml. de ácido clorhídrico concentrado.

La objeción más importante que puede hacerse a la reacción de Ehrlich es la de su poca especificidad, ya que un número elevado de sustancias dan una coloración similar al reaccionar con el reactivo de Ehrlich.

En 1938, Haumann (7) publicó un extenso estudio sobre sustancias que interfieren en el ensayo, especificando su comportamiento frente al calentamiento, a la adición de acetato de sodio y a la extracción con éter etílico y con éter de petróleo, y divide a las sustancias según sean:

- a) excretadas en condiciones normales: l-urobilinógeno, indol, fenol, etc.
- b) excretadas en condiciones patológicas: l-urobilinógeno, triptofano, proteínas y derivados, etc.
- c) drogas administradas: morfina, riboflavina, acriflavina, piridina, etc.

Las sustancias nombradas con solo una parte del gran número que se mencionan en el trabajo original, pero muchas de ellas dejan de interferir en el ensayo de acuerdo a las condiciones en que se realice.

En 1949, Wilson y Davidson (loc.cit.) publican una lista de compuestos que interfieren con el reactivo de Ehrlich a los que agrupan según el siguiente esquema.

- a) sustancias que dan reacción positiva falsa.

1.- Reaccionan a temperatura ambiente: porfobilinógeno, protoporfomas y derivados, fenazona, indol, etc.

2.- Reaccionan por calentamiento: triptofano, fenol, fenacetina, morfina, etc.

3.- Reaccionan con el ácido clorhídrico del reactivo: uroscina, urofuscina, piridina, fenilhidracina, etc.

b) sustancias que inhiben la reacción.

Otros aldehidos, uretrepina, albúmina, suero, mucus, ácido e álcali en exceso, etc.

c) sustancias que enmascaran la reacción.

Urea, indicano, bilirrubina, sulfenamidas, extractos de ruibarbo y de senna, etc.

Como se puede observar la gama de compuestos que, en una forma u otra, interfieren con el reactivo de Ehrlich es muy amplia, pero volveros a insistir que en condiciones de trabajo apropiadas la lista anterior se reduce notablemente.-

MÉTODOS DE VALORACION

1.- Método de Charnas, 1909, (loc. cit.)

De acuerdo al autor, la reducción de urobilina a urobilinógeno se verifica fácilmente por fermentación alcalina de la orina. Para ello se alcaliza la orina con carbonato de amonio y se favorece la fermentación dejando en estufa a 37°C durante 24-48 horas. Luego se acidifica la orina con ácido tartárico, se filtra, el filtrado se extrae dos veces con éter etílico y al extracto se lava varias veces con agua. El urobilinógeno se hace reaccionar con el reactivo de Ehrlich y la intensidad del color desarrollado se determina espectrofotométricamente, obteniéndose un valor que representa el contenido de urobilinógeno más el de urobilina. Si se omite la fermentación alcalina el valor obtenido corresponde al contenido de urobilinógeno y por diferencia se tiene el contenido de urobilina.

2.- Método de Platow y Brunell, 1913. (17)

Se acidifican 10 ml. de orina con ácido tartárico y se extrae con 50 ml. de éter etílico, se separa la fase etérea y se le agregan 4 ml. de una solución de para-dimetilaminobenzaldehído al 1% en éter etílico, se agita, se añaden 8 gotas de alcohol absolute saturado con ácido clorhídrico y luego una pequeña cantidad de agua. Se observa la fase acuosa con un fotocolorímetro Autenrieth-Koenigsberger y se usa como testigo una solución de feniltaleína 1/50000 alcalizada con carbonato de sodio.

3.- Método de Wilbur y Addis, 1914 (18).

Se recoge la orina y se conserva en la oscuridad. Se mezclan 10 ml. de orina con 10 ml. de alcohol etílico saturado de

acetato de cinc, se filtre y se añade al filtrado 1 ml. de reactivo de Ehrlich. Se deje en reposo 15 minutos y se observe en un espectroscopio Citrón, el líquido a valorar se diluye hasta que desaparece la banda de absorción del producto coloreado que se forma en la reacción de Ehrlich. En base a las diluciones efectuadas se calcula la concentración de urobilinógeno. (Si se determina la desaparición de la banda de absorción del complejo cinc-urobilina se pueden determinar simultáneamente urobilina y urobilinógeno).

4.- Método de Wallace y Diamond, 1925, (19).

Se añade 1 ml. de una solución de para-dimetilaminobenzaldehído al 2% en ácido clorhídrico 20% a 10 ml. de orina, se deja estar 2-3 minutos y se observa el color que se desarrolla, cuya intensidad puede dar una idea de la concentración de cromógeno. Un color rojo claro indica valores normales, pero si el color es mas intenso se preparan diluciones de 1 ml. de orina en 20, 30, 40, 50, 100 ml. de agua e en mayores cantidades si fuera necesario y se agrega 1 ml. del reactivo indicado antes a 10 ml. de cada una de las diluciones. Luego de 5 minutos se observe cual es la dilución en la que aún se puede apreciar el color rojo de la reacción de Ehrlich, la concentración de urobilinógeno se expresa en función de esa dilución. La aparición de color hasta la dilución 1/20 se considera normal.

5.-Método de Terwen, 1925. (20)

La valoración comprende cuatro operaciones: a) reducción del pigmento a su cromógeno, b) extracción del cromógeno formado, c) reacción de Ehrlich y d) colorimetría del color desarrollado en la operación anterior.

A 80 ml. de orina se añaden 20 ml. de una solución reciente de sal de Mohr al 16% y luego, lentamente y agitando, 20 ml. de una solución de hidróxido de sodio 12%. La mezcla se coloca en un frasco cerrado, evitando que quede una cámara de aire para prevenir la reoxidación del urobilinógeno; se deja en reposo 24 horas, se filtra y se recibe el filtrado en un frasco de color caramelo. Las operaciones siguientes deben realizarse sin interrupción.

Se miden 20 ml. de filtrado anterior, se acidifican con una solución de ácido tartárico 20% y se extrae con 40 ml. de éter etílico que ha sido purificado por repetidos lavados con hidróxido de sodio 30% y con agua. Se separa la fase éterea y se lava varias veces con agua, se miden 30 ml. y se agitan con 3 ml. de una solución saturada de para-dimetilaminobenzaldehído en éter etílico y con 10 gotas de ácido clorhídrico concentrado, luego se agregan 4-5 ml. de una solución saturada de acetato de sodio que tiene por objeto eliminar el exceso de ácido clorhídrico.

El color rojo desarrollado se compara con un testigo que se prepara mezclando 1 ml. de solución alcohólica de fenoltaleína 0.05% con 5 ml. de solución saturada de carbonato de sodio, diluyendo con agua destilada hasta un volumen final de 100 ml. Por comparación contra soluciones de urobilina pura, Terwen estima el valor del testigo equivalente a 0.406 mg. de urobilina por cien ml. de solución mientras que Watson trabaja con productos más puros y le asigna un valor de 0.387.

El autor realiza una serie de pruebas y afirma que el urobilinógeno no es absorbido por el precipitado de hidróxido ferroso, que su extracción por el éter etílico es completa y que reacciona cuantitativamente con la solución de para-dimetilaminobenzaldehído.

Sin embargo, Royer (21) manifiesta que durante el proceso de reducción y posterior reposo de 24 horas, se puede destruir una proporción grande del cromógeno debido a su gran labilidad.

7.- Método de Heilmeyer y Kroba, 1931. (22)

La técnica es similar a la de Terwen pero se prefiere acidificar el filtrado con ácido acético glacial en vez de emplear ácido tartárico como en la técnica original, presiguiendo luego en forma similar hasta obtener la solución coloreada. La determinación se realiza con el fotómetro de Pulfrich, usando el filtro 8-53 y una cuba de 20 mm. de espesor, utilizando agua destilada como líquido de compensación.

8.- Método de Watson, 1931. (23).

El autor introduce como variante fundamental el uso de una solución de sulfato ferroso 20% en vez de la solución de sal de Mohr al 16%, y de una solución de hidróxido de sodio 10% en lugar de la solución al 12% que se usan en la técnica de Terwen. Operando en esta forma por una parte se acorta el tiempo de reducción a 1 hora pues la concentración de sulfato ferroso es mayor, ya que tiene un valor de 4.0% en la solución reductora que usa Watson y un valor de 2.3% en la que emplea Terwen; por otra parte se elimina la destrucción de cromógeno al disminuir la alcalinidad de la solución y el período de reducción, lo que fué comprobado por Royer (loc.cit.) quien investigó el método de Watson en la misma forma que lo hizo con el de Terwen.

La técnica es la siguiente. Se recoge la orina durante 24 horas en botellas que contienen 20-30 ml. de una solución alcohólica saturada de ácido salicílico, la muestra se conserva en la oscuridad y al fin de la recolección se mide el volumen total. Si la

erina contiene bilirrubina se elimina añadiendo 100 ml. de una solución saturada de hidróxido de sodio y 1-2 ml. de una solución de hidróxido de sodio 10% a 200 ml. de erina, se agita bien la mezcla y se filtra.

Se vierten 100 ml. de erina exenta de bilirrubina e del filtrado anterior en un frasco de succión que contiene 5 g. de sulfato ferroso disueltos en 23 ml. de agua destilada, se agregan luego 23 ml. de solución de hidróxido de sodio 1% en pequeñas porciones y con agitación constante, se hace el vacío en el frasco y se deja estar durante 1 hora en la oscuridad, luego se filtra. Si se requiriese una reducción suplementaria del filtrado se realiza con una pequeña cantidad de amalgama de sodio al 5%.

El volumen de filtrado que se extrae con éter etílico es variable y depende de la concentración del cromógeno, de modo que se sensibiliza el método reduciendo el número de extracciones al mínimo. Para determinar dicho volumen se añaden a 2 ml. de filtrado un volumen igual de un reactivo constituido por 0.7 g. de para-dimetilaminobenzaldehído, 150 ml. de ácido clorhídrico concentrado y 100 ml. de agua destilado. Luego de agitar la mezcla anterior se agregan 4 ml. de una solución saturada de acetato de sodio y se observa el color desarrollado, si es muy intenso se extraerá con éter etílico 1 ml. de filtrado, si es rojo pálido se extraerán 3-10 ml., si es rosa débil se extraerán 10-25 ml. y si no hay coloración se extraerán 50 ml. .

El volumen así determinado se acidifica con 0.4 ml. de ácido ascórtico 20% por cada ml. de filtrado, se agita durante 3 minutos con 40 ml. de éter etílico, se separa la fase etérea y se lava varias veces con agua destilada. Se añaden entonces 3 ml. de una

solución etérea de para-dimetilaminobenzaldehído y 10 gotas de ácido clorhídrico concentrado y se agita durante 2 minutos, se agregan 5 ml. de agua destilada y 3 ml. de una solución saturada de acetato de sodio y se vuelve a agitar. La solución acuosa coloreada se separa y se repite la extracción con 5 gotas de ácido clorhídrico concentrado, 2 ml. de agua destilada y 2 ml. de la solución saturada de acetato de sodio hasta no obtener más extracción del producto coloreado.

Los líquidos coloreados se mezclan y una porción se coloca en una de las cubas de un colorímetro Dubosq e de un bicolorímetro Klett, que es el usado por el autor, y en la otra cuba se coloca una solución testigo que es idéntica a la empleada por Terwen.

9.- Método de Watson, 1936 (24).

Ademas de emplear la misma variante que en el método de 1931 se introduce otro cambio fundamental que es el uso de éter de petróleo en lugar de éter etílico, con ello se elimina la reoxidación del cromógeno que puede ocurrir aún usando éter etílico libre de peróxidos pues se cree que en la orina hay sustancias que en contacto con el éter etílico dan lugar a la formación de peróxidos, lo que no puede ocurrir con el éter de petróleo. Por otra parte la extracción con este solvente es cuantitativa, pues si la solución ya agotada con éter de petróleo se extrae con otros solventes y se efectúa en estos extractos la reacción de Ehrlich se comprueba la ausencia de cromógeno.

La técnica es la siguiente. Se colocan 25 ml. de orina en un matraz de Erlenmayer y se agregan 25 ml. de solución de sulfato ferroso 20% y luego 25 ml. de solución de hidróxido de sodio 10% agitando con--

tantemente; luego de 1 hora el filtrado no debe mostrar la banda de absorción de la urobilina en 5080 Å. Una pequeña porción del filtrado se ensaya cualitativamente como se indicó en el método anterior, para determinar el volumen de filtrado que se va a usar. El volumen así determinado se coloca en una ampolla de decantación y se lleva a 20 ml. con agua destilada en caso de que el volumen empleado fuese menor que esa cantidad. Se añaden 20-30 ml. de éter de petróleo purificado y acidificado fuertemente con ácido acético glaciale. (El solvente purificado se prepara dejando en contacto el producto comercial durante varios días con ácido sulfúrico concentrado, luego se lava con agua varias veces y se destila recogiendo la fracción que pasa entre 30 y 60°C) La mezcla anterior se agita, se separa la fase éterea y se extrae dos veces más la fase acuosa, los extractos se reúnan y se lavan con agua destilada.

El extracto éterea se agita con 1-2 ml. del reactivo que se usa en el ensayo cualitativo y con 2 ml. de una solución saturada de acetato de sodio con lo que se provoca el desarrollo del color, se separa la fase acuosa y se vuelve a agitar la fase éterea con las mismas cantidades de los reactivos antes indicados hasta que se extrae todo el cromógeno. Las emulsiones que pudieran formarse se rompen con alcohol etílico de 96°.

La determinación se efectúa en el colorímetro Hellige-Dunnin, comparando la solución a valorar con el vidrio standard, fabricado por la misma casa, que se usa para la determinación de fenolsulfonftaleína en orina y que ha sido calibrado contra soluciones de cromógeno cristalizado.-

El autor señala que esta técnica es aproximada ya que los ensayos de recuperación de cromógeno cristalizado añadido a diversas orinas varían entre 70 y 87% pero los resultados que se obtienen son de gran valor técnico en todos los casos de trastornos hepáticos.

10.-Método de Sparkman, 1939, (25)

La técnica es simple y rápida pues se suprime la extracción etérea. La muestra se recoge en botellas de vidrio de color caramelo que contienen 100 ml. de éter de petróleo y 5 g. de carbonato de sodio; los pigmentos biliares se precipitan agregando 2 g. de cloruro de calcio por cada 50 ml. de orina, se agita y se filtra.

A 10 ml. de orina azenta de pigmentos biliares, o del filtrado anterior, se añade 1 ml. de un reactivo constituido por 10 g. de para-dimetilaminobenzaldehído, 75 ml. de ácido clorhídrico concentrado y 75 ml. de agua.

Se agita la mezcla, se deja estar 10 minutos y valora en un colorímetro, usando el testigo apropiado.

Los testigos se obtienen mezclando cantidades convenientes de una solución de cloruro úrico 4% y de otra de bromuro de sodio 10%, se preparan tres concentraciones elegidas de modo que cubran la totalidad de las determinaciones del cromógeno. Los tres testigos se preparan del siguiente modo:

- a) concentrado: se mezcla 1 vol. de la solución de cloruro úrico con 1 vol. de la solución de bromuro de sodio y se diluye a 15 vol. con agua destilada. Equivale a 8.2 mg. de urobilinógeno por cien ml.
- b) intermedio: se diluye 1 vol. del testigo anterior con 1 vol. de agua destilada. Equivale a 2.4 mg. de urobilinógeno por cien ml.
- c) débil: se diluye 1 vol. del testigo anterior con 1 vol. de agua destilada. Equivale a 0.9 mg. de urobilinógeno por cien ml.

Los valores de los testigos fueran evaluados por comparación colorimétrica con testigos de cromógeno cristalizado disuelto en solu-

ciones diluidas de carbonato de sodio y tratado con el reactivo antes indicado.

11.-Método de Schwartz, Sberov y Watson, 1944. (26)

Vamos a omitir la descripción de esta técnica pues será tratada detalladamente en la parte experimental.

Solo comentaremos ahora algunas observaciones que se hallan en la publicación original que no están relacionadas con la técnica en sí.

Para calibrar el colorímetro fotoeléctrico que se usa en esta técnica, nosotros hemos utilizado en la parte experimental una serie de diluciones de una mezcla de colorantes, cuyo empleo recién se describe en el método de Watson, Schwartz, Sberov y Bertie.

En la técnica original de Schwartz, Sberov y Watson la curva de calibración se prepara con diversas diluciones del cromógeno que se hacen reaccionar con el reactivo de Ehrlich y se examinan en el colorímetro fotoeléctrico con lo cual se obtiene una serie de lecturas. Representando en un gráfico las concentraciones de cromógeno frente a las lecturas obtenidas, se tiene construida la curva de calibración.

Como los autores han hallado que la intensidad de la absorción de los compuestos 1-urobilinógeno- y 1-urobilinógeno-aldehído son idénticas cuando se miden con el filtro de 5650 Å, es evidente que para la preparación de la curva de calibración se puede emplear indistintamente uno u otro de los cromógenos mencionados.

Dichos cromógenos pueden obtenerse de la siguiente forma. Se extrae la 1-urobilina presente en las heces o se prepara la 1-urobilina por oxidación al aire de una solución en ácido clorhídrico del 1-urobilinógeno obtenido según el método de Fischer (loc.cit.), luego de

completarse la oxidación se extrae la solución con cloroformo, se evapora el extracto al vacío y el residuo se recristaliza de acetona.

Los cristales de L-urebilina o de D-urebilina, obtenidos en la forma indicada, se pesan en una microbalanza y se disuelven en alcohol etílico, luego se procede a la reducción con sulfato ferroso e hidruído de sodio, se filtra y se efectúa la reacción de Ehrlich, finalmente se hacen las diluciones y con éstas se prepara la curva de calibración.

Los autores han realizado una serie de ensayos para estudiar la eficacia del método. Así han comprobado que el D-urebilingeno y el L-urebilingeno son cuantitativamente extraídos por el éter de petróleo en tanto que las sustancias extrañas que reaccionan con el reactivo de Ehrlich permanecen en la fase acuosa. Expresan asimismo que la pureza del acetato de sodio que se emplea es muy importante en el desarrollo del color, debiendo usarse una sal muy pura. Afirman también que la relación óptima entre los volúmenes de solución saturada de acetato de sodio y de solución de para-dimetilaminobenzaldehído que se agregan al extracto etéreo es de 3 a 1.

12.-Método de Watson, Schwartz, Eberov y Martie, 1944. (27)

Por las mismas razones antes expuestas, no describiremos la técnica de este método pues también se estudia en la parte experimental.

Es una variante muy simplificada del método anterior, de modo que se pierde especificidad pero se obtiene el resultado en breve tiempo.

En la publicación original se describe la preparación de la serie de diluciones de una mezcla de colorantes que mencionáramos antes, dicha serie puede servir para calibrar un colorímetro fotoeléctrico e para ser empleada como un juego de testigos en una colorimetría visual.



BIBLIOGRAFIA

- (1) FISCHER, H. Sur Kenntnis der Gallenfarbstoffe, I Mittel, Z. Physiol. Chem. 71, 204, (1911).
- (2) FISCHER, H. y NIEMANN, G. Bile pigments, Z. Physiol. Chem. 127, 117-128, (1923).
- (3) DELOUPHEU, V. y MARENZI, A.D. Curso de Química Biológica, 7a. edición, ed. El Ateneo, (1953).
- (4) SCHRUMPF, A. Urobilinogen and urobilin, Z. Ges. Exptl. Med. 79, 564-568, (1932).
- (5) MARENZI, A.D., CARDINI, G., VILALLONGA, F., y BANFI, R. Bioquímica Analítica Cuantitativa, edición, ed. El Ateneo, (1947).
- (6) GOSSNER, W. The chemical nature of the pigment formed in normal urine with Ehrlich's aldehyde reagent, Z. Physiol. Chem. 282, 262-267, (1947).
- (7) GOSSNER, W. Chemical investigations of Ehrlich's aldehyde reaction on normal urine, Klin. Wochschr. 26, 567-568, (1948).
- (8) NAKAGAWA, J. Mechanism of the color reaction of urobilinogen with Ehrlich's aldehyde reagent, Izaku Kenkyu 21, 1670-80, (1953).
- (9) YAMAGAKI, K., KOSAKA, K., NAKAGAWA, J., YADA, H. y HOSOKAWA, M. Bile pigments, Mechanism of Ehrlich's aldehyde reaction of urobilinogen, Prog. Jap. Sci. Acad. 12, 412-416 (1956)
- (10) LEVINSON, S.A. y Mac PATE, R.P. Diagnóstico Clínico de Laboratorio, pág. 111-116, 4a. edición, ed. El Ateneo (1956).

- (11) FISHER, A. Laboratorio (Análisis Clínicos), págs.43-44, 6a. edición, ed. El Ateneo, (1954).
- (12) EHRLICH, P. Ueber Dimethylamidobenzaldehydreaktion, Deut. Med. Wochschr. 151, (1901).
- (13) CHARNAS, D. Ueber die Darstellung das Verhalten und die quantitative Bestimmungen des Reinen Urobilin und Urobilinogen, Biochem. Z. 20, 401-430, (1909)
- (14) KUSMI, K. y KOSIMA, M. The p-dimethylaminobenzaldehyde test for urobilinogen in the urine, Acta Med. Nagasakiensis 1, 139, (1939).
- (15) ELKIN, F. A simple test for small quantities of urobilinogen in the urine, Chem. Zentr. 2, 1160, (1943)
- (16) WILSON, T.M. y DAVIDSON, L. Ehrlich's aldehyde test for urobilinogen, Brit. Med. J. 1, 884-889, (1949).
- (17) FLATOW y BEUNELL. Eine Klinischeinfache Methode quantitative Urobilinogen Bestimmung, Munch. Med. Wochschr. 60, 234, (1913).
- (18) WILBUR, R.L. y ADDIS, T. Urobilin, its clinical significance. Arch. Int. Med. 11, 235, (1914).
- (19) WALLACE, G.B. y DIAMOND, J.S. The significance of urobilinogen in urine as a test for liver function with a description of a simple quantitative method for its estimation. Arch. Int. Med. 15, 698-725, (1925).
- (20) TERWEK, A.J. Ueber ein neues Verfahren zur quantitativen Urobilin Bestimmung in Harn und Stuhl, Deut. Arch. Klin. Med. 149, 72, (1925).

- (21) ROYER, H. La urobilina en el estado normal y patológico, 2a. edición, El Ateneo, (1943).
- (22) HELMEYER, L. y KREBS, W. Die quantitative Bestimmung des Urobilins und Urobilinogens mit dem Zeisschen Stephanphotometer, Biochem.Z. 211, 293-298 (1911).
- (23) WATSON, C.J. The average daily elimination of urobilinogen in health and in disease, with special reference to pernicious anemia. Standardisation of method based on mesobilirubinogen, Arch. Int. Med. 47, 698-726, (1911).
- (24) WATSON, C.J. Studies of urobilinogen, I. An improved method for the quantitative estimation of urobilinogen in urine and feces, Am. J. Clin. Path. 6, 458-473, (1916)
- (25) SPARKMAN, E. A simple and rapid method of quantitative determination of urobilinogen in stool and in urine, Arch. Int. Med. 61, 858-866, (1919).
- (26) SCHWARTZ, S., SBOROV, V. y WATSON, C.J. Studies of urobilinogen. IV. The quantitative determination of urobilinogen by means of the Evelyn photoelectric colorimeter, Am. J. Clin. Path. 14, 598-604, (1944).
- (27) WATSON, C.J., SCHWARTZ, S., SBOROV, V. y BERTIE, E. Studies of urobilinogen. V. A simple method for the quantitative recording of the Ehrlich reaction as carried out with urine and feces, Am. J. Clin. Path. 14, 605-613, (1944).
-

CAPITULO V

RESULTADOS EXPERIMENTALES

PLAN DE TRABAJO

Recientemente, numerosos autores coinciden en el hecho de que las técnicas colorimétricas, tales como el método de Ferron (1) y sus modificaciones, son superiores en exactitud a las técnicas fluorométricas, dentro de las que se hallan el método de Schlesinger (2) y sus variantes.

Marexni, Gardini, Benfi y Vilallonga (3) sostienen que los métodos basados en la extracción del cromógeno son los únicos exactos pero no son aplicables a los ensayos en serie de tipo clínico, en tanto que los métodos donde se evita la extracción son más prácticos, pero sólo se obtienen resultados aproximados. Señalan asimismo, la mayor precisión de los métodos colorimétricos respecto de los procesos fluorométricos.

With (4) manifiesta que los métodos más correctos de valoración son los basados en la medida de los cromógenos y que los métodos que valoran los urobilinas tienen el inconveniente de que los cromógenos deben ser oxidados antes de la valoración, lo cual involucra inevitables pérdidas.

Por otra parte, señala que la prueba de la fluorescencia es muy sensible y que se elegirá por lo tanto la valoración fluorométrica cuando se deben analizar pequeñas cantidades de material con escaso contenido de urobilinoídeos, pero como en el caso de la orina humana se dispone de suficientes cantidades como para efectuar la extracción, es preferible la determinación de los cromógenos.

Si ha comenzado la oxidación de los urobilínógenos, With (5) afirma que las urobilinas formadas se deben reducir a sus

eremógenos, pero este proceso también involucra algunas pérdidas. Por ello, algunos autores han propuesto determinar las urobilinas y los eremógenos remanentes por separado, pero la técnica insume mucho tiempo y no existe seguridad de obtener resultados más exactos que con el método de reducir todos los urobilinoídeos a eremógenos.

Sin embargo, a pesar de las opiniones favorables al empleo de los métodos colorimétricos, siempre fueron relegados a un segundo plano, pues antiguamente había una extensa lista de sustancias extrañas que reaccionaban con el reactivo de Ehrlich (6).

Al mismo tiempo, cobraron incremento los métodos que utilizan la fluorescencia con sales de cian, en razón de ser inferior el número de sustancias que podían interferir.

Para esta situación no se mantiene en la actualidad, pues con el método de Schwartz, Shorov y Watson (7) de 1944, se logra una extracción selectiva del urobilinógeno, anulando la antigua objeción de la no especificidad de la reacción de Ehrlich (loc.cit.)

Por el contrario, la técnica de Loyer (8), que data de 1929, se encuentra afectada por la interferencia de algunas sustancias naturalmente fluorescentes, entre las cuales tiene particular importancia la riboflavina, ya que en la actualidad es difícil hallar un producto vitamínico que no tenga en su composición a los integrantes del complejo B. Es decir que para obtener un resultado correcto se debe efectuar una investigación previa de dichas sustancias fluorescentes y en caso de comprobar su presencia en la orina, proceder a su separación, o bien emplear otra técnica que no valore la fluorescencia.

Sin embargo, la determinación de urobilina en orina se

realiza en la casi totalidad de los laboratorios de análisis clínicos del país por la técnica de Royer (loc.cit.), mientras que el proceso de valoración del urobilinógeno es raramente empleado.

Las razones expuestas nos han inducido a considerar que sería interesante realizar un estudio de ambas técnicas, a los fines de determinar los factores en contra y a favor de cada una de ellas.

Si bien es cierto que el método de Schwartz, Eborov y Watson (loc. cit.) requiere el uso de un colorímetro fotoeléctrico para obtener el resultado de la determinación, no consideramos este detalle como un obstáculo, en parte por el hecho de que los mismos autores ofrecen una variante para evitar su uso y en parte porque dicho aparato es en la actualidad un instrumento de uso corriente en los laboratorios.

Sobre este lineamiento general es que encaramos la base del presente trabajo.-

VALORACION DE UROBILINA

Técnica de Boyer

Para efectuar las determinaciones hemos preparados las siguientes reactivos:

Solución de tripaflavina.— Empleamos una droga de marca Casella. Se pesan 10 mg. de la droga que se disuelven en una pequeña cantidad de agua destilado y se lleva luego a volumen en un matras aforado de 1000 ml. Esta solución se denomina solución madre.

Se miden 5 ml. de la solución anterior y se diluyen hasta 1000 ml. con agua destilada, en matras aforado. Esta solución se emplea como solución testigo y la fluorescencia de 1 ml. de la misma equivale a la de 0.0128 gamma de urobilina.

Todas las operaciones anteriores las efectuamos en un cuarto oscuro iluminado con luz roja, a los efectos de evitar una posible descomposición de la tripaflavina en solución por acción de la luz.

Las soluciones se colocan en frascos de color caramelo, que se guardan en la oscuridad.

Solución de acetato de cinc. Empleamos una droga de marca B.D.H. Se prepara una solución alcohólica saturada agregando 40 gr. de acetato de cinc a 1000 ml. de alcohol etílico de 96°; luego de agitar fuertemente dejamos sedimentar el exceso de la sal pero como el líquido sobrenadante tenía un color amarillento, descartamos el uso de alcohol etílico de 96° y efectuamos el mismo proceso con alcohol etílico absoluto, obteniendo una solución incolora.

Tintura de yodo 3%. Empleamos una droga de marca Rhone-Poulenc. Como el autor no especifica la forma de preparar este reactivo hemos seguido las proporciones que indica la Farmacopea Americana (9). Para ello se disuelven 3.6 g. de yoduro de sodio y 3.0 g. de yodo en 100 ml. de alcohol etílico de 50°.

Solución de dilución. De acuerdo al método original preparamos una solución constituida por 25 g. de acetato de cinc, 70 g. de acetato de sodio, 4 ml. de ácido clorhídrico concentrado y alcohol etílico de 60° hasta completar un volumen de 1000 ml.

Antes de mezclar las sustancias observamos la aparición de un precipitado de color blanco que sedimentaba rápidamente. Como sospechamos que pudiera haber una parte del catión cinc en el precipitado disolvimos una pequeña parte del mismo en ácido clorhídrico concentrado y luego de diluir con agua destilada, agregamos a esta solución 2 gotas de solución de ditionona, la cual se coloreó de rosa evidenciando la presencia de catión cinc en el precipitado. Suponemos que éste es el hidróxido de cinc, dado que puede precipitar a un pH de 6.8 de acuerdo a Charlot (10).

En consecuencia, añadimos ácido clorhídrico concentrado a la solución original hasta lograr la disolución total del precipitado.

La solución que se obtiene es perfectamente límpida y no requiere ser filtrada repetidas veces como indica Royer (loc. cit.). Tomando el pH de esta solución con Papel Indicador Universal pH 1-10 Merck se obtiene un valor de 6.0, que coincide con el indicado por el autor.

Una vez preparados los reactivos procedimos a realizar el estudio de la técnica. Siguiendo el criterio del autor consideramos divididas las operaciones en dos tiempos.

Primer tiempo: Se miden 10 ml. de orina en una probeta de 25 ml. se añaden 2 gotas de tintura de yodo I_2 y se lleva a un volumen de 20 ml. con la solución de acetato de cinc, se agregan algunos cristales de dicha sal y se agita, luego se filtra.

Filtración: empleamos papel de filtro S. y S. 589² (banda blanca) pues al bien es cierto que la filtración es más lenta, en ningún caso observamos pasaje del precipitado a través del papel de filtro.

En un principio usamos papel de filtro S. y S. 589¹ (banda negra) pero observamos que en una apreciable proporción de orinas patológicas, el precipitado tiende a atravesar el papel de filtro.

Tiempo: la técnica original no especifica el intervalo de tiempo que puede transcurrir entre la mezcla de la orina con la solución de acetato de cinc y la valoración posterior del filtrado.

Sin embargo, Royer (loc.cit.), acorde con Coster y López García (11), señala que la intensidad de la fluorescencia del filtrado se incrementa si se deja estar durante 24 horas, con lo que se facilita la valoración, lo cual indica que la fluorescencia aumenta con el tiempo. Los investigadores nombrados en segundo término han encontrado con frecuencia aumentos de hasta un 100%, luego de transcurridas 24 horas.

Es evidente que la diferencia entre la magnitud de la fluorescencia de un mismo filtrado cuya valoración se realice 10 minutos o 20 minutos luego de efectuar la mezcla de las soluciones será pequeña, pero siempre se traducirá en un error.

A los fines de eliminar esta objeción es suficiente fijarse un intervalo de tiempo constante para todas las determinaciones, pero los resultados pueden diferir según el intervalo que se fijen los diversos experimentadores.

Orina colérica: en estos casos es preciso separar los pigmentos biliares antes de añadir la solución de acetato de zinc. Para investigar la presencia de aquéllos utilizamos el ensayo de Gmelin en la forma indicada por Levinson-Mac Fete(12).

Se colocan en un tubo de ensayo 2 ml. de ácido nítrico concentrado amarillo, el cual se prepara hirviendo en un pequeño vaso de precipitados 3 ó 4 ml. de ácido nítrico concentrado con una pequeña astilla de madera, separando luego el líquido sobrenadante. Se añaden al tubo de ensayo 2 ml. de orina toxigena de cuidado de no mezclar ambas capas y se observa la aparición de anillos coloreados en la zona de contacto si se trata de orinas coléricas.

Cuando el ensayo anterior no da resultados definidos empleamos el ensayo de Mappert, en la forma indicada por los mismos autores.

Se agitan 10 ml. de orina con 5 ml. de lechada de cal y se separa el precipitado que se produce, éste se disuelve con 5 ó 6 gotas de ácido clorhídrico concentrado y se lava el filtro con 5 ml. de alcohol etílico de 96°. Los filtrados anteriores se reciben en un tubo de ensayo que se coloque en un baño de maría duran-

te 5 minutos. La presencia de color verde en la solución indica coloria. Si se confirma la presencia de pigmentos biliares se procede a eliminarlos. Esto se realiza alcalizando la orina y agregando solución de cloruro de calcio o de bario al 10% hasta duplicar el volumen de orina empleado.

Segundo tiempo. Para efectuar la comparación fluorescimétrica hemos empleado un aparato, cedido gentilmente por el Dr. Ventura Marera, que posee las dimensiones indicadas por el autor.

Aparato: Como fuente luminosa usamos una lámpara de filamento puntiforme de 6-8 voltios, conectada en la salida, entre 0 y 6 voltios, de un transformador indicado para una intensidad de corriente de hasta 4 amperes, mientras que la entrada del mismo se conecta a la fuente de 220 voltios.

Respecto de los tubos empleados en el aparato, hemos probado modelos de diversas formas tanto con fondo curvo como con fondo plano y finalmente decidimos utilizar el tipo de tubos con que viene equipado el colorímetro fotoeléctrico Grado-Gammale, los cuales pueden adquirirse por separado en la casa fabricante del aparato. Dichos tubos miden 89 mm. de largo y 17 mm. de diámetro.

La razón fundamental que nos ha llevado a su selección es que dichos tubos están calibrados fotocolorimétricamente con el objeto de asegurar la constancia de diámetro entre las diversas unidades. Es decir que al realizar la comparación fluorescimétrica empleando dos de estos tubos, se tiene la certeza de que ambos tienen exactamente el mismo diámetro.

Consideramos de relativo valor el uso de la cubeta llena de agua que indica el autor, ya que se trata de una corrección a la di-

vergencia de los rayos que ha sido hecha empíricamente, pues no se tienen en cuenta las refracciones que experimenta un rayo luminoso cuando pasa del aire al vidrio al incidir en el fondo de la cubeta y cuando pasa del vidrio al agua al emerger del fondo de aquélla.

Por otra parte, el índice de refracción varía notablemente para las diversas clases de vidrio, de modo que al no especificarse cual de ellas se usó en el método original, cabe la posibilidad de que las cubetas estén construídas con distintas calidades de vidrio, lo que introduciría un nuevo factor de variación.

Para efectuar la valoración del filtrado usamos en un principio una pipeta de 1 ml. graduada al 1/100, como indica Rayer(1958), pero observamos que su uso resulta incómodo pues es necesario mantener el brazo en alto durante todo el transcurso de la determinación, con el consiguiente cansancio muscular que dificulta la obturación de la parte superior de la pipeta, produciéndose el escurrimiento de gotas cuando no se desea.

En su reemplazo, usamos una microbureta de Bang de 2 ml. de capacidad graduada al 1/100, la cual resulta más práctica pues el robinete se acciona a una altura menor y no se corre el riesgo de que escurran varias gotas seguidas.

Como el volumen de las gotas era muy superior al de 0.01 ml. adaptamos en el pico de salida de la microbureta, mediante un tubo corto de plástico, una aguja metálica de inyección, calibre 25/8. Para determinar el volumen de cada gota dejamos escurrir 40 gotas del líquido contenido en la microbureta y leímos el volumen correspondiente en la escala graduada, como oscilase entre 0.48 y 0.47 ml. corresponde a cada gota un volumen de 0.012 ml., el cual consideramos aceptable.

Determinación dentro de la parte experimental se nos presentaron las siguientes dificultades:

Cuando se está realizando la valoración, se observa la estela fluorescente que deja cada gota al caer a través del líquido de dilución, pero la fluorescencia no se difunde al resto de la solución por sí sola. Para homogeneizar el líquido se puede retirar el tubo y agitarlo, luego de añadir cada gota, pero es un proceso poco práctico.

Hemos probado de agitar la solución con una varilla delgada de vidrio, perfectamente desengrasada, pero tiene el inconveniente de que se forman pequeñas burbujas de aire que se deben dejar desaparecer antes de agregar otra gota.

En resumen, para realizar una valoración correcta es necesario agitar luego de añadir cada gota; la agitación puede efectuarse por una u otra de las técnicas anteriores, pero ambas son lentas y engorrosas. El proceso puede acelerarse si se agita luego de agregar varias gotas en una sola vez, pero es evidente que ello no constituye un proceso cuantitativo. Otra dificultad es que, para poder apreciar nítidamente la fluorescencia, la determinación debe efectuarse en un cuarto oscuro, lo que trae aparejado una rápida fatiga visual e inconvenientes en la manipulación de los aparatos.

Exactitud: con el objeto de estudiar la exactitud que se puede lograr en una comparación fluorescimétrica de esta naturaleza, preparamos una solución diez veces más concentrada que la testigo, para ello tomamos 5 ml. de la solución madre y los diluimos hasta 100 ml. con agua destilada. Con esta solución operamos en la misma forma que si se tratase de un filtrado de orina y obtuvimos los datos que

se consignan en el cuadro n° 1, empleando en todas los casos un volumen de 9.00 ml. de agua destilada como líquido de dilución.

En la 2a. columna se hallan los valores que corresponden al volumen agregado (V_a) de la solución diez veces más concentrada, la 3a. columna corresponde al volumen teórico (V_t) que debería ser agregado para igualar la fluorescencia del testigo y que sería de 1.00 ml. en tanto que la 4a. columna corresponde al error relativo por ciento o error porcentual (e %) de cada determinación.-

CUADRO N° 1
ESTUDIO SOBRE LA EXACTITUD QUE SE LOGRA EN
UNA COMPARACION FLUORESCIMETRICA.

Determinación	V_a	V_t	ϵ
n°	ml.	ml.	%
1	0.90	1.00	- 10
2	1.21	1.00	+ 21
3	0.89	1.00	- 11
4	0.84	1.00	- 16
5	0.79	1.00	- 21

La observación del cuadro revela que la comparación fluorescimétrica no es exacta, cuando se emplea el tipo de comparador descrito por Meyer (loc. cit.). El error porcentual de las determinaciones oscila entre 10 y 21 y tiene un valor promedio de 15.8.

Luego de la determinación n° 5 realizamos algunas más, pero los resultados se apartan tanto del volumen teórico (V_t) que no los incluimos por considerar que se hallan muy influenciadas por el error derivado de la fatiga visual que ocasiona esta técnica.

Para eliminar de las determinaciones lo que podría llamarse "factor personal", hemos solicitado a dos profesionales que tuvieran la bondad de realizar, cada uno, una serie de cinco determinaciones en forma idéntica a la descrita para el cuadro n° 1. Los resultados obtenidos se observan en el cuadro n° 2 y en el cuadro n° 3 respectivamente.

CUADRO N° 2

Determinación	V_a	V_t	δ
n°	ml.	ml.	%
1	1.17	1.00	+ 17
2	0.81	1.00	- 19
3	0.90	1.00	- 10
4	1.20	1.00	+ 20
5	1.14	1.00	+ 14

Se observa que el error porcentual varía entre 10 y 20 y posee un valor promedio de 16,0.

CUADRO N° 3

Determinación	V_a	V_t	δ
n°	ml.	ml.	%
1	0.88	1.00	- 12
2	1.10	1.00	+ 10
3	1.18	1.00	+ 18
4	0.78	1.00	- 22
5	0.91	1.00	- 9

En este caso el error porcentual oscila entre 9 y 22 y tiene un valor promedio de 14,2.

Los dos últimos cuadros corroboran el hecho de que esta clase de comparación fluoroscimétrica no permite obtener un resultado exacto.

Unidades: en base a las observaciones anteriores, nos parece inadecuado considerar la técnica de Royer (loc.cit.) como un método cuantitativo, y sugerimos emplear un criterio similar al adoptado por Watson, Schwartz, Sborov y Bartic (13) en su técnica semicuantitativa, quienes omiten el empleo de la expresión mg. de urobilinógeno usando en cambio la Unidad Ehrlich, para indicar que el resultado no es exacto y que por lo tanto no es correcto hablar de mg. de urobilinógeno.

Respecto de la técnica de Royer (loc.cit.), proponemos el uso de la Unidad Schlesinger en reemplazo de expresión mg. de urobilina. Es decir, cada Unidad Schlesinger significa 1 mg. de urobilina, pero al usar esa expresión queremos significar que el resultado que se obtiene es solamente un valor aproximado, pues la técnica sólo puede considerarse semicuantitativa.

También With (14) considera que todos los autores que han trabajado valorando la fluorescencia de la urobilina, han utilizado métodos y fluoroscímetros primitivos en los cuales se observa la fluorescencia a simple vista, y manifiesta que estas técnicas, incluso la de Royer (loc.cit.), sólo pueden considerarse como semicuantitativas.

Por otra parte, señala que este inconveniente sería evitado si se emplearan fluoroscímetros de tipo electrónico, similares a los que se usan en la determinación de porfirinas, lo cual se realiza con

gran exactitud:

Valores normales: con objeto de observar los límites de variación del contenido de urobilina en la orina de sujetas que se hallaban en condiciones normales, efectuamos el análisis de 28 muestras, cuyos resultados se consignan en el cuadro n° 4. En todos los casos se trata de orinas de 24 horas.

Si llamamos V_a el volumen agregado del filtrado y V_f el volumen final del líquido de dilución, el resultado de la valoración se obtiene aplicando la fórmula:

$$X = 0.0256 \times \frac{V_f}{V_a}$$

y queda expresado en Unidades Schlesinger (U.S.) por mil ml. de orina. En éstas y en todas las determinaciones posteriores hemos usado un volumen de 9.00 ml. de líquido de dilución.

CUADRO N° 4

DETERMINACION DEL CONTENIDO DE UROBILINA
EN ORINAS NORMALES DE 24 HORAS

Muestra	Urobilina	Muestra	Urobilina
n°	U.S. °/oo ml.	n°	U.S. °/oo ml.
1	0.28	15	0.42
2	0.75	16	0.63
3	0.32	17	0.39
4	0.38	18	0.27
5	0.41	19	0.26
6	0.27	20	0.81
7	0.25	21	0.43
8	0.35	22	0.52
9	0.58	23	0.26
10	0.56	24	0.25
11	0.48	25	0.20
12	0.27	26	0.72
13	0.21	27	0.55
14	0.33	28	0.38

En sujetos normales, hemos encontrado valores que oscilan entre 0.2 y 0.6 U.S. por mil ml. de orina, en el 85.7% de los casos; entre 0.6 y 0.7 en el 3.6% de los casos y entre 0.7 y 0.8 en el 10.7% de los casos.

Sustancias fluorescentes extrañas

Como hemos mencionado al comienzo de este trabajo, el ensayo de Schlesinger (loc.cit.) se ve afectada en su especificidad por un grupo de sustancias medicamentosas que son naturalmente fluorescentes.

En 1947, Neumann (15) publicó un trabajo sobre la eliminación de interferencias en la reacción de Schlesinger (loc.cit.), en el cual describe una serie de técnicas para separar e investigar urobilina en presencia de diversos compuestos fluorescentes.

De ellas, dos pertenecen al grupo de las flavinas y son la riboflavina (lactoflavina) y la acriflavina (tripriflavina), en tanto que el resto son sustancias que poseen una estructura química similar, tales como la fluoresceína, la eosina (2-4-5-7 tetrabromofluoresceína), la eritrosina (2-4-5-7 tetrayodofluoresceína) y el mercurocromo (sal disódica de la 2-7-dibromo-4-hidroxi-mercurifluoresceína).

En el presente trabajo se estudiarán las dos primeras sustancias y en particular la riboflavina o vitamina B₂, ya que es muy frecuente su inclusión en los productos vitamínicos y también porque es muy común la administración del complejo B en los casos de alteraciones hepáticas, donde la urobilinuria es uno de los síntomas más característicos.

En cuanto a los compuestos del tipo de la fluoresceína, no los estudiaremos por tratarse de sustancias que han sido raramente halladas en la orina. Así, Schumm (16), Discombe (17) y el mismo Neumann (loc.cit.) solo citan casos muy contados de orinas en las cuales se identificó la presencia de fluoresceína, de eosina o de mercurocromo, mientras que no existe ningún caso en que se halla encontrado

eritrosina.

Técnica para investigar urobilina en presencia de riboflavina.

Se basa en el hecho de que la urobilina es soluble en cloroformo, mientras que la riboflavina no es extraída por dicho solvente. La técnica es la siguiente:

Se mezclan 10 ml. de orina con 10 gotas de ácido clorhídrico concentrado y con 2 gotas de tintura de yodo, luego se extrae con 10 ml. de cloroformo. Se separa la fase cloroformica y se le agregan 5 ml. de alcohol etílico, 0.2 g. de acetato de cinc y 1 gota de hidróxido de amonio concentrado. Finalmente se filtra y se observa el filtrado en la forma habitual.

En las determinaciones siguientes hemos empleado la solución alcohólica saturada de acetato de cinc, cuya preparación ya fué descrita, pues la proporción de 0.2 g. de acetato de cinc y 5 ml. de alcohol etílico indicada por Neumann (loc.cit.) es la misma de la solución antes mencionada.

Hemos realizado diversos ensayos para corroborar el principio en que se basa la técnica. Para ello, comenzamos por preparar una solución de riboflavina 0.001% disolviendo 1 mg. de dicha sustancia en 100 ml. de agua destilada.

Para constatar la insolubilidad de la riboflavina en el cloroformo, se extrajeron 2 ml. de la solución de riboflavina con 10 ml. de cloroformo. Luego de agitar fuertemente y de dejar la mezcla en reposo por unos minutos, separamos ambas fases. Comprobamos así que la fase acuosa es fluorescente en tanto que la cloroformica no lo es; comparando la fase acuosa con 2 ml. de la solución original de riboflavina se observa que la intensidad de la

fluorescencia es similar en ambas líquidas, toda lo cual indica que la riboflavina no es extraída por el cloroformo.

Para comprobar la solubilidad de la urobilina en cloroformo efectuamos la extracción de 10 ml. de orina en la forma que indica la técnica. El filtrado presenta una intensa fluorescencia, lo que indica que la urobilina es extraída por el cloroformo. El pH del filtrado oscila entre 6.0 y 6.5 en las diversas muestras, que es el pH óptimo para favorecer la fluorescencia de la urobilina. Cuando se agita la mezcla de orina y cloroformo para extraer la urobilina, se forma una emulsión persistente que se destruye con mucha lentitud, pudiendo tardar entre 30 y 60 minutos, pero este inconveniente se evita centrifugando la mezcla durante 1 ó 2 minutos con lo cual se logra una separación completa de ambas fases.

Por otra parte, neutralizamos la acidez de la fase acuosa con hidróxido de amonio concentrado acidificando luego con dos gotas de ácido acético glacial, se agrega un volumen igual de solución alcohólica saturada de acetato de cinc y luego de agitar se filtra la mezcla. La observación del filtrado no revela fluorescencia en la totalidad de los casos en que trabajamos con orinas normales, pero al emplear orinas patológicas hemos observado una ligera fluorescencia en algunos casos.

Los resultados correspondientes a la extracción con cloroformo de doce orinas normales se consignan en el cuadro n° 5. Se incluyen en el mismo los valores del contenido de urobilina de cada muestra.

CUADRO N° 5

EXTRACCIÓN CON CLOROFORMO DE ORINAS NORMALES

Muestra n°	Urobilina	Extracción con cloroforme	
	U.S.°/cc ml.	Fase clorofórmica	Fase acuosa
1	0.54	fluorescente	no fluorescente
2	0.82	fluorescente	no fluorescente
3	0.28	fluorescente	no fluorescente
4	0.35	fluorescente	no fluorescente
5	0.36	fluorescente	no fluorescente
6	0.45	fluorescente	no fluorescente
7	0.86	fluorescente	no fluorescente
8	0.23	fluorescente	no fluorescente
9	0.31	fluorescente	no fluorescente
10	0.24	fluorescente	no fluorescente
11	0.19	fluorescente	no fluorescente
12	0.22	fluorescente	no fluorescente

Las muestras 2 y 7 presentan un contenido de urobilina ligeramente elevado pero los pacientes se hallaban en condiciones aparentemente normales, de todos modos el aumento es muy pequeño como para considerarlo patológico.

En el cuadro n° 6 consignamos los resultados obtenidos al extraer con cloroforme once orinas patológicas. En todos los casos los pacientes no habían estado sometidos a una ingestión previa de riboflavina.

CUADRO Nº 6
EXTRACCIÓN CON CLOROFORMO DE ORINAS DE PACIENTES
CON DIVERSAS ENFERMEDADES

Muestra nº	Urobilina	Extracción con cloroformo	
	U.S.º/cc ml.	Fase clorofórmica	Fase acuosa
1	0.52	fluorescente	no fluorescente
2	0.42	fluorescente	no fluorescente
3	0.29	fluorescente	no fluorescente
4	0.91	fluorescente	no fluorescente
5	0.38	fluorescente	lig. fluorescente
6	0.86	fluorescente	no fluorescente
7	0.47	fluorescente	no fluorescente
8	0.16	fluorescente	no fluorescente
9	2.10	fluorescente	lig. fluorescente
10	0.61	fluorescente	no fluorescente
11	0.28	fluorescente	no fluorescente

Se observa en el cuadro anterior que sobre once orinas examinadas dos presentan fluorescencia en la fase acuosa, luego de la extracción con cloroformo. (En las muestras 5 y 9, lig. fluorescente significa ligeramente fluorescente).

Como dicha fluorescencia se presenta en una orina con un contenido elevado de urobilina (nº 9) pero también en otra con un contenido normal de urobilina (nº 5), suponemos que no se trata de una extracción insuficiente sino que pueda deberse a la presencia de sustancias de carácter patológico que se combinarían con la urobilina, disminuyendo su solubilidad en el cloroformo.

En resumen, podemos decir que la extracción de la urobili-

no por el cloroformo es total en la mayoría de las orinas patológicas y que ocurre lo contrario en muy pocos casos.

El orden que hemos seguido en el análisis de las muestras anteriores es el siguiente. La orina se extrae con cloroformo y se separan ambas fases. La fase cloroformica se termina de tratar según la técnica de Neumann (loc.cit.) y se observa la presencia de fluorescencia en todos los casos. Por otra parte se ajusta el pH de la fase acuosa entre 7.0 y 6.5 y se examina, como no hallamos fluorescencia en ninguna de las muestras descartamos la presencia de riboflavina. Se añade entonces a la fase acuosa un volumen igual de solución alcohólica saturada de acetato de cinc y se vuelve a examinar. La presencia de fluorescencia en esta operación, que observamos en las muestras 1 y 2, sólo puede deberse a urobilina y no a riboflavina.

Para estudiar la aplicación de la técnica de Neuman (loc. cit.) en orinas que contienen riboflavina hemos realizado nuevas experimentales de orinas, normales y patológicas, con la solución de riboflavina 0.001%. En el cuadro nº 7 se observan los resultados obtenidos con ocho orinas normales.-

CUADRO N° 7

EXTRACCIÓN CON CLOROFORMO DE MEZCLAS EXPERIMENTALES
DE URINAS NORMALES Y SOLUCIÓN DE RIBOFLAVINA

Muestra n°	Urobilina	Extracción con cloroformo	
	U.S.°/cc ml.	Fase clorofórmica	Fase acuosa
1	0.17	fluorescente	fluorescente
2	0.21	fluorescente	fluorescente
3	0.24	fluorescente	fluorescente
4	0.32	fluorescente	fluorescente
5	0.29	fluorescente	fluorescente
6	0.48	fluorescente	fluorescente
7	0.41	fluorescente	fluorescente
8	0.26	fluorescente	fluorescente

Los valores correspondientes al contenido de urobilina fueron determinados sobre las muestras originales, antes del agregado de la solución de riboflavina. Las mezclas están constituidas por 5 ml. de orina y 5 ml. de la solución de riboflavina.

El orden que hemos seguido para el análisis de estas muestras es similar al que describimos antes. Luego de extraer la orina con cloroformo se separa la fase acuosa y se alcaliza ligeramente con hidróxido de amonio concentrado, luego se añade ácido acético diluido hasta obtener un pH lo más próximo posible a 7.0 y recién entonces se observa si existe fluorescencia debida a la riboflavina.

La operación anterior es muy importante, pues hemos comprobado que la fluorescencia de la riboflavina desaparece en pre-

sencia de ácidos minerales o de álcalis. Esta propiedad también se halla citada en la Farmacopea Americana (18).

Sobre un volumen de 5 ml. de la solución de riboflavina agregamos ácido clorhídrico concentrado, gota a gota, y observamos que la adición de 1 ó 2 gotas produce una sensible disminución de la fluorescencia, la cual desaparece cuando se agregan 3 ó 4 gotas.

A otro volumen igual de solución de riboflavina añadimos hidróxido de amonio concentrado, gota a gota, observando la desaparición de la fluorescencia cuando se han agregado 5 ó 6 gotas.

Las experiencias anteriores revelan la gran sensibilidad de dicha fluorescencia frente a un medio ácido o alcalino. Por otra parte, cuando se neutraliza la acidez o la alcalinidad del medio, se observa la reaparición de la fluorescencia.

Para estudiar la influencia que puede tener el ácido ascórtico sobre la fluorescencia de la riboflavina, efectuamos un ensayo similar a los anteriores y comprobamos que hay que agregar un volumen apreciable de ácido para producir una disminución de la fluorescencia, lo que indica la conveniencia de usar ácido ascórtico para llevar la fase suosa a un pH próximo a 7.0

Para realizar la neutralización con rapidez hemos empleado la siguiente técnica. Se añade a la fase suosa 1 gota de fenolftaleína 0.1% en alcohol etílico y luego hidróxido de amonio concentrado hasta que el líquido adquiere color violado. Se agrega entonces ácido ascórtico 3 N, gota a gota, hasta que el indicador vira a su forma incolora y luego 2 gotas en exceso. En esta forma se logra rápidamente un pH muy próximo a 7.0

En forma similar a la que describimos en el cuadro n° 7, realizamos mezclas de orinas patológicas con la solución de ribo-

flavina. En el cuadro n° 8 se consignan los resultados obtenidos con 7 muestras.

CUADRO N° 8

EXTRACCION CON CLOROFORMO DE MEZCLAS EXPERIMENTALES
DE ORINAS PATOLOGICAS Y SOLUCION DE RIBOFLAVINA

Muestra n°	Urobilina	Extracción con cloroforme	
	U.S.°/cc ml.	Fase clorofórmica	Fase acuosa
1	1.83	fluorescente	fluorescente
2	0.47	fluorescente	fluorescente
3	0.55	fluorescente	fluorescente
4	0.92	fluorescente	fluorescente
5	0.14	fluorescente	fluorescente
6	0.08	dudoso	fluorescente
7	0.87	fluorescente	fluorescente

Los valores del contenido de urobilina fueron determinados sobre las muestras originales, antes del agregado de la solución de riboflavina.

La orina n° 6 contenía pigmentos biliares. Como muestra interés era observar el comportamiento de la riboflavina frente a los componentes patológicos de la orina, mezclamos 5 ml. de la muestra con un volumen igual de la solución de riboflavina, y recién entonces eliminamos los pigmentos biliares. La fluorescencia de la fase clorofórmica era tan débil que consignamos el resultado como dudoso, mientras que en la fase acuosa se observaba una fluorescencia nítida. Es decir que la riboflavina contenida en orinas patológicas permanece en la fase acuosa en la totalidad de los ca-

son examinados.

la. técnica personal para valores urobilina en presencia de riboflavina.

Una vez finalizado el estudio de la aplicación de la técnica de Naumann (loc.cit.) e mezclas experimentales de orinas normales y patológicas con solución de riboflavina, encaramos la valoración de urobilina en presencia de la riboflavina excretada en la orina de personas sanas y enfermas, sometidas a la ingestión de medicamentos que contienen dicha sustancia.

Con tal objeto, administramos a dos individuos sanos el producto Riboflavina 0.010 g. de marca Abbott, que contiene 10 mg. de riboflavina por cada tableta de 0.2 g. de peso.

En la orina emitida valoramos la fluorescencia por dos caminos. Por una parte, diluimos la orina el medio con agua destilada y filtramos el líquido, luego agregamos el filtrado sobre 9 ml. de agua destilada, colocados en un tubo del operato de Royer (loc.cit.), hasta igualar la fluorescencia del testigo de tripeflavina; el volumen gastado (A) se expresa en U.S. por mil ml. de orina. En esta operación se valora la fluorescencia natural correspondiente a la riboflavina.

Sobre otro volumen igual de orina se efectúa la técnica de Royer (loc.cit.) y se agrega el filtrado sobre 9 ml. de la solución de dilución, hasta igualar la fluorescencia del testigo de tripeflavina; el volumen gastado (B) se expresa también en U.S. por mil ml. de orina. En este etapa se valora la fluorescencia natural de la riboflavina y la fluorescencia provocada de la urobilina.

La diferencia entre ambos valores (B-A) corresponde a

un valor aproximado del contenido de urobilina, mientras que el valor (B) representa el resultado erróneo que se obtiene al valorar directamente una orina que contiene riboflavina, cuando no se efectúa una investigación previa de ésta.

Realizamos un análisis seriado de la orina de cada individuo en la siguiente forma. Se valora el contenido de urobilina durante tres días anteriores (1-2-3) a la ingestión de riboflavina; a las 9 horas del cuarto día (4) se administra al paciente un tablete de Riboflavina 0.010 g. y se repite el tratamiento a la misma hora del quinto y sexto día (5-6), valorando cada día el contenido de urobilina; se suprime entonces la administración del medicamento y se determina el contenido de urobilina durante los días posteriores (7-8-9-etc.) hasta el instante en que desaparece la fluorescencia natural de la orina, lo que indica la eliminación total de la riboflavina.

En todos los casos la valoración se realiza sobre la orina de 24 horas recogida en la siguiente forma. El sujeto vacía la vejiga a las 9 horas, ingiere una tableta de Riboflavina 0.010g. y recoge todas las emisiones hasta las 9 horas del día siguiente. En el cuadro n° 9 se consignan los resultados obtenidos.--

CUADRO N° 9

VARIACION APARENTE DEL CONTENIDO DE UROBILINA
DEBIDA A LA INYECCION DE RIBOFLAVINA

Día	A	B	(B-A)
	Valoración de la fluorescencia natural (Ribof.)	Valoración de la fluorescencia total (Ribof. y Urob.)	Contenido de urobilina
U.S.°/cc ml.			
PACIENTE X			
1	—	—	0.11
2	—	—	0.20
3	—	—	0.10
- - - - - comienza la ingestión de riboflavina - - - - -			
4	0.40	0.58	0.18
5	0.41	0.55	0.14
6	0.59	0.70	0.11
- - - - - finaliza la ingestión de riboflavina - - - - -			
7	0.18	0.38	0.20
8	0.10	0.21	0.11
9	no hay fluorescencia	0.15	0.15
PACIENTE Y			
1	—	—	0.48
2	—	—	0.58
3	—	—	0.40
- - - - - comienza la ingestión de riboflavina - - - - -			

4	0.50	0.96	0.46
5	0.65	1.15	0.50
6	0.81	1.23	0.52
- - - finaliza la ingestión de riboflavina- - - - -			
7	0.31	0.61	0.30
8	ligera fluorescencia	0.40	0.40
9	no hay fluorescencia	0.35	0.35

Comparando los valores de la tercera columna vertical con los de la cuarta columna vertical se observa el importante error en que se puede incurrir al valorar una orina sin tener en cuenta la posible presencia de riboflavina. Además se debe destacar el hecho de que esos aumentos en la fluorescencia se producen por ingestión de una sola tableta de Riboflavina 0.010 g. cada 24 horas, mientras que en casos de enfermedad se administran diariamente dosís mayores.

La comprobación más importante es que hay eliminación de riboflavina en los días posteriores luego de suprimida la ingestión; consecuentemente, si no se investiga la presencia de riboflavina, se obtendrá durante ese período un valor elevado del contenido de urobilina, que puede conducir a conclusiones erróneas.

Así, con el caso de un paciente con una afección hepática que ha sido sometida a un tratamiento con riboflavina. Si se suprime la administración de dicha sustancia y se analiza la orina sin

investigar la presencia de riboflavina se obtendrá un contenido de urobilina elevado que hará suponer que la afección hepática no ha cedido, cuando el contenido de urobilina real puede estar dentro de los valores normales.

Un caso interesante se nos presentó cuando analizamos la orina de un paciente que ingería Terramicina desde 24 horas antes del análisis. Como ya señalamos al principio de este trabajo, las antibióticas producen la desaparición de la urobilina debido a que destruyen la flora bacteriana intestinal, sin embargo la valoración de la orina por la técnica de Loyer (loc.cit.) daba un valor de 1.56 U.S. por mil ml.

Como el contenido de urobilina tendría que haber sido nulo o muy pequeño, decidimos seguir analizando la orina durante los días siguientes mientras continuaba la administración del antibiótico, y obtuvimos valores tales como 1.17 U.S. por mil ml. en el segundo día y 1.40 U.S. por mil ml. en el tercero, es decir que el valor se mantenía elevado y no disminuía rápidamente como era de esperar.

Estos resultados nos desorientaron, hasta que por casualidad pudimos observar el medicamento que se administraba al paciente. Se trataba del producto Terramicina SP (oxitetraciclina con vitaminas) de marca Pfizer, en el cual cada cápsula de 300 mg. contiene 2.5 mg. de riboflavina. Como el paciente ingería seis cápsulas diarias es explicable el valor elevado que se obtenía en el análisis.

Lo que nos desconcertó fué que nunca supusimos que el paciente pudiera estar ingiriendo indirectamente riboflavina, lo que pone de manifiesto la necesidad de no descartar nunca la posible presencia de riboflavina en la orina.

Para finalizar, analizamos ocho orinas de pacientes que sufrían diversos trastornos hepáticos y que se hallaban bajo una medicamentación que incluye la ingestión de riboflavina. El análisis de las muestras se efectuó en forma similar a la indicada en el cuadro n° 9, pero en este caso realizamos una sola determinación sobre las orinas emitida durante las 24 horas posteriores al comienzo del tratamiento. En el cuadro n° 10 se observen los resultados obtenidos.

CUADRO N° 10
VARIACION APARENTE DEL CONTENIDO DE UROBILINA
EN PACIENTES CON TRASTORNOS HEPATICOS

Mue- stra n°	A Valoración de la fluorescencia na- tural(Ribof)	B Valoración de la fluorescencia total (Ribof. y Urob.)	(B-A) Contenido de urobilina
	U.S.°/cc ml.		
1	0.85	1.80	0.95
2	0.46	1.66	1.20
3	1.08	2.38	1.30
4	0.55	1.36	0.81
5	0.60	1.60	1.00
6	0.75	1.65	0.90
7	0.83	2.95	2.12
8	0.76	1.98	1.22

Se puede observar que los valores de la tercera columna vertical son muy superiores a los de la cuarta columna vertical que corresponden al contenido de urobilina de las muestras, lo cual confir-

ma una vez más la necesidad de investigar la presencia de riboflavina en orina, en particular durante el período posterior a la supresión de los medicamentos que la contienen, pues la riboflavina continúa excretándose en la orina durante un cierto lapso de tiempo, cuya extensión dependería de la dosis en que dicha sustancia ha sido administrada.

2a. técnica personal para valorar urobilina en presencia de riboflavina.

Hemos experimentado otra técnica para valorar el contenido de urobilina cuando existen en la orina otras sustancias fluorescentes. El principio de esta técnica se basa en la propiedad, citada por With (19), que poseen las soluciones alcalinas diluidas de extraer la urobilina que se halla en solución cloroformica.

Elle nos hizo suponer que sería factible separar la urobilina de las sustancias fluorescentes extrañas por medio de una extracción cloroformica, como en la técnica de Maumann (loc.cit.), y extraer luego con soluciones alcalinas diluidas la urobilina disuelta en el cloroformo.

La técnica es la siguiente. Se mezclan 10 ml. de orina con 10 gotas de ácido clorhídrico concentrado y con 2 gotas de tintura de yodo, se añaden 10 ml. de cloroformo y se agita la mezcla con cuidado para evitar la formación de emulsiones, si esto sucediere se centrifuga el líquido emulsionado durante 1 ó 2 minutos.

Se separa la fase cloroformica, se coloca en una ampolla de decantación y se extrae con 10 ml. de solución de hidróxido de sodio 1 N, repitiendo el tratamiento dos veces. Los extractos alcalinos se reúnen y se neutralizan con ácido acético glacial, empleando como indicador 1 gota de solución de fenolftaleína 0.1% en alcohol etílico.

ce, luego que el indicador se decolore se añade una gota de ácido en exceso. El líquido neutralizado se lleva a un volumen de 25 ml. con agua destilada y se le añade un volumen igual de solución alcohólica saturada de acetato de cinc, se agita y se filtra. El filtrado se valora en la forma habitual.

Si se llama V_a al volumen agregado de filtrado y V_f al volumen final de la solución de dilución, el resultado de la determinación se obtiene aplicando la siguiente fórmula:

$$X = 0.0640 \times \frac{V_f}{V_a}$$

El resultado queda expresado en U.S. por mil ml. de orina. Es evidente que la fórmula sólo es válida si se respetan las cantidades indicadas en la técnica; si los extractos alcalinos se llevan a un volumen distinto de 25 ml. la fórmula debe ser corregida.

Para comprobar si la técnica es aceptablemente aproximada comenzamos por aplicarla a una serie de orinas normales y patológicas pertenecientes a pacientes que no habían ingerido riboflavina o medicamentos que lo contuvieran.

Por una parte valoramos el contenido de urobilina en la muestra original, por la otra aplicamos la técnica para eliminar las fluorescencias interferentes a 10 ml. de la muestra original y luego determinamos el contenido de urobilina. Los resultados obtenidos se consignan en el cuadro n° 11.-

CUADRO N° 11

COMPARACION DE TECNICAS

Muestra n°	Técnica de Loyer	Técnica personal	o
	U.S.°/cc ml.		%
1	0.80	0.62	- 22.5
2	0.47	0.35	- 25.5
3	0.68	0.51	- 25.0
4	2.30	1.91	- 17.0
5	1.46	1.20	- 17.8
6	0.55	0.42	- 23.6

Se observe que los resultados que se obtienen luego de aplicar la técnica para eliminar las fluorescencias interferentes son menores que los que se obtienen con la técnica directa, lo que resulta aceptable si se tiene en cuenta que en la primera se verifican una serie de extracciones y de modificaciones de pH, donde se pierde una parte de la urobilina, lo cual no ocurre en la segunda técnica.

Los valores del error porcentual han sido calculados suponiendo que los resultados obtenidos por la técnica de Loyer (loc. cit.) representan el valor exacto del contenido de urobilina, aunque no es así. El error que se comete es en general inferior al 26%. Por lo tanto, creemos que la técnica puede aplicarse pero teniendo siempre presente que sólo se obtienen resultados aproximados.

Hemos analizado la orina de diversos pacientes que sufrían

trastornos hepáticos y que se hallaban sometidos a la ingestión de riboflavina, valorando el contenido de urobilina en cada muestra directamente de acuerdo a la técnica de Doyer y luego de aplicar a la muestra la técnica para eliminar fluorescencias interferentes. Las muestras analizadas eran orinas de 24 horas y los resultados se observan en el cuadro n° 12.

CUADRO N° 12
VARIACION APARIENTE DEL CONTENIDO DE UROBILINA
EN PACIENTES CON TRASTORNOS HEPATICOS

Muestra n°	Técnica de Doyer (Urob. y Ribof.)	Técnica personal (urob.)
	U.S.°/cc ml.	
1	1.66	0.88
2	2.43	1.83
3	1.98	1.20
4	2.18	1.10
5	1.80	0.90
6	1.40	0.80
7	3.10	2.22

Se observa que el error que se comete en la valoración directa de urobilina en orina puede ser elevado si la orina contiene riboflavina, lo que corrobora nuestra anterior afirmación de que debe siempre efectuarse una investigación de riboflavina en orina. Son particularmente interesantes las muestras 1, 5 y 6 en las cuales el contenido de urobilina es normal o casi normal, mientras que los resultados obtenidos en la valoración directa por la

técnicas de Royer (loc.cit.) hacen pensar en una urobilinuria patológica.

En todas las experiencias anteriores hemos dicho que debe efectuarse una investigación de riboflavina, este forma de expresarnos se debe a que la riboflavina es la más común de las sustancias fluorescentes extrañas y a que nosotros hemos trabajado administrando dicha sustancia a sujetos normales y enfermos. Pero en rigor, es más correcto hablar de una investigación de fluorescencias interferentes, si así no lo hicimos fué porque la bibliografía sólo menciona esas aisladas de otras sustancias fluorescentes excretadas en la orina distintas de la riboflavina. Queda entonces aclarado que la investigación que se realiza comprende a todas las fluorescencias interferentes.

Investigación de sustancias fluorescentes interferentes.

Se utiliza el modo operatorio aconsejado por Morera, que se indica a continuación.

Se efectúa un ensayo cuantitativo para comprobar si la orina contiene sustancias fluorescentes extrañas. Para ello, se neutraliza la orina hasta un pH comprendido entre 6.5 y 7.0, se miden 10 ml. y se mezclan en un tubo de ensayo con 2 gotas de tintura de yodo $\frac{1}{2}$ y con 10 ml. de solución alcohólica saturada de acetato de cinc, en otro tubo de ensayo se colocan 10 ml. de la muestra neutralizada y se agregan 2 gotas de tintura de yodo $\frac{1}{2}$ y 10 ml. de alcohol absoluto. Se filtran ambos líquidos y los filtrados se examinan con una lámpara de arco u otra fuente luminosa adecuada. Pueden presentarse dos posibilidades.

I. Solo existe fluorescencia en el tubo que contiene la orina tratada con acetato de cinc; en este caso se puede realizar

la valoración de urobilina por la técnica de Doyer (loc.cit) teniendo en cuenta las observaciones hechas sobre la exactitud de la comparación fluorométrica.

II.—Existe fluorescencia en ambos tubos; en ese caso puede procederse a la determinación de urobilinoídes por alguna de las siguientes técnicas:

- a) Se efectúa una valoración del contenido de urobilina por diferencia entre la fluorescencia total (fluorescencias interferentes y urobilina) y la fluorescencia natural (fluorescencias interferentes) de la orina, como ya indicamos antes.
- b) Se separa la urobilina de las sustancias fluorescentes extrañas por medio de una extracción cloroformica, aprovechando luego la propiedad que tienen las soluciones alcalinas diluidas de extraer la urobilina disuelta en el cloroformo. Se separa la fase acuosa, se neutraliza y se determina el contenido de urobilina.
- c) Se procede de la valoración fluorométrica de los urobilinoídes al estado de urobilina, realizando en cambio una determinación del contenido de urobilinoídes al estado de urobilinógeno.
- d) Otra posibilidad para separar urobilina y riboflavina consistiría en el empleo de resinas intercambiadoras de iones que fijan específicamente la riboflavina, determinando el contenido de urobilina en el líquido efluyente.

El método más correcto a nuestro juicio es el c) en que se valora el contenido de urobilinógeno, las técnicas c) y b) sólo permiten obtener resultados aproximados y se justifican en los casos en que no se pueden conseguir los colorantes necesarios

para preparar los testigos utilizados en la determinación de urobilinógeno, mientras que la posibilidad d) no ha sido experimentada y la mencionamos solamente a título informativo.

Técnica para investigar urobilina en presencia de xeriflavina.

El principio en que se basa la técnica de Neumann (loc.cit.) es que la urobilina es extraída por el cloroformo mientras que la xeriflavina se hace insoluble en ese solvente cuando la orina se trata con ácido nítrico. La técnica es la siguiente.

Se mezclan 10 ml. de orina con 10 gotas de ácido clorhídrico concentrado y con 10 gotas de solución de nitrito de sodio 5%, luego se añaden 2 gotas de tintura de yodo y 10 ml. de cloroformo. Se agita la mezcla, se separa la fase cloroformica y se mezcla con la mitad de su volumen de una solución alcohólica saturada de acetato de cinc, se añade 1 gota de hidróxido de amonio concentrado y se filtra. Si el filtrado es fluorescente indica la presencia de urobilina.

Hemos realizado diversas experiencias aplicando la técnica a una solución de xeriflavina al 0.01% y a mezclas experimentales de dicha solución con orina, en forma similar a la que describimos para la investigación de urobilina en presencia de riboflavina, obteniendo resultados que confirman el principio en que se basa el método.

No hemos podido aplicar la técnica de Neumann (loc.cit.) a orinas conteniendo xeriflavina pues nos ha sido imposible hallar pacientes que estuvieran sometidos a la administración de dicha sustancia.-

VALORACION DE UROBILINOGENO

Para determinar el contenido de urobilinógeno en la orina hemos empleado el método de Schwartz, Sherev y Watson (loc. cit.) y también el método de Watson, Schwartz, Sherev y Bartie (loc. cit.).

Describiremos ahora la forma en que se han preparado los reactivos necesarios para la aplicación de dichas técnicas, dejando para luego la explicación detallada de los métodos. Los reactivos necesarios son los siguientes.

Solución de sulfato ferroso heptahidrato al 20% (P/V): Hemos utilizado una droga de marca B.D.M. Para preparar una solución al 20% se deben disolver 20 g. de la sal en 92 ml. de agua destilada, pero como la sal ferrosa en solución se oxida fácilmente es preferible pesar varias porciones de 5 g. que se guardan en tubos pequeños bien tapados. Para realizar cada determinación se disuelve el contenido de un tubo en 23 ml. de agua destilada.

Solución de hidróxido de sodio 10% (P/V): Hemos utilizado una droga de marca Merck. Se pesan 100 g. de la droga y se disuelven en 400 ml. de agua destilada, se deja enfriar la solución y se diluye hasta un volumen final de 1000 ml. con agua destilada.

Eter de petróleo. Hemos utilizado un producto Ataner, Farmacopea Argentina III. Se deja en contacto con ácido sulfúrico concentrado durante 72 horas. se separa la fase etérea y se destila, recogiendo la fracción que pasa entre 30 y 60°C. La curva de destilación es la siguiente: entre 30 y 40°C destila un 12% entre 40 y 50°C un 72% y entre 50 y 60°C un 8%, el resto se

desecha.

Como el éter de petróleo es altamente inflamable y forma mezclas explosivas con el aire, su destilación debe efectuarse tomando ciertas precauciones.

El calentamiento del balón de destilación se realiza a baño de maría, mientras que el extremo de la alargadera del refrigerante se hace pasar a través de un tapón que va insertado en la probeta colectora. El tapón posee una pequeña sanalota lateral que permite la salida del aire, y la probeta colectora se mantiene sumergida hasta unos centímetros de su borde superior en un recipiente que contiene una mezcla de agua y hielo.

Solución de para-dimetilamino: ensalchido.— Hemos utilizado una droga de marca Gurr's. Se pesan 0.7 g. de la droga y se disuelven en 150 ml. de ácido clorhídrico concentrado, luego se agregan 100 ml. de agua destilada.

Solución saturada de acetato de sodio.— En un principio se nos presentó la dificultad de no conseguir una droga realmente pura. Esto es importante, pues tal como observan los autores del método, la pureza de la sal es fundamental para obtener un resultado correcto; más adelante describiremos los errores a que puede llevar el uso de una solución preparada con una sal impura.

La primera droga empleada fué un acetato de sodio de marca Atmor titulado "para análisis". Al disolver la sal en agua destilada calentada a 40°C la solución tomó rápidamente color pardo por lo cual decidimos recristalizar la sal. Luego de disolver la mayor cantidad posible de acetato de sodio en la solución calentada a ebullición filtramos en caliente a través de un embudo de Buchner preparado con dos papales de filtro S. y S.

589² (bonda blanca). El filtro quedó cubierto de una sustancia de aspecto bituminoso y la solución pasó coloreada. Los cristales que obtuvimos por enfriamiento de esta solución estaban impurificados y tampoco servían para preparar una solución saturada incolora, siendo necesarias dos recristalizaciones más para obtener cristales realmente puros, con los cuales logramos preparar una solución saturada sin vestigios de color.

Es interesante destacar la gran estabilidad de las soluciones sobresaturadas de acetato de sodio. Si la solución sobresaturada que se prepara para recristalizar la sal se deja enfriar lentamente y en reposo, se obtiene a temperatura ambiente una solución siruposa pero sin traza de cristales. La agitación de la solución y el agregado de unos cristales produce la aparición instantánea de los cristales de acetato de sodio que crecen con rapidez en forma de hermosas agujas prismáticas.

Posteriormente logramos conseguir un acetato de sodio "para análisis" de marca Riedel-de Haën, con el cual no tuvimos dificultad para preparar directamente una solución saturada perfectamente incolora.

Líquido de comparación.— En su preparación se emplean dos colorantes producidos por la firma De Fent, a cuyo Laboratorio Central agradecemos la amabilidad de facilitarnos dichas sustancias.— Los colorantes son el Carmín pontacil 2 B y el Violeta pontacil 6 B 1504.

Se pesan 5 mg. de Carmín y 95 mg. de Violeta y se disuelven en 100 ó 200 ml. de ácido acético 0.2% agregando luego la cantidad necesaria del mismo para llevar el volumen final hasta 1000 ml. Se obtiene una solución de un hermoso color violeta a la cual denominamos solución madre n° 1.

Antes de llevar a volumen es aconsejable lavar los vidrios de reloj donde se pesan los colorantes con pequeñas porciones de ácido acético 0.5%, pues se trata de polvos muy finos que se adhieren en las rayaduras del vidrio, esto no se observa a simple vista pero al añadir el ácido acético 0.5% sobre el vidrio de reloj se comprueba que el líquido se colorea de rojo. El ácido acético 0.5% se prepara midiendo 4.8 ml. de ácido acético glacial y diluyendo a 1000 ml. con agua destilada.

Para obtener el líquido de comparación se mezclan 200 ml. de la solución madre n° 1 con 1000 ml. de ácido acético 0.5%, se obtiene una solución de color rojo violado a la cual denominamos solución stock n° 1.

La intensidad de su color es equivalente al que produce una solución que contiene 0.60 mg. de urobilinógeno por cien ml. de solución al reaccionar con el reactivo de para-dimetilaminobenzaldehído.

Para disminuir los efectos del error de pesada preparamos otra solución disolviendo 50 mg. de Carmín y 950 mg. de Violeta en 1000 ml. de ácido acético 0.5%. Se miden 100 ml. de esta solución y se diluyen a 1000 ml. con ácido acético 0.5% obteniendo así la solución madre n° 2. Se mezclan 200 ml. de esta última solución con 1000 ml. de ácido acético 0.5% y se obtiene la solución stock n° 2.

Todas las soluciones se conservan en frascos de color caramelo, a los cuales se añaden 4 ó 5 ml. de cloroformo como conservador.

METODO DE SCHWARTZ, SEBROY Y WATSON

Técnica de valoración.

La orina se recoge durante 24 horas en envases de vidrio

color caramelo que contienen 50 ó 100 ml. de éter de petróleo que actúa como conservador y 5 g. de carbonato de sodio que previene la disolución del cromógeno en el éter de petróleo, al terminar la recolección se mide el volumen total de la orina. El método también puede aplicarse a una muestra aislada.

Se colocan 50 ml. de orina en un matras de Erlenmeyer y se agregan 25 ml. de una solución reciente de sulfato ferroso 20% y luego 25 ml. de solución de hidróxido de sodio 10%, se mezcla y se deja en la oscuridad durante 1 hora, luego se filtra. El filtrado no debe presentar la banda de absorción de la urobilina en 5080 Å.

Luego se realiza un ensayo cualitativo para determinar el volumen de filtrado que se va a extraer con éter de petróleo, para ello se mezclan 2 ml. de filtrado con 2 ml. de la solución de para-dimetilaminobenzaldehído, se agita y se agregan 4 ml. de solución saturada de acetato de sodio, agitando nuevamente. Si el color desarrollado es muy intenso se extrae con éter de petróleo 1 ml. de filtrado, si es rojo pálido se extraen 5-10 ml., si es rosa débil se extraen 10-25 ml. y si no hay coloración se extraen 50 ml.

La cantidad determinada se coloca en una ampolla de decantación y se lleva a 25 ml. con agua destilada si su volumen fuese inferior a éste, se agregan 50 ml. de éter de petróleo y 5 ml. de ácido acético glacial, se agita y se deja reposar para que se separen ambas fases. En caso de formarse una emulsión puede romperse con unas gotas de ácido acético glacial o de alcohol etílico de 96°. Se separa el extracto etéreo y la fase acuosa se extrae dos veces más con 25 ml. de éter de petróleo cada vez. Se reducen

todos los extractos y se llevan con pequeñas cantidades de agua destilado, desechando los líquidos de lavado.

La fase etérea se mezcla con 2 ml. del reactivo de para-dimetilaminobenzaldehído y se agita, luego se añaden 6 ml. de solución saturada de acetato de sodio y se agite nuevamente. Se separe la fase acuosa coloreada y se vuelve a repetir el tratamiento de la fase etérea hasta que la fase acuosa no se colorea, los extractos acuosos se reúnen y se llevan a un volumen conveniente con agua destilada. Durante el tratamiento de la fase etérea puede aparecer un precipitado fino de color castaño rojizo entre las dos fases que se debería al indol o al escatol, ya que ocurre un fenómeno similar cuando dichas sustancias son tratadas con los mismos reactivos del método.

Sustancias interferentes.

Aunque la técnica original no le indique hemos introducido una variante en el ensayo cualitativo, que tiene por objeto determinar si el compuesto coloreado que se forma en la reacción de Ehrlich (loc.cit.) se debe al urobilinógeno o al porfobilinógeno, ya que ambos compuestos dan el mismo color con el reactivo de Ehrlich. El porfobilinógeno es un cromógeno que se presenta en la orina de personas que padecen de porfiria aguda.

Para diferenciar ambos cromógenos, se extrae con cloroformo el compuesto coloreado que se obtiene en el ensayo cualitativo, si éste pasa al cloroformo se trata de urobilinógeno pero si permanece en la fase acuosa indica la presencia de porfobilinógeno.

La reacción anterior se debe a Watson y Schwartz y se pueden consultar mayores detalles sobre su aplicación en la obra de

Merera (20):

Recientemente, Baumgürtel (21) ha demostrado que en la orina de personas que ingieren grandes cantidades de vegetales puede hallarse presente un cromógeno derivado de la clorofila, denominado filocitrinógeno. Este compuesto reacciona con el reactivo de Ehrlich y no se puede diferenciar de los urobilinoídes por procesos de extracción, pero difiere de ellos en que no da la reacción de Schlesinger (loc.cit.). Por tratamiento con cloruro férrico en ácido clorhídrico concentrado hirviendo, el filocitrinógeno origina un compuesto coloreado similar a la mesobiliviolina, con la diferencia de que se disuelve en solución de hidróxido de sodio con color verde mientras que la mesobiliviolina lo hace con color violado. Mientras no se tengan datos sobre la frecuencia con la que se puede presentar dicho cromógeno en la orina, no creemos que se justifique su investigación.

Observaciones sobre la técnica.--

Describimos a continuación algunas variantes que hemos introducido en la técnica original. La recolección de la orina y el proceso de reducción de los urobilinoídes se efectúan en la forma indicada. En los laboratorios de análisis clínicos no es frecuente poseer un espectroscopio para observar la desaparición de la banda de absorción de la urobilina como prueba de que la reducción es total, por ello adoptamos el siguiente criterio: se filtran 2 ó 3 ml. de la mezcla, luego de la reducción de 1 hora que indica la técnica, y se neutraliza el filtrado hasta un pH de 6.0, se agrega un volumen igual de solución alcohólica saturada de acetato de cinc y se omite el agregado de tintura de yodo. La observación del filtrado en la forma habitual revela si queda urobilina sin reducir.

Si ello sucede, se añaden otros 25 ml. de solución de sulfato ferroso 20% y 25 ml. de solución de hidróxido de sodio 10% y se deja en la oscuridad durante otra hora. Para el cálculo final se debe tener en cuenta esta nueva dilución.

Para separar el precipitado de hidróxidos ferroso y férrico, luego del período de reducción, se puede emplear la centrifugación o la filtración. En el primer caso, si se coloca el líquido a centrifugar en los cuatro tubos del aparato se obtiene en una sola operación el volumen necesario para la extracción con éter de petróleo, aunque sea el máximo de 50 ml. En el segundo caso, la filtración es lenta pero logramos resultados suficientemente rápidos empleando simultáneamente dos embudos de véstago largo, armados con papel de filtro S. y S. 589¹ (banda negra), el cual se usa plegado para aumentar la superficie de filtración.

Luego de efectuar el ensayo cualitativo del filtrado, con la variante que indicamos antes, se agota con éter de petróleo el volumen de filtrado así determinado y la fase éterea se extrae a su vez con las soluciones de para-dimetilaminobenzaldehído y de acetato de sodio hasta obtener un extracto incoloro.

Los extractos sucesivos coloreados se llevan a un volumen conveniente, el cual podrá ser de 25, 50 ó 100 ml. ya que depende del número de extracciones que sea necesario realizar.

Para determinar el contenido de urobilinógeno a que corresponde la coloración de la fase sucesiva se utiliza la solución stock, la cual se emplea para preparar una serie de diluciones de las cuales se conoce su equivalencia en mg. de urobilinógeno por cien ml. de solución. En el cuadro siguiente se ob-

servan las proporciones en que se debe mezclar la solución stock con ácido acético 0.5% para obtener la serie de diluciones cuya equivalencia con una solución de urobilinógeno se detalla en la última columna vertical.--

Dilución nº	Solución stock Acido acético Urobilinógeno		
	ml.	ml.	mg. / ml.
1	20.0	0.0	0.60
2	16.7	3.3	0.50
3	13.3	6.7	0.40
4	10.0	10.0	0.30
5	8.4	11.6	0.25
6	6.6	13.4	0.20
7	5.0	15.0	0.15
8	3.3	16.7	0.10
9	1.7	18.3	0.05

Esta serie de diluciones puede usarse para realizar la curva de calibración de un colorímetro fotoeléctrico o bien emplearse como juego de testigos en una colorimetría a visión directa. Vamos a tratar cada caso en particular.

Determinación final mediante una fotocolorimetría, utilizando la serie de diluciones para calibrar el colorímetro fotoeléctrico.--

Los autores del método usan un colorímetro fotoeléctrico de marca Evelyn y emplean el filtro de transmisión de 5650 Å, en nuestro caso trabajamos con un colorímetro fotoeléctrico de marca Cronción, Modelo B, y usamos en todas las determinaciones el filtro verde, el cual tiene un rango de transmisión similar al

mencionado antes. Dicho aparato pertenece al Laboratorio de Hematología del Hospital Mivedavis, a cuyo personal y también al del Laboratorio de Urología, agradecemos profundamente por las facilidades que nos brindaron en todo momento.

Antes de realizar las lecturas se debe centrar el aparato, para lo cual se utiliza un blanco formado por una mezcla de solución saturada de acetato de sodio y de solución de para-dimetilaminobenzalohido en la relación de 3 a 1, V/V. Se comienza girando la perilla de control que permite ajustar el cero mecánico hasta lograr que la aguja del galvanómetro coincida exactamente con el trazo marcado en el vidrio que la cubre, luego se coloca el tubo colorimétrico que contiene el blanco, se conecta la fuente luminosa y el circuito fotoeléctrico y se gira la perilla de control que permite ajustar el cero óptico hasta lograr nuevamente la coincidencia de la aguja con el trazo.

A continuación, se desconecta el circuito fotoeléctrico y se retira el tubo colorimétrico, se enjuaga con agua destilada y luego con la solución cuya lectura se va a realizar y se llena con dicha solución. Se coloca el tubo en su lugar, se conecta el circuito fotoeléctrico y se gira el dial hasta que la aguja y el trazo vuelven a coincidir. Se lee en la escala logarítmica inferior el número de divisiones que ha girado el dial y se confecciona una tabla de valores.

Para obtener la curva de calibración del aparato se llevan sobre las ordenadas de un papel milimetrado los valores de la concentración equivalente de cada dilución y sobre las abscisas la lectura correspondiente a cada una y se unen los puntos obtenidos.

Mientras se realizan las lecturas se deben tomar ciertos

precauciones, por ejemplo:

- a) luego de conectar la fuente luminosa se dejan transcurrir unas minutos antes de comenzar a trabajar para permitir que se establezca la intensidad luminosa.
- b) no se debe dejar conectado o desconectar el circuito fotoeléctrico luego de retirar el tubo colorimétrico, pues los cambios pronunciados en la intensidad luminosa que llega a la célula fotoeléctrica provocan un rápido cansancio de la misma que se traduce en una respuesta lenta; lo correcto es desconectar el circuito fotoeléctrico antes de retirar el tubo colorimétrico.
- c) En todas las determinaciones se debe usar el tubo colorimétrico según una misma dirección diametral, para asegurarse siempre un espesor idéntico de la capa absorbente, para ello se pueden hacer con una lima dos muescas diametralmente opuestas en el borde superior del tubo, el cual se coloque de modo que las muescas coincidan siempre con uno de los dos ejes del aparato.
- d) Es aconsejable controlar el cero óptico del aparato cada tres o cuatro lecturas para prevenir errores como el que describiremos luego en la primera curva de calibración que realicemos. Para ello se coloca el tubo colorimétrico con el blanco y se conecta el circuito fotoeléctrico, la aguja no debe desviarse. Si así ocurriese se debe centrar de nuevo el aparato y recomenzar las lecturas.

Para realizar la calibración del aparato preparamos una serie de diluciones con la solución stock n° 1 y otra serie de diluciones con la solución stock n° 2; la preparación de dichas diluciones ha sido descrita en la página 110. En el cuadro n° 13

consignamos los resultados obtenidos con cada serie de diluciones.

CUADRO N° 11

CURVAS DE CALIBRACION I-1 Y I-2

Dilución n°	Solución stock n° 1	Solución stock n° 2
	Lectura en el colorímetro fotoeléctrico	
	divisiones	
1	240.0	240.0
2	210.0	198.0
3	170.0	156.0
4	127.5	117.0
5	103.0	93.5
6	82.5	72.0
7	63.0	50.0
8	42.0	29.0
9	22.0	10.0

Es evidente que hay una diferencia entre las diluciones 2 a 9 de ambas soluciones stock. Sin embargo al trazar las curvas de calibración sobre papel milimetrado se obtienen los gráficos I-1 y I-2, que se aprecian en la página 120. Se observe entonces que en el gráfico I-1 los puntos se hallan alineados con excepción del que corresponde a la dilución n° 1, pero como este representa la solución stock original y no una dilución y además coincide con el punto n° 1 de la curva I-2, suponemos que al retirar el tubo colorimétrico para cambiar la dilución luego de realizar la primera lectura, hemos movido involuntariamente la perilla de control del es

Gráfico I-1

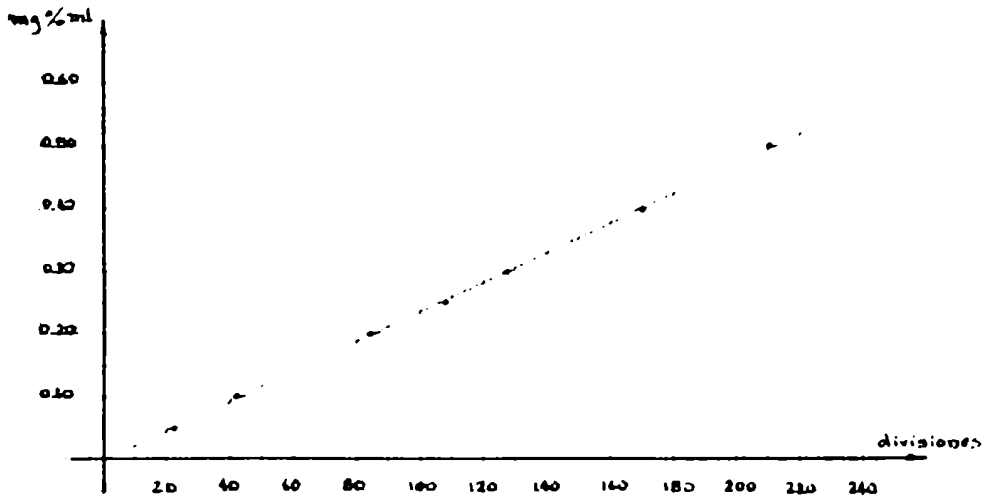
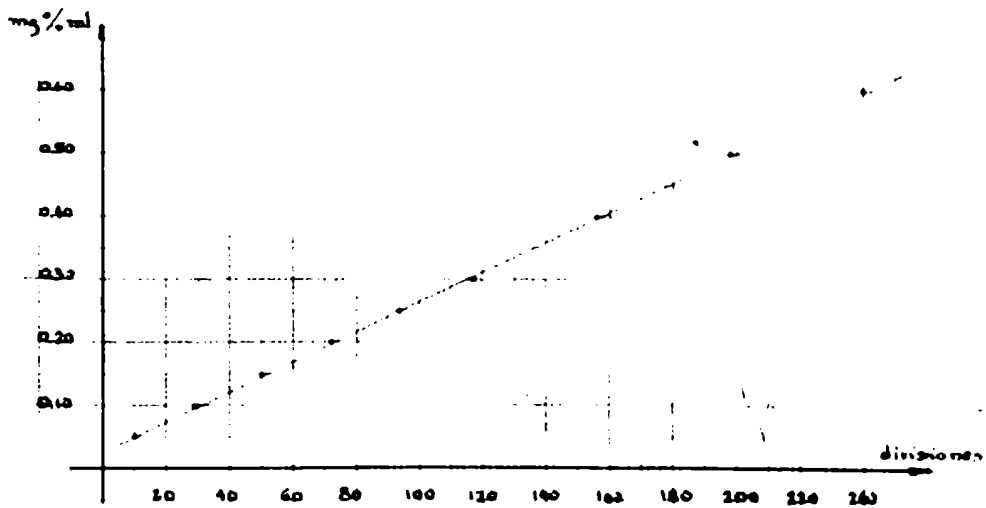


Gráfico I-2



se óptico, descentrando el aparato y generando de este forma un error aditivo.

Para comprobar si nuestra suposición era acertada realizamos dos nuevas curvas de calibración. Los valores obtenidos se observan en el cuadro n° 14 y la representación gráfica de los mismos se halla en el gráfico de la página 122.

CUADRO N° 14
CURVAS DE CALIBRACION II-1 y II-2

Dilución n°	Solución stock n° 1	Solución stock n° 2
	Lectura en el colorímetro fotoeléctrico	
	divisiones	
1	240.0	240.0
2	199.5	196.5
3	158.0	157.0
4	117.5	117.0
5	95.5	94.5
6	73.5	73.5
7	52.0	51.0
8	32.0	31.5
9	10.0	10.0

La curva II-1 permite apreciar que todos sus puntos se hallan alineados y que sus valores coinciden apreciablemente con los de la curva II-2.

Finalmente, para tener una mayor seguridad de que los resultados obtenidos eran correctos, realizamos otras dos series de diluciones y efectuamos dos nuevas curvas de calibración. Las lecturas obtenidas se consignan en el cuadro n° 15.-

Gráfico II-1

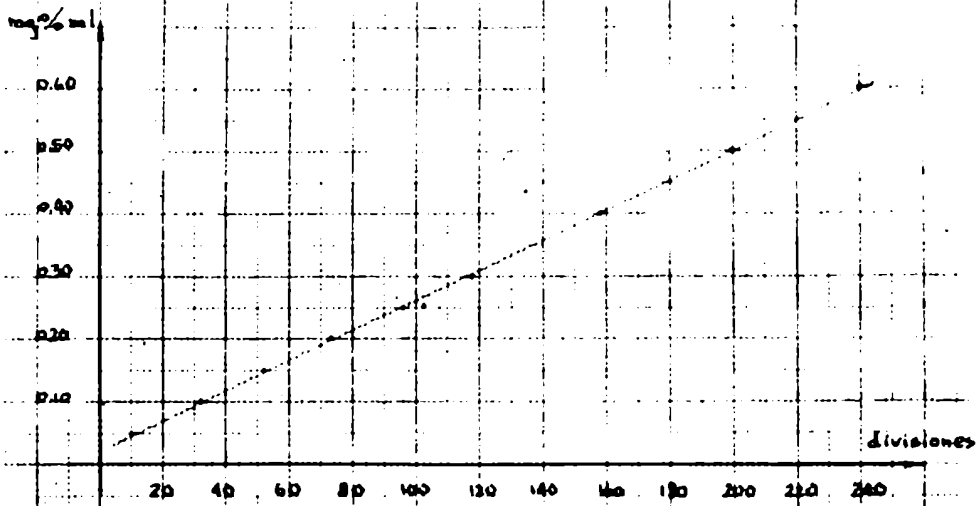
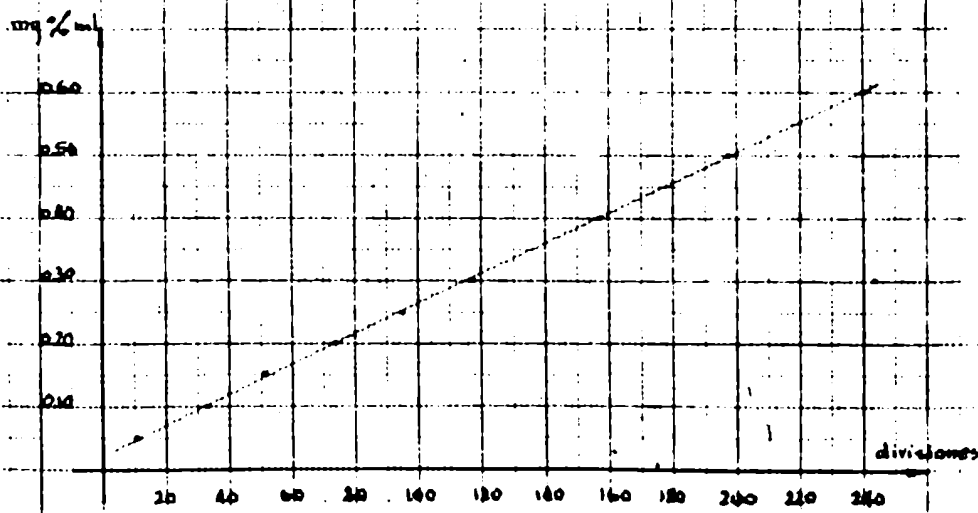


Gráfico II-2



CUADRO N° 15
CURVAS DE CALIBRACION III-1 y III-2

Dilución n°	Solución stock n° 1	Solución stock n° 2
	Lectura en el colorímetro fotoeléctrico	
	divisiones	
1	240.0	240.0
2	199.0	198.0
3	158.0	157.0
4	118.5	118.0
5	96.0	95.5
6	74.0	73.0
7	52.5	52.0
8	31.0	31.5
9	10.0	10.5

En el gráfico III de la página 124 se observa la representación gráfica de los valores correspondientes al cuadro n° 15.

El estudio de todas las curvas revela que los puntos correspondientes a las lecturas efectuadas siguen la ley de Lambert-Beer en forma casi perfecta, lo que permite usar estas curvas para hallar el resultado de una lectura cualquiera por interpolación de la misma.

Por otra parte, como las curvas de calibración son casi idénticas independientemente de que se emplee la solución stock n° 1 o la solución stock n° 2, resulta evidente que no es necesario pesar inicialmente una cantidad de colorante diez veces superior a la que indica la técnica original, con el objeto de disminuir los efectos del error de pesada.

Gráfico III-1

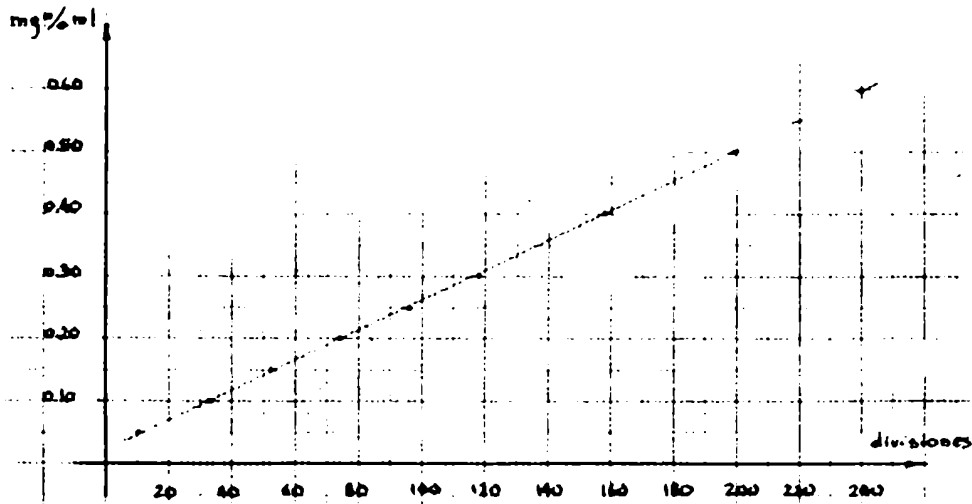
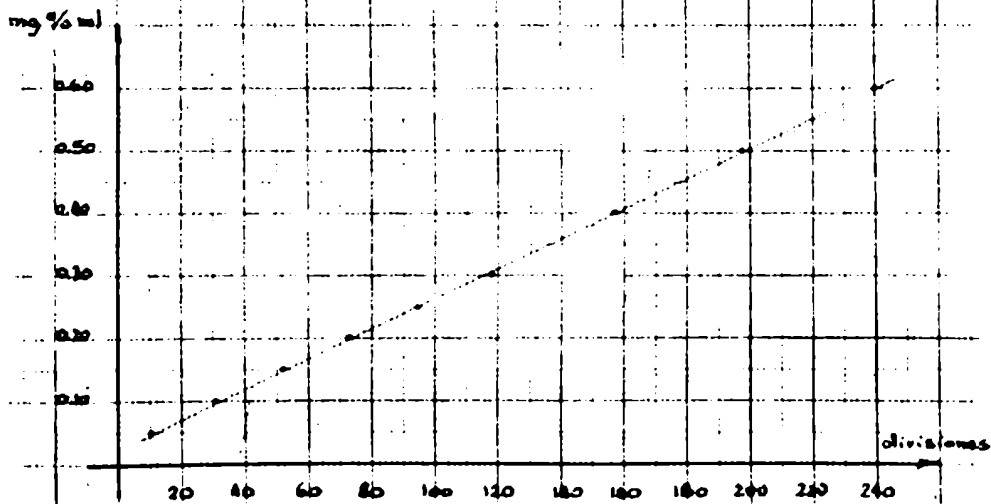


Gráfico III-2



Al describir la preparación de la solución saturada de acetato de sodio dijimos que la pureza de la sal era fundamental y que el uso de una sal impura se traducía en errores apreciables. El cuadro n° 16 corresponde a una table de valores obtenida cuando el aparato se centró con un blanco de constitución similar a la que indicamos antes, pero utilizando una solución saturada de acetato de sodio preparada con el producto obtenido en la primera recristalización de la sal. El cuadro n° 17 representa los valores obtenidos cuando se empleó una solución saturada del acetato de sodio recristalizado por segunda vez.

En las diluciones 8 y 9 del cuadro n° 16 y en la dilución 9 del cuadro n° 17 no fué posible efectuar las lecturas pues quedaban fuera de la escala del aparato, lo que indica que la absorción luminosa era mayor para el blanco que para esas diluciones.

CUADRO N° 16

Dilución N°	Lectura divisiones
1	198.0
2	150.0
3	118.5
4	81.0
5	60.5
6	39.0
7	20.5
8	-----
9	-----

CUADRO N° 17

Dilución N°	Lectura divisiones
1	221.0
2	160.0
3	138.5
4	100.5
5	81.0
6	60.0
7	41.0
8	19.0
9	-----

Se observa que a medida que se eliminan las impurezas que dan color a la solución de acetato de sodio y por lo tanto el blanco, las lecturas aumentan y se acercan a los valores indicados en los cuadros 14 y 15, que se obtienen cuando se pre-

para el blanco con una solución de acetato de sodio muy puro.

Cálculo.

Una vez que se ha calibrado correctamente el colorímetro fotoeléctrico se procede de la siguiente forma. Los extractos secos coloreados se llevan a un volumen conveniente con agua destilada, como se indicó en la página 115. Se llena el tubo colorimétrico con esta solución y se efectúa la lectura de la misma en el colorímetro fotoeléctrico, esta lectura se interpole en la curva de calibración y se obtiene el valor equivalente de la concentración de urobilinógeno.

Si llamamos g a este último valor, V_p al volumen final a que se llevan los extractos secos coloreados y V_f al volumen de filtrado que se ha extraído con éter de petróleo, el resultado se obtiene aplicando la siguiente fórmula:

$$X = 20 \times g \times \frac{V_f}{V_p}$$

El resultado queda expresado en mg. de urobilinógeno por mil ml. de orina.

Determinación final mediante una colorimetría a visión directa, utilizando la serie de diluciones como juego de testigos.

Comenzamos por hacer una selección de tubos de diámetro uniforme para colocar en ellos las diluciones de la solución stock. Los tubos tienen una capacidad aproximada de 30 ml y se desengrasan perfectamente hirviéndolos primero con una solución de detergente y dejándolos luego sumergidos en mezcla sulfocrómica durante 12 horas.

Los tubos limpios se colocan en una gradilla y se deja es-

currir en cada uno de ellos el contenido de una pipeta aforada de 25 ml. y se separan los tubos en los que el menisco se halla a igual altura, luego de vaciarlos y secarlos se repite el proceso sobre la primera selección de tubos pero usando ahora una pipeta aforada de 10 ml., y se apartan nuevamente los tubos cuyos meniscos de agua se encuentren a igual altura. En esta forma logramos separar dos series de 13 tubos cada una, luego de comparar 90 tubos.

De cada serie se destinan nueve tubos para contener las diluciones; de los cuatro restantes, uno se llena con agua destilada, dos con un blanco idéntico al que se emplea en el colorímetro fotoeléctrico y en el tubo restante se coloca el líquido coloreado que se va a comparar.

Los nueve tubos testigos se llenan con la serie de diluciones indicadas en la página 116 y se agrega a cada uno 9 ó 10 gotas de cloroforme, luego se tapan y se sellan los tapones con parafina, para evitar que se evapore parte del agua lo cual produciría una variación en la intensidad del color de los testigos. Luego de un tiempo se observan pequeñas gotas de agua depositadas en la zona superior interna de los tubos, por ello se deben invertir un par de veces antes de realizar la comparación colorimétrica. Es preferible emplear tapones de plástico, o bien se pueden utilizar los tapones de corcho común pero recubiertos con un trozo de polietileno, de esta forma se asegura una mayor impermeabilidad del cierre y se evita que la solución se ponga en contacto con un material absorbente como es el corcho.

Inicialmente preparamos dos series de diluciones, una la conservamos como serie de testigos mientras que la otra nos per-

mitió estudiar la influencia del tiempo y de la luz sobre la intensidad del color de los testigos.

Con tal objeto, realizamos la lectura en el colorímetro fotoeléctrico de dicha serie de diluciones luego de su preparación, dos meses más tarde y cuatro meses después sucesivamente. Los resultados del cuadro n° 18 revelan que no hay variación apreciable en la intensidad del color de los testigos.

CUADRO N° 18

ESTUDIO SOBRE LA CONSERVACION DE LOS TESTIGOS

Dilución n°	Lectura en el colorímetro fotoeléctrico		
	Luego de la preparación	Luego de dos meses	Luego de cuatro meses
	divisiones	divisiones	divisiones
1	240.0	240.0	240.0
2	199.0	199.5	198.0
3	157.5	157.0	157.0
4	117.0	117.5	116.5
5	94.5	95.5	95.0
6	72.0	73.0	73.0
7	52.5	52.5	51.5
8	31.0	31.0	31.0
9	10.0	10.5	10.0

Luego de realizar la primera lectura de toda la serie se cierran los tubos y se parafinan los tapones, los tubos se abren dos meses después para efectuar la segunda lectura y se vuelven a cerrar y a parafinar hasta dos meses más tarde cuando se realiza la tercera lectura. En cada oportunidad que se abren los tubos se

añaden 2 ó 3 gotas más de cloroformo a cada uno antes de cerrarlos nuevamente. Hemos tomado estas precauciones pues comprobamos que el valor de la lectura disminuye rápidamente con el tiempo cuando no se parafrinan los tapones, como se observa la desaparición simultánea del cloroformo suponemos que una parte del colorante se destruye en presencia de dicho solvente que actúa como conservador. En resumen, podemos afirmar que el color de los testigos se mantiene estable si se toma la precaución de parafrinar perfectamente los tapones de los tubos que contienen las diluciones de la solución stock.

Para realizar la colorimetría se emplea una caja de comparación, similar al comparador de Walpole, cuyo diseño queda librado al criterio del analista. En nuestro caso hemos construido una caja cuya forma y dimensiones se indican en el gráfico IV de la página 131.

La parte A está destinada a contener los tubos y consta de seis compartimientos de sección cuadrangular. Los tubos se disponen en el siguiente orden: en los compartimientos 2 y 6 se colocan los dos tubos que contienen el blanco, en el compartimiento 3 un tubo con agua destilada, en el compartimiento 4 el tubo que contiene el líquido coloreado en examen y en los compartimientos 1 y 5 se van cambiando los tubos testigos hasta obtener la igualdad de colores con la muestra examinada.

Los colores se observan a través de tres aberturas practicadas en cada uno de los tres tabiques paralelos al fondo de la caja, como se pueda apreciar en la figura A, donde sólo hemos dibujado en perspectiva los tabiques y aberturas correspondientes a los compartimientos 1 y 2. La caja se recubre, por dentro y por fuera, con una pintura opaca de color negro.

La parte B está destinada a proveer una intensidad luminosa similar para todas las determinaciones, aunque se puede prescindir de ella si así se desea. Está formada por una caja que se adapte a la parte A y en el centro de su tabique anterior está colocada una lámpara L de tipo Mignon, de 15 W. y para 220 V., cuyo contorno en líneas de trazo se observa en la figura D. La pared posterior de la caja se forra con papel opaco de color blanco y las laterales con papel opaco de color negro.

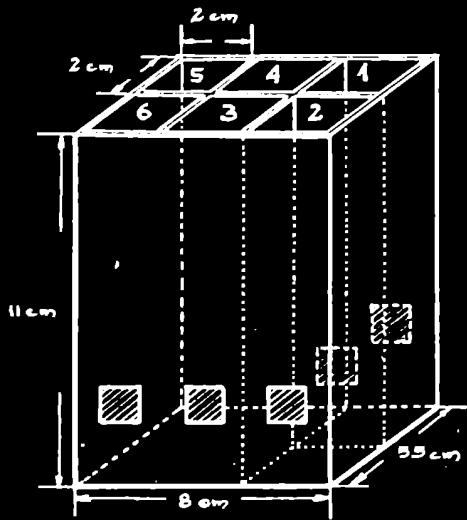
Ambas partes se fijan en la posición que se observa en las figuras C y D, que corresponden a una vista frontal y a una lateral respectivamente.

Las medidas que se dan en el gráfico son de relativo valor, pues las dimensiones de los compartimientos y de los orificios de observación están condicionadas al diámetro de los tubos que se emplean.-

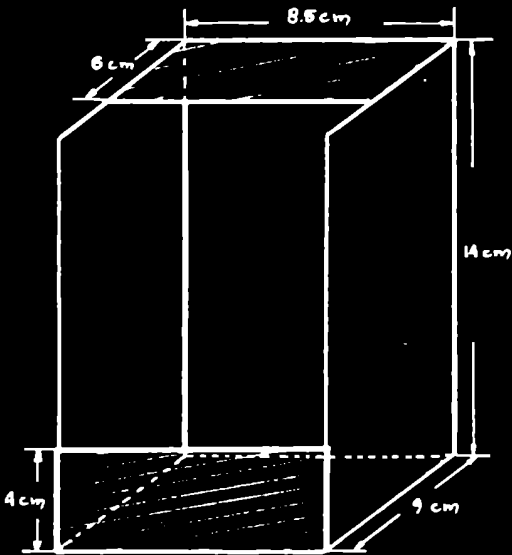
Cálculos:

Una vez que se ha determinado cual es el tubo testigo cuya coloración coincide con la del líquido en examen, se busca su equivalencia en mg. de urobilinógeno y con ese valor g se aplica la fórmula de la página 126.-

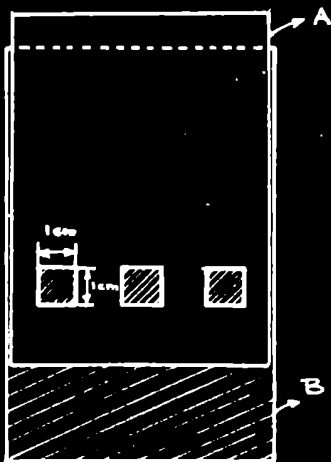
Grafico IV



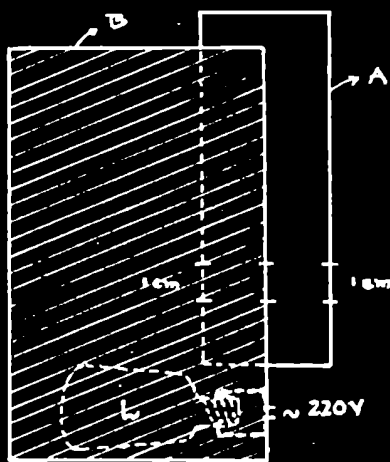
A



B



C



D

Reproducibilidad de los resultados.

Para estudiar la reproducibilidad de los resultados realizamos dos determinaciones paralelas sobre cada una de las muestras del cuadro n° 19.--

CUADRO N° 19
REPRODUCIBILIDAD DE LOS RESULTADOS

Muestra n°	1a. determinación	2a. determinación
	Urobilinógeno	
	mg.°/cc ml	
1	0.80	0.80
2	1.50	1.55
3	2.10	2.18
4	0.92	0.90
5	0.60	0.63
6	1.88	1.80

Se puede apreciar que los valores de cada par de determinaciones muestran una coincidencia muy buena. Las lecturas se efectuaron en el colorímetro fotoeléctrico.

Comparación de ambas técnicas de lectura.

Sobre otra serie de muestras realizamos dos determinaciones paralelas para cada una de ellas, efectuando la lectura de una de las determinaciones en el colorímetro fotoeléctrico y la del duplicado en la caja de comparación. Los resultados obtenidos se consignan en el cuadro n° 20.

CUADRO N° 20

COMPARACION DE AMBAS TECNICAS DE LECTURA

Muestra	Lectura fotocolorimétrica	Lectura colorimétrica
n°	Urobilinógeno	
	mg. °/100 ml.	
1	2.8	3.0
2	0.5	0.5
3	4.3	4.0
4	3.7	3.5
5	5.8	6.0
6	3.1	3.0

Se observa que los valores del original y del duplicado son muy cercanos. Si bien es cierto que el método fotocolorimétrico es más exacto que el método colorimétrico, este último se puede emplear en la certeza de cometer un error pequeño. En la lectura colorimétrica, si la coloración del líquido examinado es intermedia entre dos testigos se toma el valor promedio de estos, como en la muestra n° 4.

Variación de la intensidad del color.

Para estudiar la variación en función del tiempo del color desarrollado en la reacción de Ehrlich (loc.cit.), realizamos lecturas sucesivas, cada cinco minutos, del líquido en examen. En el cuadro n° 21 se muestran los resultados obtenidos con diversas muestras.-

CUADRO N° 21

VARIACION DE LA INTENSIDAD DEL COLOR

Muestra n°	Lecture en el colorímetro fotoeléctrico a los:				
	5 min.	10 min.	15 min.	20 min.	25 min.
	divisiones				
1	81.5	81.5	81.5	81.0	79.5
2	18.0	18.0	18.0	17.5	17.0
3	22.5	22.0	22.5	22.0	21.0
4	106.5	106.5	106.0	106.0	105.5
5	76.5	76.5	76.5	73.0	73.0
6	48.0	48.0	48.0	47.0	44.0

Se deduce que el color permanece estable dentro de los primeros 15 minutos después de terminada la extracción de la fase etérea. En las muestras 3 y 4 hay un valor dentro de ese período que difiere ligeramente de los otros dos, pero creemos que ello se puede deber a una baja sensibilidad del aparato. En la técnica original los autores aconsejan realizar la lectura dentro de los 5 minutos pero a nosotros nos parece posible cumplir dicho lapso de tiempo hasta 15 minutos.

Valoración en muestras aisladas y en orinas de 24 horas.

Para estudiar la variación del resultado que se obtiene al valorar una orina de 24 horas o una muestra aislada, elegimos un sujeto al cual hicimos recoger cada emisión por separado durante 24 horas. Separamos 50 ml. de cada emisión y mezclamos el volumen restante de todas ellas, esta mezcla represente la orina de 24 horas.

CUADRO N° 22

VALORACION EN MUESTRAS AISLADAS Y EN ORINA DE 24 HORAS

Muestra	Urobilinógeno
	mg.º/100 ml.
a) (emisión de las 10 hs)	0.9
b) (emisión de las 13 hs)	1.0
c) (emisión de las 17 hs)	1.6
d) (emisión de las 22 hs)	1.2
Orina de 24 horas	1.4

Se observa que la excreción de urobilinógeno es mayor en horas de la tarde, como también que los resultados de las muestras aisladas difieren del valor que corresponde a la orina de 24 horas, que es el más representativo. Sin embargo la diferencia es pequeña y los valores están dentro del orden de aquel, es decir que el método puede aplicarse a una muestra aislada para obtener un dato significativo aunque no sea el más representativo.

Valores normales.

Hemos analizado 26 orinas de sujetos normales para observar entre que límites varía aproximadamente el contenido normal de urobilinógeno. En el cuadro n° 23 se muestran los resultados obtenidos.

CUADRO N° 23

VALORACION DE UROBILINOGENO EN ORINAS NORMALES

Muestra	Urobilinógeno	Muestra	Urobilinógeno
n°	mg.º/100 ml.	n°	mg.º/100 ml.
1	0.6	15	1.1
2	0.4	16	0.8
3	0.6	17	0.4

4	0.3	18	0.4
5	1.0	19	1.2
6	0.6	20	0.5
7	0.8	21	0.6
8	0.3	22	0.3
9	0.3	23	0.4
10	0.7	24	0.7
11	0.8	25	0.4
12	0.5	26	0.8
13	0.5	27	0.4
14	0.5	28	0.6

En sujetos normales hemos hallado valores que oscilan entre 0.3 y 0.8 mg. de urobilinógeno por mil ml. de orina en el 89.2% de los casos, los valores entre 0.8 y 1.0 se presentan en el 3.6% de los casos y valores entre 1.0 y 1.2 en el 7.2% de los casos.

Estudio comparativo.

Hemos analizado diversas orinas normales y patológicas, aplicando en cada muestra la técnica de Doyer y la de Schwartz, Sberov y Watson (S.S.W.)

Los resultados obtenidos con orinas normales se consignan en el cuadro n° 24.-

CUADRO N° 24

COMPARACION DE AMBAS TÉCNICAS EN ORINAS NORMALES

Muestra n°	Royer	S.S.W.
	Urobilina	Urobilinógeno
	U.S. ^o /100 ml.	mg. ^o /100 ml.
1	0.32	0.36
2	0.48	0.52
3	0.46	0.44
4	0.60	0.68
5	0.75	0.78
6	0.76	0.83
7	0.55	0.61
8	0.82	0.85
9	0.41	0.42
10	0.27	0.31

Se observa que los valores obtenidos por ambas técnicas difieren entre sí, pero en general la coincidencia es aceptable.

Queremos dejar constancia de que los dos valores que se obtienen para cada muestra están expresados en diferentes unidades, pero ello no tiene importancia a los fines comparativos pues la diferencia entre la fórmula molecular del pigmento y la del cromógeno es de sólo dos átomos de hidrógeno. Además no tiene objeto calcular el factor estequiométrico para convertir urobilina en urobilinógeno, pues en la orina existen diversos pigmentos y cromógenos en proporción variable.

Los resultados logrados en el análisis de diversas orinas patológicas se consignan en el cuadro n° 25.

CUADRO N° 25

COMPARACION DE AMBAS TÉCNICAS EN ORINAS PATOLÓGICAS

Muestra n°	Royer	S.S.W.
	Urobilina	Urobilinógeno
	U.S.°/cc ml.	mg.°/cc ml.
1	3.20	4.20
2	1.06	1.80
3	1.70	1.65
4	0.65	0.72
5	1.20	1.76
6	2.60	3.52
7	1.98	2.66
8	3.10	3.86

En la muestra n° 2 comprobamos la presencia de interferencias fluorescentes, efectuando la valoración de urobilina por diferencia, como ya indicamos.

El cuadro revela que en el caso de muestras patológicas existe una diferencia más acentuada entre los valores obtenidos con una técnica u otra.

Nuestro criterio personal es el siguiente. Se comienza por efectuar una determinación según la técnica de Royer ya que el proceso de valoración requiere menos tiempo, si el resultado indica una urobilinuria fisiológica se puede aceptar dicho valor pues el error es pequeño, pero si el resultado denota una urobilinuria patológica se debe efectuar una nueva valoración por la técnica de Schwartz, Sborov y Watson. En todos los casos en que se desee un resultado correcto también se ha de aplicar esta última técnica.

METODO DE WATSON, SCHWARTZ, SBOLOV Y BERTIE

Técnica de valoración.

Es una simplificación de la técnica anterior, en la cual se suprimen la etapa de reducción y la etapa de extracción. En consecuencia el método pierde especificidad y se incluyen en la valoración otras sustancias que interfieren con el reactivo de Ehrlich (loc.cit.), pero como el aumento de dichas sustancias es aproximadamente proporcional al aumento de urobilinógeno, se obtiene un dato semicuantitativo que tiene valor en análisis clínicos de rutina.

Se emplea una muestra de orina de dos horas que se recoge de la siguiente manera: el paciente vacía la vejiga a las 14 hs., ingiere un vaso de agua y recoge la orina emitida hasta las 16 hs.; la muestra se deja enfriar hasta la temperatura ambiente y se mide el volumen total.

La técnica puede aplicarse a muestras de 24 horas siempre que la orina se conserve bajo una capa de éter de petróleo y en presencia de carbonato de sodio, pero en este caso es preferible usar la etapa de reducción pues en ese lapso de tiempo una proporción considerable de urobilinógeno se oxida a urobilina.

Para realizar la determinación se miden 2.5 ml. de orina emitida entre las 14 y 16 horas, se mezcla con 2.5 ml. de solución de para-dimetilaminobenzaldehído y se agita, luego se añaden 5.0 ml. de solución saturada de acetato de sodio y se agita enérgicamente.

La lectura de la solución coloreada puede efectuarse en el colorímetro fotoeléctrico o en la caja de comparación. En cualquiera de los casos se usa un blanco que se prepara mezclando 2.5 ml. de orina y 5.0 ml. de solución saturada de acetato de sodio, se agita, se añaden 2.5 ml. de solución de para-dimetilaminobenzaldehído y se

agite enérgicamente.

Cálculo.

Si llamamos g a la concentración de urobilinógeno correspondiente a la lectura fotocolorimétrica o colorimétrica y Y el volumen de orina emitido entre las 14 y 16 horas, la cantidad total de urobilinógeno en el volumen de orina Y se calcula con la fórmula:

$$X = 0.04 \times g \times Y$$

y el resultado queda expresado en Unidades Ehrlich (U.E.) en Y ml. de orina; por otra parte se puede aplicar la fórmula:

$$X = 40 \times g$$

y el resultado queda expresado en Unidades Ehrlich (U.E.) por mil ml. de orina.

Observaciones sobre la técnica.

La mezcla de los reactivos puede realizarse en un tubo de ensayo común o directamente en el tubo colorimétrico, en nuestro caso preferimos emplear tubos de centrifuga de 14 x 100 mm. graduados hasta 10.0 ml. lo que permite medir las cantidades en el tubo y centrifugar la mezcla cuando la orina posee sedimento.

Las muestras de orina emitida entre las 14 y 16 horas presentan generalmente un sedimento escaso o nulo, en muchos casos se trata de fosfatos térreos que se disuelven al agregar la solución de para-dimetilaminobenzaldehído que tiene reacción fuertemente ácida, pero en otros casos no ocurre lo mismo y es entonces cuando se debe centrifugar para eliminar las partículas en suspensión que afectarían la lectura colorimétrica.

El color rojizo de la reacción de Ehrlich se intensifica cuando

se añade la solución de acetato de sodio pues se elimina el medio fuertemente clorhídrico del reactivo de para-dimetilaminobenzaldehído y se obtiene el pH óptimo para el desarrollo total del color. El medio fuertemente clorhídrico es necesario para producir la combinación del aldehído con el urobilinógeno.

Cuando se prepara el blanco agregando los reactivos en el orden que indica la técnica no se produce color o se desarrolla un color menos intenso que el de la orina tratada. Suponemos que el urobilinógeno no reacciona con el aldehído pues no tiene el medio fuertemente clorhídrico necesario, ya que el ácido clorhídrico del reactivo de Ehrlich se combina con el acetato de sodio que se agregó previamente, mientras que aquellas sustancias interferentes que no requieran medio ácido para combinarse con el aldehído, serían las responsables del color.

Al usar este blanco se compensa la absorción luminosa adicional que experimenta la muestra en examen durante su lectura y que se debe al color propio de la orina y al que producen dichas sustancias interferentes. De esta forma la lectura de la muestra es aproximadamente proporcional a la concentración del compuesto coloreado que forma el urobilinógeno con el aldehído, con lo cual se obtiene un dato semicuantitativo.

Variación de la intensidad del color

Para observar la variación en función del tiempo del color desarrollado en la reacción, efectuamos varias lecturas sucesivas de cada orina tratada con los reactivos indicados, con intervalos de 5 minutos a partir del instante en que se realice la mezcla. Los resultados obtenidos se observan en el cuadro n° 26.

CUADRO N° 26

VARIACION DE LA INTENSIDAD DEL COLOR.

Muestra n°	Lectura en el colorímetro fotoeléctrico a los:				
	5 min.	10 min.	15 min.	20 min.	25 min.
	divisiones				
1	64.0	64.0	63.5	60.5	60.0
2	121.5	121.5	122.0	123.0	119.0
3	37.0	37.0	36.0	32.5	32.5
4	83.5	83.5	83.5	81.0	81.0

Resulta evidente que el color permanece estable dentro de los primeros 10 minutos, mientras que luego varía lentamente. Cuando se utilice el colorímetro fotoeléctrico, la lectura de la muestra se debe realizar inmediatamente después de centrar el aparato con el blanco correspondiente.

Comparación de las técnicas de S.S.W. y W.S.S.B.

Hemos analizado diversas muestras de orina efectuando dos determinaciones por cada muestra, una por la técnica de Schwartz, Sborov y Watson (S.S.W.) y la segunda por la técnica de Watson, Schwartz, Sborov y Bertie (W.S.S.B.). Las muestras empleadas eran orinas emitidas de 14 a 16 horas. En el cuadro n° 27 se comparan los resultados obtenidos.

CUADRO N° 27

COMPARACION DE LAS TECNICAS DE S.S.W. Y DE W.S.S.B.

Muestra n°	S.S.W.	W.S.S.B.
	Urobilinógeno	
	mg. / 100 ml.	U.T. / 100 ml
1	0.8	1.6
2	4.3	9.8

3	14.7	27.0
4	0.9	1.8
5	1.1	2.8
6	0.7	1.6
7	8.9	23.0
8	15.0	31.8
9	0.6	1.2
10	0.9	2.0

Se observa que los resultados obtenidos con la técnica de W.S.S.B. difieren de los valores reales obtenidos con la técnica de S.S.W., pero en general están proporcionados a la magnitud de estos últimos, lo que permite usar esta técnica para obtener un dato no cuantitativo pero sí proporcional al contenido de urobilinógeno.

Valores normales.

Para finalizar analizamos varias orinas de sujetos normales, las muestras eran orinas emitidas entre las 14 y 16 horas. Los resultados se observan en el cuadro n° 28.--

CUADRO N° 28

APLICACION DE LA TECNICA EN ORINAS NORMALES

Muestra	Urobilinógeno	Muestra	Urobilinógeno
n°	U.E. °/oo ml.	n°	U.E. °/oo ml.
1	9.6	16	8.2
2	4.2	17	6.6
3	3.8	18	4.4
4	7.6	19	4.8
5	4.0	20	3.6

6	2.2	21	4.2
7	8.0	22	10.5
8	6.8	23	8.0
9	6.6	24	7.4
10	7.2	25	8.2
11	8.0	26	6.8
12	2.8	27	10.5
13	4.5	28	4.7
14	7.3	29	6.9
15	2.9	30	6.8

Los autores de la técnica señalan que el valor de U.F. por cien ml. de orina en individuos normales es en general inferior a la unidad.

Nuestros resultados coinciden con ese valor, con la diferencia de que han sido referidos a mil ml. y no a cien ml., en mérito a que la primera forma de expresión es la más común en los laboratorios de análisis clínicos del país.

Sobre 30 muestras examinadas solo 2 poseen un valor ligeramente superior a 10.0 por lo cual creemos que pueden tomarse como valores normales los comprendidos entre 2.0 y 10.0 U.F. por mil ml. de orina.

Pequeñas diferencias no indican necesariamente un estado patológico, si el caso permanece dudoso se debe efectuar una nueva determinación por la técnica de Schwartz, Sborov y Watson.

BIBLIOGRAFIA

- (1) FERREN, A.J. Ueber ein neues Verfahren zur quantitativen Urobilinbestimmung in Harn und Stuhl, Deut. Arch. Klin. Med. 149, 72, (1925).
- (2) SCHLESINGER, W. Zur klinischen Nachweis des Urobilins, Deut. med. Wochschr. 29, 561, (1903), G.Z. 2, (1903).
- (3) MARTINI, A.D., CARDINI, C., VIALLONGA F. y BANFI, R. Biocquímica Analítica Quantitativa, edición, El Ateneo, (1947).
- (4) WITH, T.K. Biology of bile pigments, pág. 277. Ed. Arne Frost-Hansen, Copenhagen, (1954).
- (5) WITH, T.K. Biology of bile pigments, pág. 274, Ed. Arne Frost-Hansen, Copenhagen, (1954).
- (6) YERLICH, P. Ueber Dimethylamidobenzaldehydreaktion, Deut. med. Wochschr. 151, (1901).
- (7) SCHWARTZ, S., SRODOV, V., y WATSON, C.J. Studies of urobilinogen. IV. The quantitative determination of urobilinogen by means of the Evelyn photoelectric colorimeter, Am. J. Clin. Path. 14, 598-604. (1944).
- (8) ROYER, H. Le urobilins au estado normal y patológico, Tesis, Trabajo del Instituto de Fisiología de la Facultad de Ciencias Médicas, (1929).
Le urobilins au estado normal y patológico, 2a. edición, El Ateneo, (1943).
- (9) FARMACOPPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMERICA, U.S.P. XIV. pag. 695. Ed. Interamericana, (1950).
- (10) CHARLOT, G. Teoría y métodos nuevos de Química Analítica Cualitativa

- tiva, pág.262, 3a.edición, Ed.Aguilar, (1954).
- (11) CASTEL, H.R. y LOPEZ GARCIA, A. Estudio de una técnica para el dosage de la urobilina por fluorescencia utilizando el nefelómetro de Zeiss aplicado al fotómetro de Pulfrich, Anales del Institute de Investigaciones Físicas aplicadas a la patología humana, 17-36, (1940).
- (12) LEVINSON, S.A. y MAS FATE, R.P. Diagnósticos Clínicos de Laboratorio, pág.410-411, 4a.edición, Ed.El Ateneo.
- (13) WATSON G.J., SCHWARTZ, S., SBOROV, V. y BENTIE, I. Studies of urobilinogen. V. A simple method for the quantitative recording of the Ehrlich reaction as carried out with urine and feces, Am.J.Clin.Path. 14, 605-615, (1944).
- (14) WITH, T.K. Biology of bile pigments, pág.37-38, Ed.Arne Frost-Hansen, Copenhagen, (1954).
- (15) NAUMANN, H.N. Schlesinger's test for urobilin in the presence of Riboflavin and other fluorescent compounds, J.Lab.Clin.Med. 32, 1503-1507, (1947).
- (16) SCHUMM, O. Spektrochemische Analyse, Gustav Fischer, Jena, pág. 218-219, (1927).
- (17) DISCOMBE G, Fluoresceinuria, Lancet 1, 86, (1937).
- (18) FARMACOPOLA DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMERICA, U.S.P.XIV, pag.539 Ed.Interamericana, (1950).
- (19) WITH, T.K. Biology of bile pigments, pág. 15 Ed.Arne Frost-Hansen, Copenhagen, (1954).
- (20) MORERA, V. Tratado de Análisis Biológicas, Tome I, pag.194-197, 1a.edición, Ed.Mundi, (1958).
- (21) BAUMGARTEL, T. Klin.Wochschr. 26, 22-23, (1948). Citado por With.

CONCLUSIONES

- 1.- Se ha efectuado una revisión y comparación de los dos tipos de métodos más corrientemente empleados para la valoración de urobilinoideas en la orina: el de fluorescencia (con sales de cina) y el colorimétrico (con para-dimetilaminobenzaldehído).

Fluorescencia con sales de cina. (Reacción de Jaffé-Schlesinger).

Método de Elman y Mc Hester, modificado por Royer.

- 2.- Se comprobó que el empleo de comparadores fluorescimétricos e visión directa, utilizados en las determinaciones clínicas corrientes, da lugar a errores pronunciados. Se realizaron tres series de determinaciones en las cuales el error porcentual tiene un valor promedio de 15.8, 16.0 y 14.2 respectivamente.
 - 3.- Dado que el método, tal como se practica en las determinaciones clínicas corrientes, solo puede considerarse semicuantitativo, sugerimos expresar los resultados en Unidades Schlesinger (U.S.) y no en mg. por mil ml., en forma similar a la adoptada por Watson, Schwartz, Sborov y Bartie en su método semicuantitativo de valoración del urobilinógeno.
 - 4.- Mediante estimación de la intensidad de la fluorescencia, utilizando la técnica y el aparato de Royer, hemos determinado la urobilinuria en una serie de sujetos normales habiendo encontrado valores comprendidos entre 0.2 y 0.6 U.S. por mil ml. de orina en el 83.7% de los casos, entre 0.6 y 0.7 en el 3.6% de los casos y entre 0.7 y 0.8 en el 10.7% de los casos.
- #### Sustancias fluorescentes extrañas.
- 5.- Se comprobó la técnica de Naumann para investigar urobilina en

- 14.- Debido a su menor especificidad, el método de Watson, Schwartz, Sborov y Bertie da resultados más elevados que el de Schwartz, Sborov y Watson. Puede sin embargo usarse como método semicuantitativo para formarse una idea acerca de si el contenido de urobilinógeno es normal o está aumentado.
- 15.- Con la técnica nombrada en primer término, hemos obtenido en sujetos normales cifras comprendidas entre 2 y 10 Unidades Ehrlich (U.E.) por mil ml. de orina.
- 16.- Nuestro criterio personal sobre la aplicación de las técnicas que se han estudiado es el siguiente. Se comienza por efectuar una determinación según la técnica de Moyer ya que el proceso de valoración requiere menos tiempo, si el resultado indica una urobilinuria fisiológica se puede informar el valor obtenido según esta técnica pues el error es pequeño, pero si el resultado denota una urobilinuria patológica se debe efectuar una nueva valoración por la técnica de Schwartz, Sborov y Watson. En todos los casos en que se desea un resultado correcto también se ha de aplicar esta última técnica.-



_____°_____

