

15/B

TOMO XLV

1942

Núm. 1

Anales

DE LA

ASOCIACION DE QUIMICA Y
FARMACIA DEL URUGUAY

(REVISTA)



DIRECCION Y ADMINISTRACION
Avda. AGRACIADA 1464 (Piso 13)
MONTEVIDEO (Uruguay)

Sobre una técnica para la investigación y dosificación de la bilirrubina en la orina (1)

Por los Sres.

Dr. MIGUEL C. RUBINO y NICOLAS VOJEVODSKY

En las aplicaciones del Laboratorio a la clínica, tiene siempre interés, el disponer de métodos de análisis, seguros, sensibles y a la vez sencillos.

Hasta hace pocos años, sólo se disponía, para las investigaciones de la bilirrubina en la orina, de métodos muy poco sensibles, tales los de Gmelin y Grimbert. Posteriormente se introdujeron algunas modificaciones a esos métodos, tales que los de Rosenbach, Huppert, Huppert-Cole, Naumann, etc., con lo cual la investigación de la bilirrubina para la clínica hizo progresos apreciables.

Desde hace algunos años, nosotros venimos trabajando, en el Laboratorio Jenner, una técnica que consideramos muy sensible y sencilla y por lo tanto muy adecuada para los análisis clínicos habituales.

(1) El presente trabajo fué presentado a la Sociedad de Biología de Montevideo, en sesión del 17 de Noviembre de 1932, según acta respectiva. Pero no fué publicado; razón por la cual hemos hecho su presentación en las Sesiones de Química Rioplatenses (Mont. 1940), según lo advertimos al inscribirlo.

En el correr del presente mes, Diciembre de 1940, se recibe en Nº 2 Vol. 26 de Noviembre de 1940 del The Journal of Laboratory and Chemical Medicine que contiene un interesante trabajo de los señores William H. Goodson y Charles Sheard, de la Mayo Clinic-Rochester, relacionado con la investigación y dosificación de la bilirrubina en la orina fundado en el uso del Reactivo Diazo Ehrlich y el método "Photométrico".

En la bibliografía del mismo trabajo, se menciona otro de George Hunter (Canadá M. A. J. 23-823-1930), relacionado con el mismo tema.

Es la primera vez, que encontramos en la bibliografía datos relacionados con la aplicación del reactivo Diazo, para despistar y dosificar la bilirrubina en la orina.

Debemos agregar, por otra parte, que nuestra técnica difiere de la descrita en el mencionado trabajo, porque ella implica la separación previa de la bilirrubina al estado de bilirrubinato de bario, a fin de evitar la interferencia de otras reacciones por el mismo reactivo y el poder de detención de las sustancias de la orina, para la visibilidad de la Azorrubina. — En cambio los autores nombrados, parece obtienen análogo resultado por el agregado de una solución Tampón y de benzoato de cafeína.

Tomamos como base la Diazo-reacción de Enrich, utilizada para la dosificación de la bilirrubina en el suero sanguíneo, la que es capaz de denunciar fracciones de miligramos por 100 c.c. de suero.

Las dificultades que se presentaban para la aplicación del reactivo Diazo, eran varias: en primer lugar las orinas presentan la propiedad, en algunos estados patológicos, de reaccionar con el reactivo, independientemente, al parecer, de la presencia o ausencia de bilirrubina; en segundo lugar y esto es muy importante, hay numerosas orinas, que mismo agregándoles cantidades apreciables de bilirrubina, ya sea en forma de bilis, o de otra orina rica en bilirrubina, no reaccionan francamente con el Diazo, cuando este reactivo se agrega directamente.

Sin con una misma bilis, tomamos dos series de diluciones crecientes, una con solución fisiológica de Cloruro de sodio y otra con orina normal, agregando a todos los términos una misma cantidad de reactivo Diazo, observaremos, que en la serie con suero fisiológico la reacción es POSITIVA a diluciones mucho mayores que en la serie con orina; por ejemplo. En una experiencia con bilis B, la reacción en la serie con solución fisiológica era aún positiva en la dilución 1/160; en cambio en la serie con orina era ya NEGATIVA en la dilución 1/40.

Para obviar esos inconvenientes; es decir la posibilidad de sustancias reaccionantes independientemente de la bilirrubina y el poder de detención de la misma orina para la reacción, ensayamos el aislamiento previo de la bilirrubina por el Cloruro de bario, tal cual se hace en el Grunbert y otras técnicas. En el precipitado de bilirrubinato de bario así obtenido y lavado hicimos actuar el reactivo Diazo con excelente resultado.

Como el reactivo Diazo, da la reacción característica sólo con la bilirrubina, es decir no oxidada, es necesario hacerlo actuar en primer término sobre el precipitado de bario, agitando bien y esperando algunos instantes para que la reacción tenga lugar; sólo después se hará actuar el alcohol ácido para la liberación de la ya azorrubina.

Es interesante constatar que para la liberación de la azorrubina, o sea su pase a solución, es necesario la presencia de alcohol y que no es indiferente el ácido a emplear. Tratando el precipitado bórico, por alcohol clorhídrico en la misma concentración que para el Grunbert, sólo una parte de la azorrubina pasa en solución, quedando siempre en el fondo el precipitado bórico más o menos coloreado por la azorrubina. En cambio el uso del ácido sulfúrico en cierta concentración se muestra muy favorable, pasando la azorrubina totalmente en solución, dejando en el fondo del tubo el precipitado bórico completamente blanco. Probablemente esta acción favorable del ácido sulfúrico se debe a la insolubilización del bario al estado de sulfato.

TECNICA

Reactivos necesarios

1º Reactivo Diazo, de la siguiente fórmula:

SOLUCION A

| | |
|---------------------------------------|-----------|
| Acido sulfanílico | 1 gr. |
| Acido clorhídrico - D. 1,19 | 5 c. c. |
| Agua destilada hasta | 100 c. c. |

SOLUCION B

| | |
|--------------------------------|----------|
| Nitrito de sodio | 0 gr. 50 |
| Agua destilada hasta | 100 c.c. |

2º Solución de Cloruro de Bario al 5 %.

3º Solución de Acido Sulfúrico al 10 % (en peso).

PROCEDIMIENTO

10 c. c. son colocados en un tubo de centrifuga y se le agrega 5 c.c. de la solución de bario; se agita bien y se centrifuga. Se arroja el líquido sobrenadante y se agrega agua destilada, mezclando y agitando bien para incorporar el precipitado. Se vuelve a centrifugar se arroja el agua de lavado y sobre el sedimento se agrega **un** c.c. del reactivo Diazo recién preparado, obtenido mezclando **un** c.c. de solución A con una gota de solución B. Después de mezclar se agrega **un** c.c. de la solución de ácido sulfúrico, se vuelve a mezclar y se agrega un c.c. de alcohol, se agita y se deja sedimentar o se centrifuga.

En el caso de la presencia de bilirrubina, el líquido sobrenadante toma una coloración violeta característica, más o menos intensa. Si no hay bilirrubina el líquido es incoloro o amarillento.

Hemos ensayado esta técnica desde el año 1932 hasta la fecha y jamás hemos encontrado un resultado discordante con la clínica.