

Micro-extractor para a dosagem do cholesterol no sangue (*)

por

GILBERTO G. VILLELA

(Com 1 figura no texto).

As technicas para as dosagens do cholesterol no sangue baseiam-se tanto em processos gravimetricos (Windaus, Fex) como em processos colorimetricos (Grigaut, Antenrieth, Bloor, Myers, Leiboff).

Os processos colorimetricos quando empregados com as devidas precauções offerecem resultados perfeitamente comparaveis aos processos ponderaes (Nekludov e Chalatov, Mueller). Para os fins clinicos as dosagens colorimetricas satisfazem completamente, além de exigirem tempo relativamente menor e material pouco dispendioso.

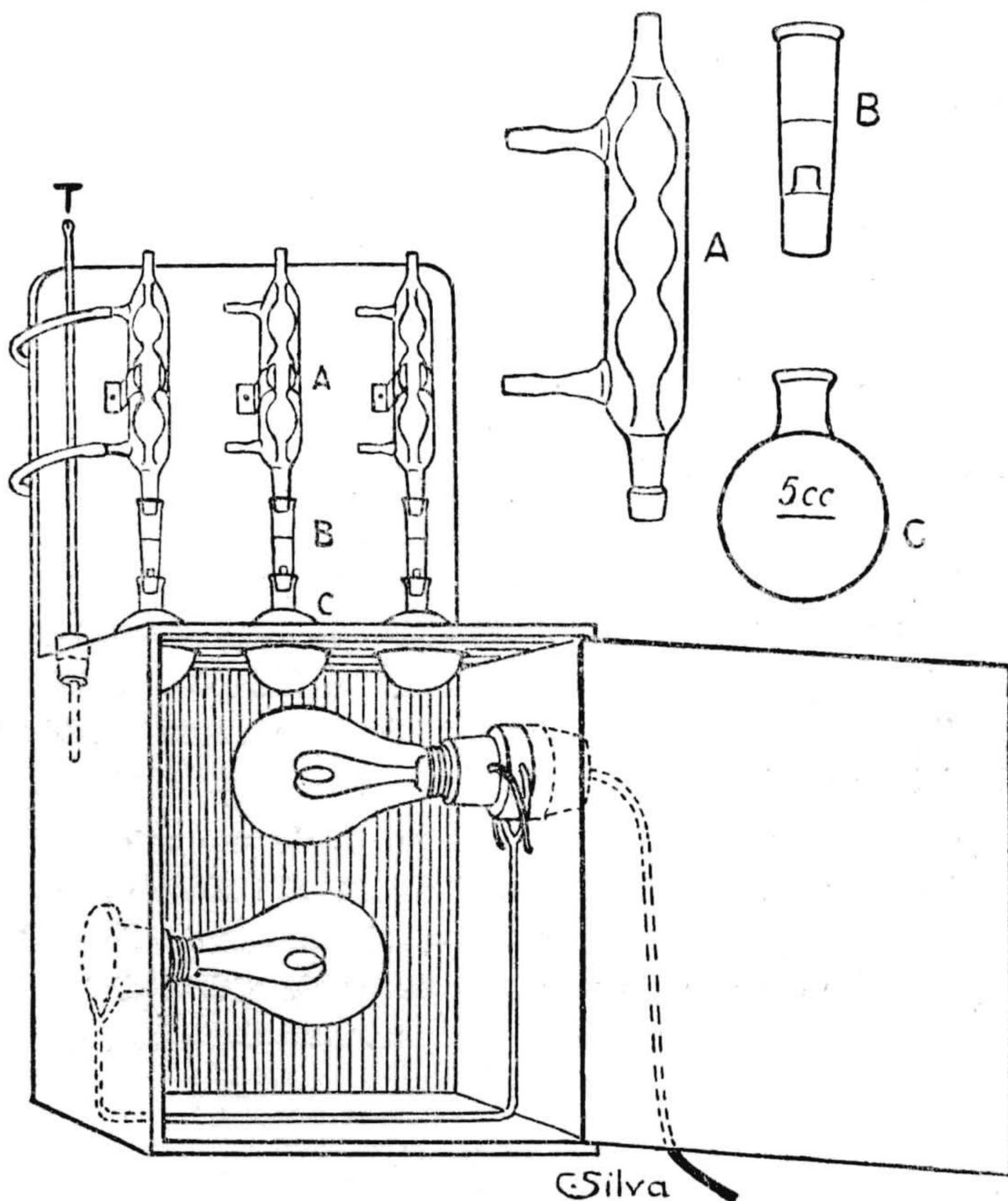
A coloração verde obtida pelo cholesterol em presença de anhydrido acetico e acido sulfurico (reacção de Liebermann-Burchard) tem sido utilizada na maioria dos processos colorimetricos actuaes. Entretanto, a coloração produzida nesta reacção não é estavel, transformando-se lentamente para o amarello, de modo que as comparações devem ser feitas logo após a formação da côr verde. Recentemente, Schube propoz a côr amarella final que se mostra estavel após 12 hs. a 20°C., como sendo mais vantajosa para a colorimetria. Todavia, o processo torna-se demorado não offerecendo vantagens desde que se utilize a côr verde sempre 15 minutos após a reacção. Na temperatura ambiente (25°C) a reacção não se processa uniforme de modo que torna-se necessario fazel-a sempre em temperatura baixa (5 a 10°C) conforme as verificações de Mirsky e Bruger. A luz directa tambem deve ser evitada bem como reactivos que não sejam anhydridos e vidraria humida.

Na presente nota propomos o emprego de um micro-extractor que offerece vantagens sobre os processos classicos não só sob o ponto de vista da rapidez na execução como tambem no da economia de material.

O aparelho é formado por tres peças de vidro, distinctas e esmeriladas nas junções: um balão C de capacidade de 8 c.c. em que se en-

(*) Recebido para publicação a 5 de Janeiro de 1933.

contra indicado por um traço o volume correspondente a 5 c.c. Este balão se articula á peça intermediaria B que é assoalhada por um disco perfurado onde se insere um pequeno tubo de 2 mm. E' nesta peça que se colloca o papel de filtro bem comprimido de modo a absorver todo o liquido (sangue total, plasma ou sôro) em que se deseja dosar o cholesterol. A terceira peça A consta de um pequeno refrigerante de bola. O aparelho repouza em uma caixa de madeira perfurada onde se adapta o balão. A caixa contem em seu interior duas lampadas de 25 velas cada uma. Em cima adapta-se um thermometro de 100°C. A temperatura atingida não ultrapassa 97°C. A extracção se faz uniforme sem que seja necessario ir até essa temperatura. O aquecimento por esse processo evita o emprego de placas electricas dispendiosas cujas perda de energia é grande. Ha ainda a vantagem de permittir collocar na mesma caixa 3 e mais extractores para varias determinações em serie usando a mesma fonte calorifica. A gravura abaixo demonstra com mais clareza os detalhes na armação e na disposição das peças.



O micro-extractor poudo ser construido graças á firma M. M. Gomes desta praça cuja proficiencia e habilidade muito contribuiu para a sua bôa execução. A ella os nossos agradecimentos.

A technica é simples e baseia-se na extracção pelo chloroformio onde se executa a reacção corada de Liebermann-Burchard.

O sangue é directamente absorvido por papel de filtro, sendo depois sêcco na estufa e no deseccador para então ser extrahido pelo chloroformio. A reacção se processa no proprio balão do extractor donde é transportado para o colorimetro afim de ser feita a leitura. O sangue pôde ser colhido por picada digital, sendo aspirado por micro-pipeta de 0.1 ou 0.2 cc. ou da veia quando se quer usar plasma ou sôro. Nos casos de hypercholesterolemia é preferivel usar 0.1 cc. O sangue é então lançado immediatamente, para evitar que se coagule, no tubo intermediario B, contendo já papel de filtro bem comprimido. Este tubo é levado á estufa á 37° ou 40° C. durante 20 minutos e dahi ao deseccador durante 1/2 hora ¹. Arma-se o aparelho, tendo-se já collocado no balão 5 cc. de chloroformio, procedendo-se á extracção que se inicia quando a temperatura attinge 87°C. O calor no interior do balão será sufficiente para que a fervura se mantenha regular, visto o ponto de ebulição do chloroformio ser de 61,2°C. O tempo de extracção deve ser de 45 minutos a 1 hora. Esfriado o balão, completa-se o volume de 5 c.c. com chloroformio que se aproveita lavando o tubo que contem o papel de filtro (tubo B). Addicionam-se então 2 c.c. de anhydrido acetico puro e 0.1 cc. de acido sulfurico concentrado puro. Leva-se o balão ao frio e ao abrigo da luz durante 15 minutos. Compara-se no colorimetro com a solução padrão de cholesterol tratado de maneira identica. Esta deverá conter 8 mgrs. em cada 100 cc. de chloroformio (equivalente a 0.4 mgr. para 5 cc.).

Como em nosso clima é difficil a conservação do titulo desta solução porque o chloroformio rapidamente se evapora, é aconselhavel fazer a solução primeiramente em alcool e evaporal-a para cada determinação em banho-maria dissolvendo-se o residuo a seguir em volume igual de chloroformio que servirá como solução padrão. Myers propoz o emprego de um padrão estavel de verde de naphtol a 5 mgrs. % que é perfeitamente comparavel á solução padrão de cholesterol a 0.4 mgr. por 5 cc. Nós usamos este padrão artificial sempre com bons resultados. Naturalmente se torna necessario controlal-o de tempos em tempos com a solução padrão de cholesterol.

¹ E' possivel quando se quer retirar o sangue fora do laboratorio, transportar somente o tubo intermediario B já contendo o papel de filtro, absorvendo ahi o sangue para posterior extracção no laboratorio.

O calculo é simples e obedece á seguinte formula (empregando-se 0.2 c.c.):

$$\frac{\text{Leitura do padrão} \times 0.0004 \times 500}{\text{Leitura da amostra}} = \text{mgrs. de cholesterol em 100 c.c. de sangue, plasma ou sôro.}$$

Na tabella abaixo seguem os dados comparativos realizados pela technica classica de Myers-Wardell e pela do micro-extractor. O erro é em torno de 15 %.

Numeros	Cholesterol em mgrs. para 100 cc.		Differenças
	Myers-Wardell	Micro-extractor	
I	266	285	+ 19
II	126	132	+ 6
III	168	151	- 17
IV	188	178	- 10
V	210	221	+ 11
VI	242	250	+ 8
VII	216	231	+ 15
VIII	118	112	- 6
IX	132	145	+ 13
X	178	160	- 18

BIBLIOGRAPHIA

- 1—MYERS e WARDELL — The colorimetric estimation of cholesterol in blood, with a note on the estimation of coprosterol in feces. Jour. of Biol. Chem., vol. 36, 1918, 147.
- 2—MIRSKY e BRUGER — A note on the Liebermann-Burchard color reaction for cholesterol. Jour. of Labor. and Clin. Med., vol. 18, 1132, p. 304.
- 3—SCHUBE — A method of measuring cholesterol. Journ. of Lab. and Cl. Med., vol. 18, 1932, p. 306.
- 4—MUELLER — A comparison of the results obtained by the colorimetric and gravimetric determinations of cholesterol. Jour. of Biol. Chem., vol. 25, 1916, p. 549.
- 5—NEKLUDOW e CHALATOW — Vergleichende Studien über die Verwertung der quantitativen cholesterinbestimmungsmethoden im Blutserum nach Gewichts und Kolorimetrieprinzip. Bioch. Zeit. vol. 208, 1929, p. 60.