

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**  
**FACULTAD DE QUIMICA**



---

**DETERMINACION DE ACIDOS GRASOS DEL  
LIQUIDO AMNIOTICO POR CROMATOGRAFIA  
DE GASES (MONTAJE DE TECNICA)**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A:**

**DANIEL ALONSO CORTES**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## CONTENIDO.

	pág.
1.0 INTRODUCCION _____	5
2.0 GENERALIDADES _____	7
2.1 Líquido amniótico. _____	7
2.2 Ácidos grasos. _____	13
2.3 Cromatografía de gases. _____	20
3.0 MATERIAL Y METODOS. _____	26
3.1 Muestra Biológica. _____	26
3.2 Equipo de laboratorio. _____	27
3.3 Instrumental. _____	27
3.4 Reactivos. _____	28
3.5 Preparación de estándares y soluciones. _____	29
3.6 Determinación de los ácidos grasos del líquido amniótico. _____	31
4.0 RESULTADOS. _____	40
4.1 Selección de condiciones de trabajo. _____	40
4.2 Tablas de reproductibilidad, sensibilidad, linealidad, (gráfica) y recuperación del aparato respecto al tamaño de la muestra. _____	43
4.3 Tablas de resultados de los líquidos analizados individualmente. _____	50

5.0	CONCLUSIONES.	pág. 54
6.0	RESUMEN.	56
7.0	BIBLIOGRAFIA.	59

## 1. INTRODUCCION

La determinación de la composición y concentración de los ácidos grasos de cadena larga existentes en el líquido amniótico (1,2,3), complementa las diversas técnicas de cuantificación de otras fracciones lípidas (4,5,6,7,8) utilizadas para evaluar la madurez pulmonar fetal cuando es necesario interrumpir embarazos en que no son óptimas las condiciones de salud para la madre y el producto (9,10,11,12).

En trabajos anteriores se ha demostrado la presencia de un material tensoactivo ó surfactante, en secreciones bronquiales de niños recién nacidos normales, y una disminución en cantidad y calidad de este material en las secreciones bronquiales de niños recién nacidos que presentaron el síndrome de insuficiencia respiratoria idiopática (SIRI) (13,14,15, 16).

La sustancia surfactante esta constituida principalmente por fosfolípidos, compuestos que poseen propiedades tensoactivas por sus características moleculares y presentan variaciones en su concentración y en el tipo de ácidos grasos esterificados en el grupo glicerido, durante el desarrollo de la gestación (17,18).

La extracción de los ácidos grasos del líquido amniótico y su determinación son representativos y confiables para la evaluación del estado de madurez pulmonar fetal, por el constante recambio que experimenta el líquido amniótico inútero. La técnica más adecuada para esta determinación es la cromatografía de gases (19,20,21,22).

El propósito de este trabajo es implementar una técnica más precisa para la determinación de la madurez pulmonar fetal, complementaria a las ya existentes en nuestro medio que tienen el problema de presentar un elevado número de falsas positivas y falsas negativas que hacen necesario el esclarecimiento de técnicas más sofisticadas como la cromatografía de gases para su adaptación al tipo de análisis y muestra con que determinamos dicha madurez (22,30).

## 2. GENERALIDADES

### 2.1 *Líquido Amniótico*

Constituye un lecho de descanso para el feto durante su desarrollo intrauterino, es además un excelente amortiguador de golpes y movimientos que pudieran dañar su cuerpo y durante el parto actúa como una cuña hidrostática entre el cuerpo fetal y las paredes vaginales (31). Antiguamente se pensaba que el líquido amniótico, debido a su aspecto estaba formado principalmente por orina fetal; posteriormente se desarrolló la idea de que el líquido se renovaba por deglución (32).

Mediante experimentos complejos se ha logrado saber que el líquido amniótico se encuentra en permanente intercambio



semana 12, hasta 1000 ml en la semana 38 del embarazo. La composición del líquido amniótico es de 98-99% de agua y de 1-2 % de material sólido inorgánico y orgánico. En el material sólido inorgánico se encuentran los electrolitos (Na, Cl, Mg, K, Ca, Zn, S, Mn, Sr, Cu, Fe) que muestran gran tendencia a pasar del líquido al feto y los gases  $O_2$  y  $CO_2$  que poseen una presión equivalente a la encontrada en tejidos superficiales del feto permite su libre paso de estos al amnios contribuyendo así en el equilibrio ácido - base.

Dentro del material orgánico se encuentra el ácido láctico que es excretado por el riñón fetal, este ácido reacciona con el  $NaHCO_3$  del medio interviniendo también en la regulación del pH se encuentra también glucosa, que pasa por el corioamnios y el cordón umbilical así como por vía renal fetal. Se han encontrado además, proteínas, aminoácidos, ácido úrico, urea, lípidos, carbohidratos, vitaminas, enzimas, bilirrubinas y hormonas, cada cual determina de diversas maneras y con enfoques diferentes en cuanto a los órganos en desarrollo pero todos buscando un punto de relación que proporcione mejores índices en la evaluación de la madurez fetal (33).

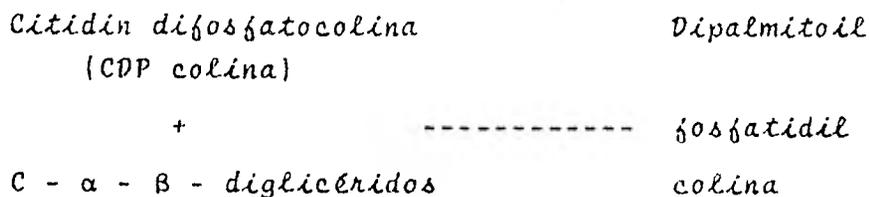
Durante los últimos años se ha incrementado la investiga---

ción hacia los parámetros que determinan la madurez pulmonar fetal con un gran porcentaje de certidumbre, estas investigaciones están enfocadas en gran parte hacia las fracciones lípidas existentes en el líquido amniótico como la fosfatidilcolina, la esfingomielina, la fosfatidiletanolamina, la fosfatidilserina, el fosfatidilinositol, el fosfatidilglicerol, ésteres de colesterol, triacilglicéridos y fracciones de éstas como los ácidos grasos (1-30).

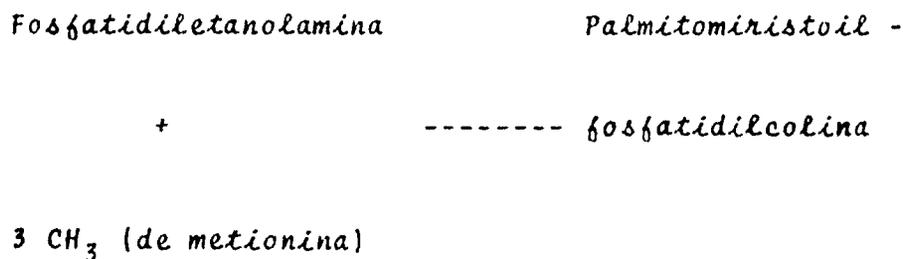
La fracción más estudiada es la fosfatidilcolina fracción lípida principal en un material surfactante aislado de secreciones bronquiales y presente también en líquido amniótico, la calidad y cantidad de éste material están estrechamente relacionados con la madurez bioquímica pulmonar del feto, puesto que es producido en los cuerpos laminares de los neumocitos tipo II, células que se incrementan previamente a la aparición del surfactante en el sistema respiratorio fetal (17,18,29) este surfactante tiene la propiedad de disminuir la tensión superficial en la interfase aire líquido que recubre la superficie de los alveolos y establece un equilibrio entre las fuerzas negativas (presión inserticial, presión hidrostática y presión coloidosmótica) que oprimen los alveolos y la fuerza interna, positiva, de estos (presión oncótica) si se conserva este equilibrio se-

r a más fácil la entrada de aire a los alveolos pulmonares.- Se sabe que estos fosfolípidos constituyen un 90% del material surfactante y son de origen fetal porque no pueden atravesar placenta, además se conoce que no toda la fosfatidilcolina es surfoactiva sino que existen fosfatidilcolinas de otras fuentes que difieren de la fosfatidilcolina surfactante en el tipo de ácidos grasos esterificados en su grupo glicérido, la fosfatidilcolina surfactante al término de la gestión es la dipalmitoil-fosfatidilcolina, es decir, los ácidos grasos esterificados son dos moléculas de ácido palmítico y en la fosfatidilcolina surfactante más abundante en edades tempranas del embarazo es la molécula de miristopalmitoil-fosfatidilcolina, los ácidos grasos esterificados en ésta molécula son el ácido mirístico y el ácido palmítico, las vías biosinteticas productoras de las fosfatidilcolinas surfactantes son de gran importancia en la calidad del material surfactante. La fosfatidilcolina se sintetiza por cinco rutas conocidas pero las más importantes al término del embarazo y en prematuros son las siguientes:

## I Sistema fosfocolintransferasa



## II Sistema metiltransferasa

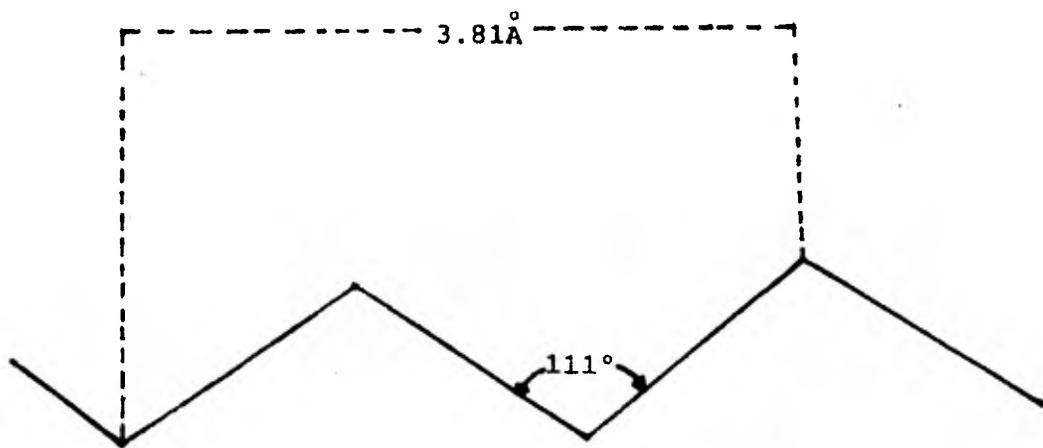
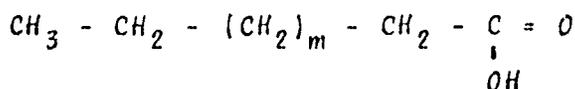


En la ruta I, la acilación del α - β - *diglicérido* es inespecífica por lo que los ácidos grasos de cadena larga introducidos en estas posiciones pueden ser de primordial importancia en la síntesis del surfactante pulmonar.

## 2.2 *Acidos Grasos*

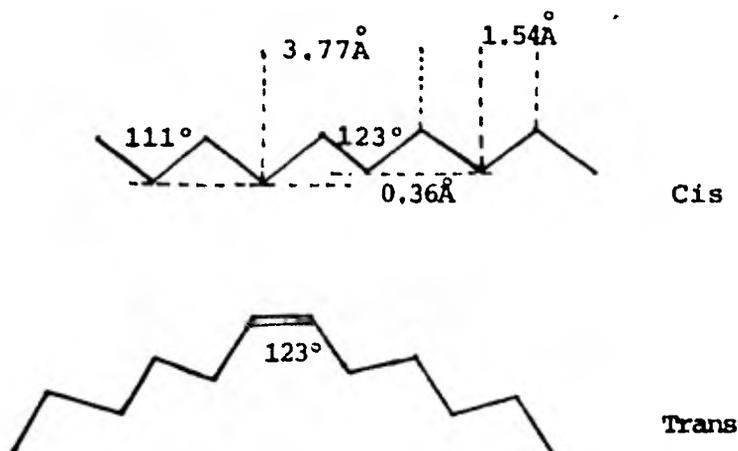
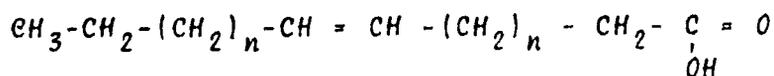
Los ácidos grasos son compuestos orgánicos formados por carbono, hidrógeno y oxígeno y constituyen una parte primor--- dial de la mayoría de los lípidos que junto con los carbohi dratos y proteínas forman parte de la alimentación esencial humana, cumplen además importantes funciones bioquímicas co mo la de material de reserva de gran contenido energético y forman parte en la estructura de las membranas celulares. Se encuentran formando parte de los lípidos en forma satura da, mono y poliinsaturada, razón por la cual, al extraerse los lípidos de los tejidos y líquidos corporales se hará ba jo una atmósfera inerte y a bajas temperaturas para impedir oxidaciones, los ácidos grasos se encuentran libres y como ésteres y en complejos moleculares proteínicos en forma lá- bil. Algunos de los lípidos de los que pueden obtenerse ácidos grasos por hidrólisis son los siguientes: grasas, ceras, fosfolípidos, derivados de glicerofosfátidos, deriva dos de fosfato de esfingosina y de los lípidos no fosforila dos como los cerebrósidos, glucolípidos, sulfolípidos, gan gliósidos, proteolípidos y esteroides. Los ácidos pueden ser de las formas siguientes saturados, de fórmula general  $C_n H_{2n} O_2$  y se presentan en dos series; cadenas de número impar y de número par de átomos de carbono, ocurriendo con

mayor frecuencia en la naturaleza los ácidos grasos de cadena de número par de átomos de carbono. Estos ácidos grasos saturados presentan numerosas conformaciones por la gran libertad de rotación que poseen por su tipo de enlaces (figura).



Se presentan además ácidos grasos de cadena ramificada en las ceras y también ácidos grasos con grupos hidroxilo y ceto de gran importancia bioquímica. Los ácidos grasos insaturados, se caracterizan por presentar dobles ligaduras y por cada una de estas disminuye su fórmula general en dos

átomos de hidrógeno, pueden ser monoénicos, dienoicos, tri-  
enoicos y poliénoicos. Se citan en la literatura algunos  
ácidos representantes de los ácidos acilénicos (triple li-  
gadura) pero son menos comunes. Presentan isomería geométri-  
ca ( cis y trans ) y de posición, están más limitados en su  
movimiento por la rigidez de los dobles enlaces (figura).



Tanto los ácidos grasos saturados como los insaturados se pre-  
sentan en el modelo de menor energía, por las diversas formas  
isoméricas y la orientación de sus grupos se presume la im-  
portancia que tienen en la estructura de las membranas

celulares.

Propiedades físicas.

Punto de fusión. Los ácidos grasos con número par de átomos de carbono tienen una línea de puntos de fusión diferente a la de los ácidos grasos de número impar. Los dobles enlaces bajan el punto de fusión y las formas cis tienen un punto de fusión más bajo que las formas trans.

Los ácidos grasos pueden presentar dos o más formas cristalinas según la temperatura y el disolvente empleado para su cristalización.

La solubilidad de los ácidos grasos disminuye al aumentar la longitud de la cadena pero aumenta con la temperatura. Son solubles en diversos disolventes orgánicos, esta solubilidad es de importancia en los métodos de aislamiento y purificación.

Los puntos de ebullición crecen conforme aumenta la cadena y los ésteres metílicos son más estables y tienen un punto de ebullición aproximadamente 30°C más bajo que el ácido graso respectivo.

Propiedades químicas.

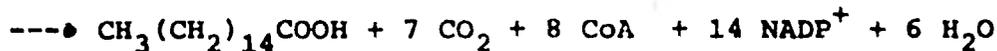
Los ácidos grasos pueden presentar reacciones de esterificación, halogenación, hidrogenación u oxidación. Pueden formar sales con metales y especialmente con los alcalinos  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  que son solubles en agua y actúan como agentes emulsionantes y limpiadores, estas sustancias se conocen como jabo

nes que poseen propiedades surfactantes y forman micelas en el agua que se estabilizan por fuerzas hidrofóbicas, esta acción guarda relación con la presencia de grupos hidrosolubles y liposolubles en una misma molécula. El ácido palmítico y el ácido esteárico por sí solos tienen propiedades surfactantes por la capacidad que tienen de formar monocapas moleculares sobre las superficies donde se encuentran.

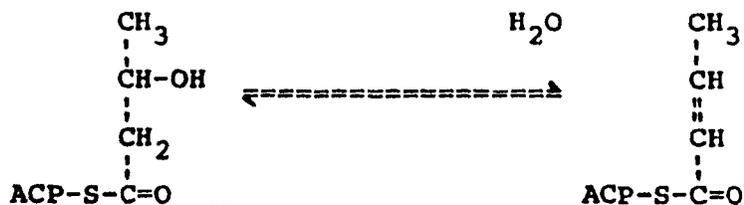
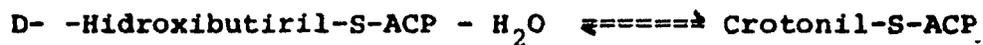
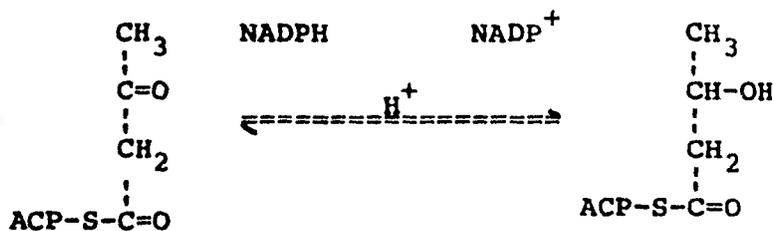
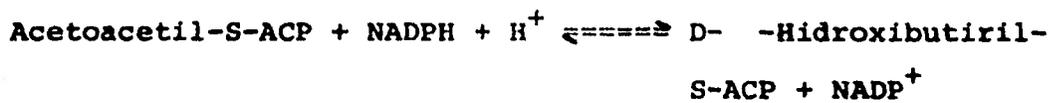
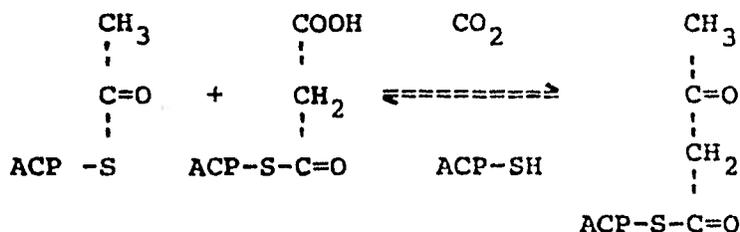
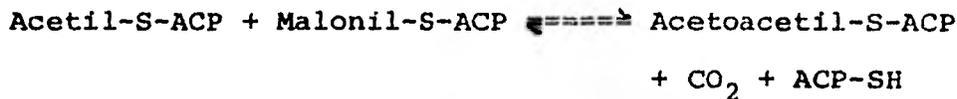
#### Biosíntesis.

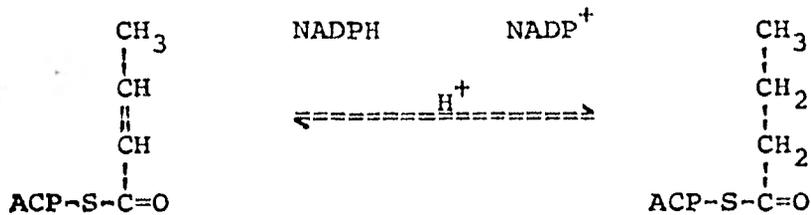
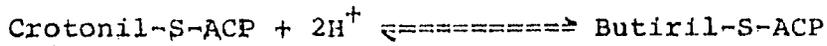
La ruta de biosíntesis de ácidos grasos en los tejidos es la siguiente :

#### Reacción global .



La biosíntesis por etapas es :





Estas mismas reacciones se efectúan cada vez que la molécula de ácido graso se elonga en dos átomos carbono cambiando las enzimas utilizadas en cada etapa, según los precursores y antecesores.

### 2.3 Cromatografía de gases.

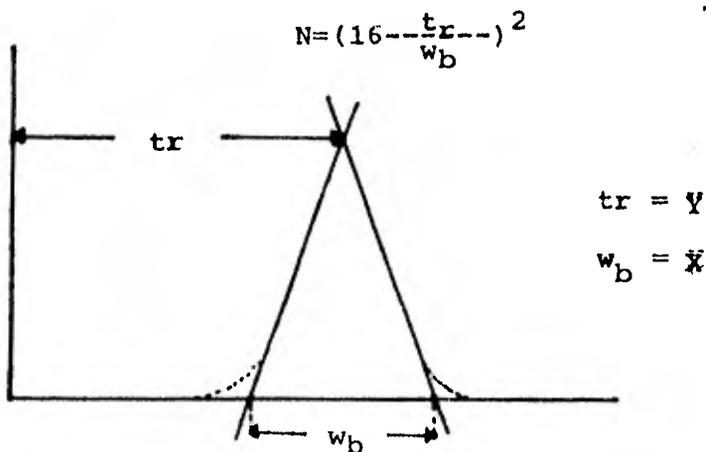
Para la separación y análisis de sustancias de características peculiares es necesario el empleo de métodos versátiles, confiables y rápidos. Los métodos cromatográficos cumplen con estos requisitos.

La palabra cromatografía proviene de los vocablos "kromathos = color y graphos = escritura" dados por Tswett, bioquímico ruso el cual efectuó en 1906 las primeras separaciones cromatográficas a partir de un extracto de pigmentos coloreados eluido dentro de una columna empacada con pequeñas partículas porosas. El resultado obtenido fue una serie de bandas coloreadas correspondientes a los diferentes constituyentes del extracto. Aunque el término continúa empleándose no es precisamente por el color que se logra la identificación de las sustancias, sino por las interacciones que se efectúan entre las moléculas a separar y los materiales de soporte o elución empleados en las diferentes modalidades de cromatografía existentes.

De todos los métodos cromatográficos, la cromatografía de gases es el más adecuado para la separación de ácidos grasos ya que estos presentan propiedades fisicoquímicas muy similares entre sí (ej.; la presencia de una doble ligadura) lo que hace muy difícil la separación. En este tipo de

cromatografía tenemos dos modalidades; sistema gas-sólido y sistema gas-líquido, en ambos, la separación se efectúa haciendo pasar la muestra en fase de vapor dentro de una columna finamente empacada con pequeñas partículas porosas de gran superficie de contacto. En el sistema gas-sólido se efectúa el fenómeno de adsorción entre las moléculas a separar y las partículas del empaque y en el sistema gas-líquido se presenta el fenómeno de partición. En este último, las partículas del soporte se encuentran recubiertas por una delgada película de líquido de punto de ebullición elevado, estableciéndose un coeficiente de reparto de las moléculas a separar disueltas en la capa líquida y en la fase gaseosa, éste coeficiente de reparto es característico para cada sustancia cuando se mantienen fijas las condiciones de trabajo. En nuestro sistema gas-líquido se presentan un determinado número de variables que para ser analizadas se considerará que la columna donde se lleva a cabo la separación real se comporta como una columna hipotética consistente de una serie de unidades distintas ("Platos") unidas entre sí, de modo que la adición rápida de una cantidad de gas portador al primer plato, origina que se forme una fase compacta de gas que se transfiere instantáneamente al siguiente plato. El tiempo durante el cual los compuestos permanecen en cada plato son tan cortos que no

debe haber ninguna mezcla por difusión de los contenidos de los platos adyacentes. En estas condiciones, al poner una muestra problema al primer plato, el gas portador circulante eluirá el problema hacia el final de la columna hasta que éste surja del último plato. Sin embargo, durante la elución se extenderá una banda de vapor entre plato y plato, produciendo ensanchamiento del compuesto separado a su paso por la columna de manera simétrica y por lo tanto su perfil de concentración tendrá la forma de una curva gaussiana. La amplitud de este ensanchamiento depende del número de platos presentes en la columna. El número de platos ( $N$ ) se obtiene trazando dos tangentes sobre la curva (figura 1). En donde "Y" es la longitud de la línea base cortada por las dos tangentes y "X" es la distancia del punto de inyección a la cima de la curva. El número de platos teórico se calcula mediante la expresión:



Ahora bien, el mejor índice para valorar la eficiencia de la columna en determinadas condiciones es la altura equivalente a un plato teórico (AEPT), el cual se define como la longitud de la columna necesaria para lograr el equilibrio entre la fase gaseosa en movimiento y la fase líquida estacionaria. Este parámetro se obtiene en la práctica dividiendo la longitud de la columna entre el número de platos teórico. Este índice se obtiene con la fórmula:

$$AEPT = \frac{L}{N}$$

En donde:

AEPT = altura equivalente a un plato teórico.

L = longitud de la columna cromatográfica.

N = número de platos.

La ecuación desarrollada de Van Deemter nos permite realizar un estudio más completo sobre la eficiencia de la columna:

$$AEPT = 2 \lambda dp + \frac{2 \gamma D_{gas}}{\bar{u}} + \frac{K' df^2}{u^2 (1+K')^2 D_{liq.}}$$

En donde:

AEPT = altura equivalente a un plato teórico.

$\lambda$  = variación del empaque.

$d_p$  = diámetro de partícula del soporte sólido.

$\gamma$  = factor de corrección para las desviaciones del gas por los canales de la columna.

$D_{\text{gas}}$  = difusión del soluto en la fase gaseosa.

$K'$  = coeficiente de distribución.

$df$  = grosor real de la fase líquida que cubre las partículas del soporte.

$D_{\text{liq}}$  = difusión del soluto en la fase líquida.

$\bar{u}$  = velocidad lineal promedio del gas.

Simplificando esta fórmula tenemos la ecuación original de Van Deemter:

$$\text{AEPT} = A + \frac{B}{\bar{u}} + C\bar{u}$$

En donde:

$A$  = ensanchamiento de los gases o difusión parásita.

$B$  = difusión molecular.

$C$  = resistencia a la transferencia de masa.

$\bar{u}$  = velocidad lineal promedio del gas.

Al graficar los valores de AEPT contra  $\bar{u}$  obtenemos una hipérbola (figura 2), la cual nos sirve para localizar el valor mínimo de AEPT correspondiente al flujo óptimo al cual una columna opera con la mayor eficiencia.

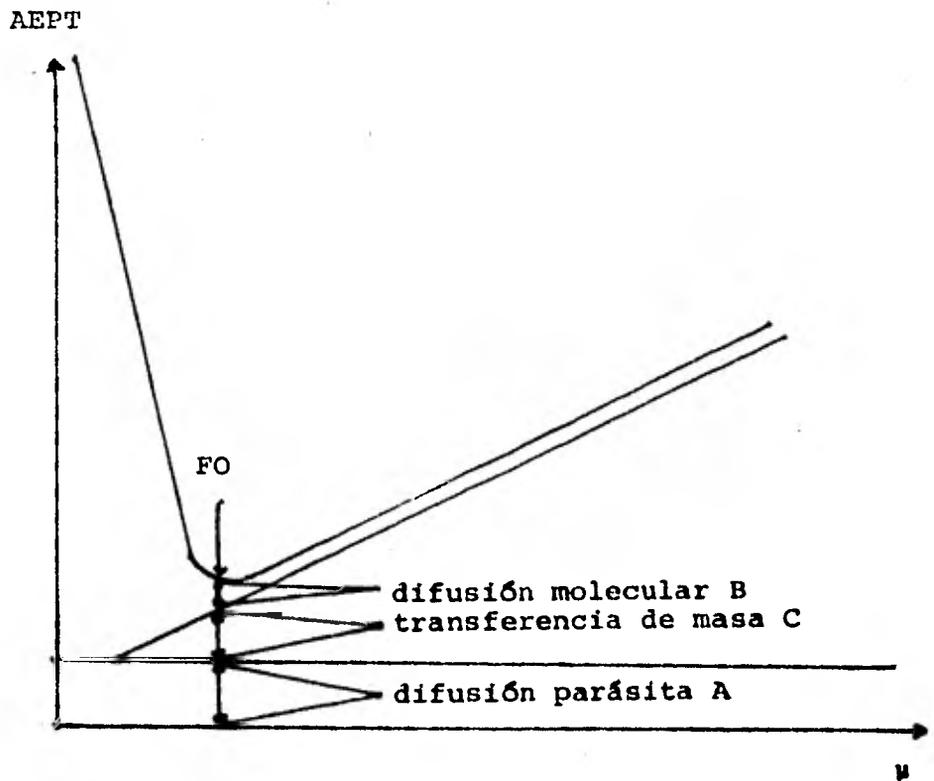


figura 2

### 3. MATERIAL Y METODOS.

#### 3.1 *Muestra biológica.*

Líquido amniótico perteneciente a pacientes normales a pacientes normales y algunas con patología asociada cuyas edades fluctuaron de 17 a 38 años y con embarazos de 28 a 43 semanas, obtenido mediante amniocentesis abdominal y vaginal, libre de sangre y meconio. El lugar de punción se localizó por ultraecsonografía con el fin de obtener la muestra con el menor riesgo posible de daño al feto.

Las muestras se distribuyeron en dos partes;

a) noventa de los líquidos amnióticos se reunieron en una mezcla homogénea para realizar la estandarización de la técnica, b) se colectaron 45 líquidos amnióticos correspondientes a 42 pacientes los cuales se analizaron individualmente con el fin de observar en la población local la utilidad de la prueba.

### 3.2 *Equipo de laboratorio.*

Tubos de centrifuga redondos de 50 ml con tapón esmerilado.

Probetas de 50 y 100 ml.

Pipetas serológicas de 5, 10 y 25 ml.

Termometro de  $-10^{\circ}\text{C}$  hasta  $200^{\circ}\text{C}$ .

Embudos de separación de 125 y 250 ml.

Tubos de centrifuga cónicos de 50 ml.

Matraces aforados de 50 ml.

Tubos de centrifuga de 15 ml con tapón esmerilado.

Jeringa Hamilton de 10 microlitros.

Pipetas aforadas de 25 microlitros.

Hielera.

### 3.3 *Instrumental.*

Baño maría, marca Blue M, modelo equipado con agitación graduada, automática.

Reloj de 60 minutos con alarma. General Electric.

Parrilla eléctrica, W.H.Curtin.

Centrifuga refrigerada de  $-10^{\circ}\text{C}$  a  $+25^{\circ}\text{C}$ .

Gradilla metálica con inclinación ajustable.

Cromatógrafo de gases Hewlett Packard, modelo No. 7620A, equipado con columnas de acero inoxidable rellenas de Chromo-sorb W recubierto de Succinato de Polietilén-glicol al 15%,

de 80 - 100 mallas, detector de ionización de flama e integrador Hewlett Packard modelo 3380A.

### 3.4. Reactivos.

Hidroxido de potasio.

Metanol.

Cloroformo.

Heptano.

Pentano.

Trifluoruro de boro al 14% en metanol.

Aire comprimido limpio y seco.

Nitrógeno.

Gas Helio.

Agua bidestilada.

Ester metílico del ácido caprónico.

"	"	"	"	heptanoico.
"	"	"	"	caprílico.
"	"	"	"	nonanoico.
"	"	"	"	caprílico.
"	"	"	"	undecanoico.
"	"	"	"	láurico.
"	"	"	"	tridecanoico.
"	"	"	"	mirístico.

Ester metílico del ácido miristoléico.

"	"	"	"	pentadecanoico.
"	"	"	"	palmitico.
"	"	"	"	palmitoléico.
"	"	"	"	esteárico.
"	"	"	"	oléico.
"	"	"	"	linoléico.
"	"	"	"	linoléico.
"	"	"	"	nonadecanoico.
"	"	"	"	araquídico.
"	"	"	"	araquidónico.
"	"	"	"	behénico.

### 3.5. Preparación de estándares y soluciones.

#### Estandares.

En un matraz aforado de 5 ml colocar 25 microlitros de cada uno de los ésteres metílicos de ácido graso en estado líquido, de concentración de 1 g/ml , y 25 miligramos de cada uno de los ésteres metílicos en estado sólido, después aforar cuidadosamente con pentano frío, todo el proceso se realiza a bajas temperaturas.

Solución de KOH al 15 %.

En un matraz aforado de 1000 ml colocar 150 gr de hidróxido de potasio, disolver agitando levemente, aforar con metanol y filtrar en fibra de vidrio seca, previamente lavada con cloroformo.

Mezcla de extracción.

Esta se prepara poco antes de utilizarse. Está constituida por 56 ml de cloroformo 42 ml de heptano y 2 ml de metanol para cada parte alícuota de 10 ml de líquido amniótico.

3.6. *Determinación de los ácidos grasos del líquido amniótico.*

En la determinación de los ácidos grasos del líquido amniótico son esenciales la extracción y la cuantificación individual de los ácidos grasos mediante la cromatografía de gases.

3.6.1. La extracción de los ácidos grasos del líquido amniótico consta de cinco pasos fundamentales:

Hidrólisis.

Extracción.

Concentración.

Metilación.

Recuperación de los ácidos grasos de cadena larga como metil ésteres.

3.6.1.1. En la hidrólisis se efectúa el rompimiento de los lípidos en sus fracciones con objeto de liberar los ácidos grasos, se realiza en condiciones básicas para evitar la hidrólisis de ceras y carotenos puesto que sus ácidos grasos son insaponificables. El metanol actúa como agente desnaturalizante de proteínas al disminuir el punto isoeléctrico de la fase acuosa además disuelve diversas fracciones orgánicas productos de la hidrólisis.

3.6.1.2. La extracción se basa principalmente en las diferentes solubilidades de las sustancias, por regla general un disolvente efectúa mejor sus propiedades cuando se aplica por separado que si se emplea en una mezcla pero cuando es necesario más de un disolvente, por cuestiones prácticas conviene el empleo de estos en mezcla si además se pueden combinar sus cualidades apropiadamente. La mezcla de extracción utilizada esta constituida por cloroformo, heptano y metanol en la proporción 56:42:2 respectivamente, su función en la mezcla es: el cloroformo actúa como el principal agente de extracción de los ácidos grasos por su selectividad mayor sobre otras sustancias orgánicas; el heptano compite con el cloroformo en la solubilización de otras fracciones orgánicas como los carbohidratos pero es más selectivo de estos y efectúa una acción purificante de la fase clorofórmica, además la estructura de sus moléculas ayuda en la estabilización de las cadenas de los ácidos grasos y con el metanol solubilizan una porción de los ácidos grasos de cadena corta.

3.6.1.3. En el paso de concentrar el extracto es importante observar las debidas precauciones en la temperatura y atmosfera de trabajo para evitar oxidaciones y descomposiciones de los ácidos grasos.

3.6.1.4. En la metilación se emplea el trifluoruro de boro como catalizador y se aplica temperatura elevada por poco tiempo por lo inestable de los ácidos grasos y para evitar transformaciones. El pentano se emplea como disolvente de traslado por ser más específico para los ácidos grasos.

3.6.1.5. En el paso de recuperación de los ácidos grasos de cadena larga se emplea pentano por ser un disolvente de gran volatilidad y solubiliza fácilmente los ésteres metílicos de los ácidos grasos y elimina las impurezas acuosas por ser prácticamente inmiscibles, el agua solubiliza los ácidos grasos de cadena corta obteniéndose un extracto puro de ésteres metílicos de ácidos grasos, la gran volatilidad del pentano permite reducir el volumen de análisis con poca temperatura sin riesgos de descomposición de los ésteres metílicos de los ácidos grasos.

3.6.2. La cuantificación individual de los ácidos grasos mediante la cromatografía de gases esta sujeta a los parámetros y propiedades fisicoquímicas que intervienen durante el proceso, la selección adecuada del sistema cromatográfico proporcionará a la vez que análisis rápidos, confiables por su reproductibilidad y exactitud basadas en los tiempos de retención, unicos para cada compuesto bajo condiciones

establecidas. Para la selección del sistema cromatográfico se han de tomar en cuenta las características físicas y químicas de las moléculas a analizar, para evitar pérdidas por difusión o destrucción de las muestras, esto está muy ligado a la recuperación en la que además intervine un factor extra, el humano; la técnica de inyección o introducción de la muestra en el sistema puesto que el volumen de muestra tan pequeño (microlitros) puede introducir grandes variaciones en los resultados, a nivel clínico no es práctico el empleo de inyectores automáticos por requerirse un volumen de muestra mayor. El gas de arrastre o portador se selecciona tomando en cuenta también las propiedades físicas y químicas de los compuestos, sin embargo se prefiere emplear gases inertes como el nitrógeno que además es barato o bien se emplean gases nobles como el helio que si bien garantiza una elución de la muestra sin interferencias es bastante caro y limita su empleo a la investigación. La selección de la columna es lo más importante en las consideraciones previas al montaje de alguna determinación por cromatografía de gases puesto que es el corazón del cromatógrafo, donde se efectúa la separación de los compuestos de una mezcla o bien la identificación de las sustancias problema, en esta selección influye el adecuado manejo de los numerosos

factores que interactúan a lo largo de la columna. El detector es de vital importancia y ha de tomarse en cuenta además de las características de las sustancias el tipo de análisis que se quiera realizar, en nuestro caso se empleó el detector de ionización de flama, detector universal de gran sensibilidad que nos permitió efectuar tanto análisis cualitativo como cuantitativo, este último realizado con la ayuda de un integrador automático computarizado empleando el método del estandar interno.

## PROCEDIMIENTO.

## 3.6.1.1. Hidrólisis.

3.6.1.1.1. En un tubo de centrifuga de tapón esmerilado colocar 10 ml de líquido amniótico libre de meconio y sangre.

3.6.1.1.2. Agregar 17.5 ml de hidróxido de potasio al 15% en metanol.

3.6.1.1.3. Colocar en baño maría a 65°- 70°C durante 30 minutos.

3.6.1.1.4. Dejar enfriar a temperatura ambiente.

## 3.6.1.2. Extracción.

3.6.1.2.1. En un embudo de separación de 250 ml colocar la mezcla anterior y agregar 100 ml de la mezcla de extracción y agitar energicamente durante un minuto cada 10 minutos un mínimo de 6 veces.

3.6.1.2.2. Dejar reposar.

3.6.1.2.3. Separar la fase clorofórmica en tubos de centrifuga de 50 ml.

3.6.1.2.4. Centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos a una temperatura de 5°C, si no se observa doble capa se procede a concentrar.

3.6.1.3. Concentración.

3.6.1.3.1. En tubos cónicos de 50 ml colocar la fase clorofórmica y evaporar a sequedad bajo corriente de nitrógeno, a una temperatura de 50°-70°C en baño maría.

3.6.1.4. Metilación.

3.6.1.4.1. Con un volumen de 2-3 ml de pentano frío recuperar el concentrado y pasarlo a un matraz aforado de 50 ml.

3.6.1.4.2. Agregar 5 ml de trifluoruro de boro al 14% en metanol.

3.6.1.4.3. Colocar el matraz en baño maría en ebullición durante 2 minutos.

3.6.1.4.4. Enfriar a temperatura ambiente.

3.6.1.4.4. Recuperación.

3.6.1.5.1. Pasar la mezcla a un embudo de separación de 125 ml y agregar 10 ml de pentano frío.

3.6.1.5.2. Agitar energicamente durante un minuto.

3.6.1.5.3. Agregar 5 ml de agua destilada.

3.6.1.5.4. Agitar suavemente y dejar reposar.

3.6.1.5.5. Pasar la capa pentanoica a un tubo de centrifuga cónico, graduado, de 15 ml.

3.6.1.5.6, Evaporar a sequedad bajo corriente de nitrógeno y a una temperatura de 40°-45°C. Mantener el extracto en hielo o congelación hasta su de terminación cromatográfica.

3.6.2. Cuantificación cromatográfica de los metil ésteres de ácidos grasos.

3.6.2.1. Tomar el concentrado final del paso anterior y agregar 500  $\mu$ gr del éster metílico del ácido no nadecanoico (19:0) que se emplea como sustancia de referencia para la cuantificación.

3.6.2.2. Agregar 0.1 ml de pentano frío.

3.6.2.3. Con una jeringa Hamilton de 10  $\mu$ l, tomar un micro litro de la resuspensión anterior e inyectarlo en el cromatógrafo de gases.

3.6.2.4. La identificación se realiza sobre el cromatograma obtenido en el integrador, previamente programado a las condiciones de trabajo.

3.6.2.5. La cuantificación también se realiza con ayuda del integrador programado al método del estándar interno. El cálculo de las cantidades de cada uno de los ácidos grasos se realiza con la fórmula:

$$Y = \frac{(\text{respuesta de } Y) (\text{Area de } Y) (\text{cant. de } St)}{(\text{respuesta del } St) (\text{Area del } St)}$$

en donde

Y = cantidad desconocida del ácido graso y

St = Estándar conocido en cant. por area, etc.

#### 4. RESULTADOS.

##### 4.1 Selección de condiciones de trabajo.

En primer lugar se estableció el orden de salida de los esteres metflicos de ácidos grasos tomando en cuenta sus pesos moleculares y su grado de insaturación. Para establecer este orden de salida se efectuó la inyección de cada ester metflico de ácido graso por separado y en mezcla, isotéricamente y con programación de temperatura.

Pico No.	E.M.A.
1	Caproico
2	Heptanoico
3	Caprílico
4	Nonanoico
5	Caprico
6	Undecanoico

7	Laúrico
8	Tridecanoico
9	Mirístico
10	Miristoleico
11	Pentadecanoico
12	Palmitico
13	Palmitoleico
14	Estearico
15	Oleico
16	Nonadecanoico
17	Linoleico
18	Araquídico
19	Linoleico
20	Behénico
21	Araquidónico

Con este orden de salida se procedió a fijar las condiciones de trabajo. Con este perfil se seleccionó el estándar interno tomando en cuenta su posición en el cromatograma y su ocurrencia en la muestra a analizar. La selección del tipo de columnas, tipo de disolventes, temperaturas apropiadas se efectuó tomando en cuenta las características de los compuestos a determinar.

Las condiciones experimentales elegidas fueron:

Cromatógrafo de gases Hewlett Packard, modelo No. 7620A

Gas portador: Helio.

Flujo del gas portador. Columna A = 40.5 ml/min.

Columna B = 42 ml/min.

Temperatura del inyector: 190°C.

Columnas A y B : 3 mts X 1/8 " de diámetro.

Soporte: Succinato de dietilen-glicol al  
15% sobre chromosorb W 80/100  
mallas.

Temperatura de la columna: Temperatura programada

$T_i = 150^{\circ}\text{C}$  ;  $T_f = 210^{\circ}\text{C}$

Velocidad de programación: 4°C/min.

Detector: Detector de ionización de flama.

Temperatura del detector: 250°C.

Sensibilidad del detector: 0.03 mv.

Volumen de inyección: un microlitro.

Registrador e Integrador Hewlett Pckard mod. 3380A.

Velocidad de registro: 0.5 cm/min.

4.2 *Tablas de reproductibilidad, sensibilidad, linealidad (gráfica) y recuperación del aparato respecto al tamaño de la muestra.*

**Los resultados obtenidos fueron:**

Reproductibilidad de los tiempos de retención de los esteroides metílicos de ácidos grasos. \*

Esteres metílicos de ácidos grasos		$\bar{X}$ (min)	S ( $\pm$ )	C.V.
Caproico	*'6:0	1.47	0.03	2.04
Heptanoico	7:0	1.82	0.03	1.65
Caprílico	8:0	2.34	0.04	1.70
Nonanoico	9:0	3.07	0.06	1.95
Cáprico	10:0	4.11	0.08	1.94
Undecanoico	11:0	5.49	0.09	1.64
Laurico	12:0	6.82	0.09	1.30
Tridecanoico	13:0	8.47	0.08	0.95
Mirístico	14:0	10.56	0.09	0.85
Miristoleico	14:1	12.15	0.09	0.74
Pentadecanoico	15:0	12.72	0.10	0.78
Palmitico	16:0	15.47	0.15	0.97
Palmitoleico	16:1	17.56	0.20	1.14
Estearico	18:0	23.71	0.34	1.43
Oleico	18:1	26.72	0.40	1.50
Linoleico	18:2	32.50	0.54	1.66
Linolénico	18:3	41.75	0.60	1.44
Nonadecanoico	19:0	29.87	0.49	1.64
Araquídico	20:0	38.04	0.70	1.84
Araquidónico	20:4	51.55	0.31	0.60
Behénico	22:0	49.15	0.32	0.65

\* = Condiciones de trabajo: Flujos, hidrógeno 47 ml/min , aire 450 ml/min , helio 40.5 ml/min.

Temperaturas: Detector 250°C , puerta de inyección a 190°C , horno programado de 150°C-210°C.

\*' = (número de carbonos:Número de dobles enlaces).

Reproductibilidad de la concentración ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) de los ésteres metílicos de ácidos grasos. \*

Esteres metílicos de ácidos grasos	$\bar{X}$	s ( $\pm$ )	C.V.
** 6:0	4.80	0.52	10.8
7:0	4.79	0.43	9.0
8:0	4.80	0.44	9.2
9:0	4.79	0.55	11.5
10:0	4.95	0.43	8.7
11:0	4.88	0.35	7.2
12:0	4.94	0.37	7.5
13:0	4.81	0.43	9.0
14:0	4.72	0.30	6.4
14:1	4.80	0.29	6.0
15:0	4.81	0.23	4.8
16:0	4.89	0.18	3.7
16:1	4.88	0.15	3.1
18:0	4.96	0.16	3.2
18:1	4.91	0.34	7.0
18:2	5.56	0.34	61.1
18:3	5.25	1.47	28.0
19:0	5.00	0.00	0.0
20:0	4.81	0.23	4.8
20:4	4.89	0.56	11.5
22:0	4.97	0.20	4.0

\* = Condiciones de trabajo: Flujos, hidrógeno 47 ml/min, aire 450 ml/min, helio 40.5 ml/min.

Temperaturas: Detector 250°C, puerta de inyección a 190°C, horno programado de 150°C a 210°C.

\*\* = (Número de carbonos: Número de dobles enlaces).

Sensibilidad del cromatógrafo de gases en la determinación de los ésteres metílicos de ácidos grasos. \* n=40

No. de átomos de Carbono de E.M.A.G.	No. de moles detectadas ( X 10 <sup>-8</sup> )	No. de moles del gas portador ( X 10 <sup>-5</sup> )	Partes por millón (p.p.m.)
6:0	3.84	66	58
7:0	3.47	101	34.3
8:0	3.16	137	23.0
9:0	2.90	152	19.0
10:0	2.69	206	13.0
11:0	2.50	242	10.3
12:0	2.33	282	8.3
13:0	2.20	344	6.4
14:0	2.06	272	7.6
14:1	2.08	145	14.3
15:0	1.95	253	7.7
16:0	1.85	322	5.7
16:1	1.86	434	4.3
18:0	1.76	474	3.7
18:1	1.77	458	3.9
18:2	1.78	579	3.0
18:3	1.80	608	3.0
19:0	1.68	423	3.9
20:0	1.60	615	2.6
20:4	1.64	525	3.1
22:0	1.53	391	3.9

E.M.A.G. = Esteres metílicos de los ácidos grasos.

\* = Condiciones de trabajo: Flujos, hidrógeno 47 ml/min, aire 450 ml/min, helio 40.5 ml/min.

Temperaturas: Detector 250°C, puerta de inyección a 190°C, horno programado de 150°C a 210°C.

Linealidad de los esteres metflicos de los ácidos grasos.\*

Esteres Metflicos de ácidos grasos	Rango de linearidad $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	
	Concentración mínima	Concentración máxima
6:0	0.016	5
7:0	0.008	5
8:0	0.08	5
9:0	0.016	5
10:0	0.016	5
11:0	0.032	5
12:0	0.032	5
13:0	0.032	5
14:0	0.032	5
14:1	0.5	5
15:0	0.5	5
16:0	0.5	5
16:1	0.5	20
18:0	1.0	20
18:1	1.0	20
18:2	1.0	20
18:3	2.0	20
19:0	1.0	20
20:0	2.0	20
20:4	2.0	20
22:0	2.0	20

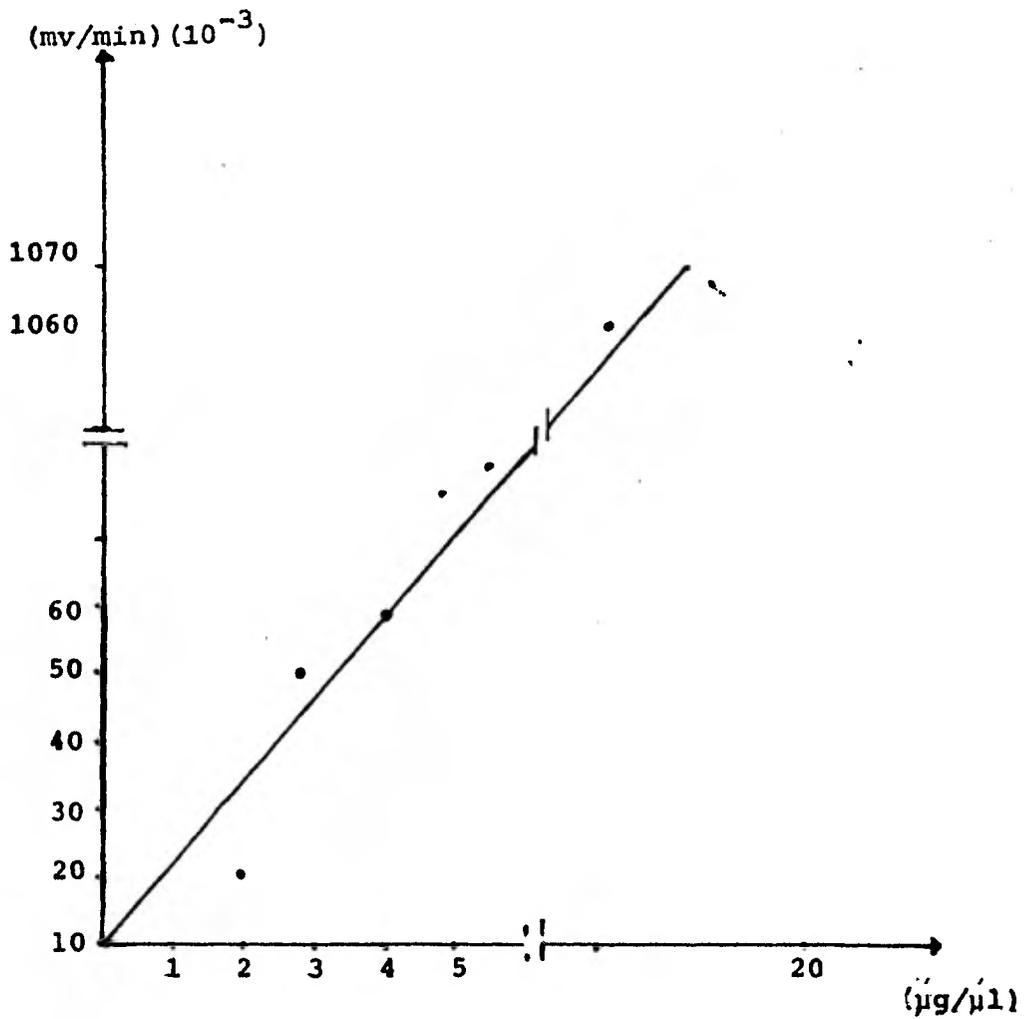
\* = Condiciones de trabajo: Flujos, hidrógeno 47 ml/min, aire 450 ml/min, helio 40.5 ml/min.

Temperaturas: Detector 250°C, puerta de inyección a 190°C, horno programado de 150°C a 210°C.

Linealidad. Se determinó el umbral de respuesta mínima para cada ácido graso, las gráficas se obtuvieron con un total de 14 puntos en el rango de concentraciones siguiente: de 0.004  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  en los ácidos grasos de menos de 16 átomos de carbono y hasta 20  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  en los ácidos de 16 o más átomos de carbono. Las gráficas obtenidas fueron similares en pendiente, sin observarse variaciones por las diferentes longitudes de las cadenas de los ácidos grasos. La gráfica que ejemplifica los resultados se trazó con los datos del ácido nonadecanoico, sustancia de referencia empleada para la cuantificación. Los valores obtenidos son :

$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	respuesta
0,004	-----
0,008	-----
0,016	-----
0,032	-----
0,0625	trazas
0,125	trazas
0,250	trazas
0,500	trazas
1,000	4319
2,000	78385
3,000	103147
4,000	176632
5,000	190559
20,000	1052338

El tipo de gráficas es :



LINEARIDAD DEL ACIDO NONADECANOICO.

Recuperación de los ácidos grasos durante el proceso. (hidrólisis, extracción, metilación, y determinación cromatográfica). (n = 20, para cada ácido graso)

No. de átomos de carbono de los E.M.A.G. <sup>+</sup>	Porcentaje de recuperación
*' 6:0	1.0507
7:0	1.2020
8:0	1.3670
9:0	3.1260
10:0	7.9500
11:0	12.5280
12:0	27.0510
13:0	34.4860
14:0	44.3370
14:1	31.9850
15:0	57.8250
16:0	80.0910
16:1	57.8310
18:0	118.4580
18:1	82.7170
18:2	68.9300
18:3	78.2890
20:0	112.7200
20:4	77.1000
22:0	246.8860
Acidos grasos totales en L.A.	57.3550

+ = Esteres metílicos de ácido graso.

% de ácido palmítico (16:0) <sup>†</sup>		
Pacientes	Normales	Con patología
n	9	18
% de ác.palmítico	mayor de 35	menor de 34.9
% de frecuencia	77.7	66.6

† = (número de átomos de carbono: número de dobles enlaces)

Relación ácido palmítico/ácido mirístico, (16:0) <sup>†</sup> / (14:0) <sup>†</sup> P / M		
Casos	Normales	Patológicos
Relación P/M	mayor de 10	menor de 10
% de frecuencia	65	60

† = (número de átomos de carbono : número de dobles enlaces).

Relación ácido palmítico/ácido esteárico P / E		
Casos	Normales 15	Patológicos 14
Relación P/E	Mayor de 6.5	Menor de 6.5
Frecuencia	75 %	60 %

Distribución de casos normales y patológicos por edad gestacional.			
Semanas	28 - 32	33 - 37	38 - 43
n	1	8	20
Normales	0	0	15*
Con patología	1	8	5

\* = fallecieron 2 por causas diferentes a las patologías consideradas.

% de ácido palmítico, relaciones palmítico/esteárico, palmítico/ mirístico y fosfatidilglicerol (Fg) en pacientes embarazadas con patología a diferentes edades de gestación.

n	semanas de gestación	% de ácido palmítico.	Relación		Fg	Patología.
			Palmítico	Palmítico		
			Esteárico	Mirístico		
1	30	19.29	5.35	7.9	-	Isoinmunización Rh (-)
2	33	6.5		3.6	-	Tox. Severa
3	34	55.27	20.3		+	Tox. Severa
4	35	5.4		35	-	Tox. severa
5	35	16.37	1.34	11.4	+	Diabetes
6	36	6.04		2.6	+	Diabetes
7	36	29.72	5.7	8.2	-	Tox. Severa
8	37	6.32	3.0		+	Diabetes
9	37	32.76	3.57	14.0	+	Isoinmunización Rh (-)
10	39	11.3		8.16	+	Polihidramnios.
11	39	53.2	6.21	12.04	+	Tox. Severa
12	39	12.4		12.04	+	Diabetes
13	41	31.9	7.72	12.22	+	Tox. Severa
14	41	16.8	2.09	2.85	+	Diabetes.

## 5.0 CONCLUSIONES.

De los análisis efectuados podemos concluir que la adaptación de nuevos instrumentos y métodos en los análisis clínicos proporcionan cada vez más seguridad en los resultados, dejándose ver que lo sofisticado de una técnica es más bien su no comprensión para su aplicación a cualquier nivel, son muchos parámetros de los que el químico-clínico o persona responsable de estos, puede valerse para facilitar sus investigaciones, nuestra determinación de ácidos grasos se ve limitada a la investigación en nuestro medio debido a estos factores. No obstante el escaso número de determinaciones efectuadas puede apreciarse la validez del método, por su sensibilidad, reproductibilidad, exactitud, linealidad y que los resultados negativos pueden atribuirse a la secuencia en donde interviene el factor humano.

Los resultados obtenidos concuerdan con la mayoría de trabajos anteriormente realizados por otros autores (1,2,3,13,14,17,19,20,21,27,29,30) para los porcentajes de recuperación de los ácidos grasos y las variaciones que se presentan en estos aún cuando no sean técnicas idénticas u objetivo similar.

No es posible presumir que la determinación de ácidos grasos por sí sola aporte datos suficientes en la predicción de la madurez pulmonar fetal, tal vez si la casuística aumentara podría cambiarse nuestro aspecto cualitativo y comprobar que este análisis debe formar parte de la batería de pruebas con las que actualmente se hacen dichas predicciones.

## 6.0 RESUMEN.

Se realizó una breve revisión acerca de los orígenes composición e importancia del líquido amniótico durante el desarrollo fetal, la representación que tienen los parámetros en él determinados y la conveniencia de estos análisis en embarazos considerados de alto riesgo respecto a embarazos normales, se revisó también el origen y características de los ácidos grasos en él encontrados y la forma más conveniente de detectarlos. Se explica también los fundamentos básicos de la cromatografía de gases, método adecuado para esta determinación (33) y la utilización de métodos de cuantificación electrónica que permite la identificación y cuantificación de más de un compuesto a la vez. Se realizaron pruebas para establecer un control de calidad

mediante mezcla de estandares de ácidos grasos de 6 átomos de carbono hasta 22 átomos de carbono entre ellos algunos insaturados de interes biológico como el oleico, linoleico linolénico y araquidónico, el interes de éste estudio se centro en los ácidos palmítico, mirístico, y esteárico comparando las posibles relaciones entre ellos pero admitiendo que nuestros datos son sólo presuntivos por carecer de un número suficiente y representativo. los valores obtenidos son los siguientes:

*Reproductibilidad*; los ácidos mirístico, palmítico y esteárico presentaron una dispersión de 0.30, 0.18 y 0.16 respectivamente.

*Exactitud*, presento valores de dispersión de 0.09, 0.18, y 0.34 respectivamente.

*Sensibilidad*, presento valores de 7.6, 5.7, y 3.7 partes por millón respectivamente.

*Linealidad*, se mantuvo en el rango de 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  hasta valores de 20  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

*La recuperación*, presento valores de 44.337 % , 80.091 % y

118,0 % respectivamente,

El total de líquidos amnióticos analizados correspondieron a 47 embarazadas, 2 de ellas normales, de parto a término y las 45 restantes presentaron patología asociada al embarazo se obtuvo un valor umbral de 35% para el ácido palmítico y relaciones de 10 y 6.5 para palmítico/mirístico y palmítico esteárico respectivamente. Se deshecho la idea de obtener medias ( $\bar{x}$ ) aritméticas que apoyaran estos valores, por ser muy variadas las patologías. Fue posible observar un marcado descenso en los valores de ácido palmítico en los líquidos que pertenecían a embarazadas diabéticas.

## 7.0 BIBLIOGRAFIA.

- 1 Warren, C., Holton, J.B. y Allen, J.T.:  
Assessment of fetal lung maturity by estimation of  
amniotic fluid palmitic acid.  
Br.Med.J. 1 :94 ;1974.
- 2 Roux, J.F., Nakamura, J. y Frosolono, M.:  
fatty acid composition and concentration of lecithin  
in the acetone fraction of amniotic fluid phospholi-  
pids.  
Am.J.Obstet.Gynecol. 119 : 838 ,1974.
- 3 O'neil, G.T., Davies, T.J.:  
Palmitic/stearic ratio of amniotic fluid in diabetic  
and nondiabetic pregnancies and its relationship to  
development of respiratory distress syndrome.  
Am.J.Obstet.Gynecol. 132 : 519 , 1978.

- 4      Fernandez, A. y Spellacy, W.N. :  
Amniotic fluid components as determinants of fetal  
maturity.  
Obstet. Gynecol. 46 : 76 , 1975.
- 5      Goldkrand, J.W., Varki, A. y McClurg, J.E. :  
Surface tension of amniotic fluid lipid extracts :  
prediction of pulmonary maturity.  
Am. J. Obstet. Gynecol. 128 : 591, 1977.
- 6      Singh, E.J y Zuspan, F.P. :  
Amniotic fluid lipids in normal human pregnancy.  
Am. J. Obstet. Gynecol. 117 : 919 , 1973.
- 7      Rubaltelli, F.F, Rondinelli, M., Zorzi, C., Saia, O.S. :  
Amniotic fluid surface tension during pregnancy.  
Biol. Neonate 29 ; 112 , 1976.
- 8      Zuspan, F.P. y Singh, E.J. :  
Amniotic fluid and fetal maturity.  
J. Reprod. Med. 16 : 39 , 1976.
- 9      Zulli, P., Cocco, L. y Antonucci, A. :  
Study of the lipid fractions of the amniotic fluid  
in relation to the acute respiratory syndrome of  
newborn infants.  
Boll. Soc. Ital. Biol. Spot. 49: 721 , 1973.

- 10 Ekelund, L. y Astedt, B. :  
Amniotic fluid lecithin and its fatty acids composition in respiratory distress syndrome.  
J.Obstet.Gynecol.Br.Commonw. 80 :912, 1973.
- 11 Nakamura, J., Roux, J.F., Brown, E.G. y Sweet, A.V. :  
Total lipids and the lecithin-sphingomyelin ratio of amniotic fluid; ¿ an antenatal test of lung immaturity?.  
Am.J.Obstet.Gynecol. 113 : 363, 1972.
- 12 Nelson, G.H. y Freedman, D. :  
Relationship between amniotic fluid triglycerides levels and fetal maturity.  
Am.J.Obstet.Gynecol. 111 :930 ; 1971.
- 13 Hallman, M. y Gluck, L. :  
Phosphatidyl glycerol in lung surfactant; 1. Synthesis in rat lung microsomas.  
Biochem. Biophys. Res. Comm. 60 ; 1 , 1974.
- 14 Hallman, M., Feldman, B.H., Kirkpatrick, E. y Gluck, L. :  
Absence of phosphatidyl glycerol (Pg) in respiratory distress syndrome in the newborns. Study of the minor surfactant phospholipids in newborns.  
Pediatr. Res. 11 ; 714 , 1974.

- 15 Doran, T.A., Benzie, R.J., Hakins, J.L., Jones Owen, V.M.  
Porter, C.J., Thompson, D.W. y Liedgren, S.I.:  
Amniotic fluid tests for fetal maturity.  
Am.J.Obstet.Gynecol. 119 : 829 ,1974.
- 16 Doran, T.A., Benzie, R.J.:  
Amniotic fluid lecithin/sphingomyelin ratio, palmitic acid, palmitic acid/stearic acid ratio, total cortisol, creatinine and percentage of lipid-positive cells in assessment of fetal maturity and fetal pulmonary maturity: a comparison.  
Am.J.Obstet.Gynecol. 133 ; 302 ,1979.
- 17 Hallman, M. y Gluck L.:  
Phosphatidylglycerol in lung surfactant. II. Subcellular distribution and mechanism of biosynthesis in vitro.  
Biochim.Biophys.Acta. 409 : 172 ,1975.
- 18 Wykle, R.L., Malone, B., Blank, M.L. y Snyder, F.:  
Biosynthesis of pulmonary surfactant: Comparison of 1-Palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine and palmitate as precursors of Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine in adenoma alveolar Type II cells.  
Arch.Biochem.Biophys. 199 : 526,1980.

- 19 Folch, J., Lees, M., y Sloane, G.H. :  
A simple method for the isolation and purification of  
total lipides from animal tissues.  
J. Biol. Chem. : 226 ; 497 , 1957.
- 20 Schirar, A., Vielh, J.P., Alcindor, L.G. y Gautray, J.P. :  
Amniotic fluid phospholipids and fatty in normal  
pregnancies. Relation to gestational age and neonatal  
condition.  
Am. J. Obstet. Gynecol. 121 ; 653, 1975.
- 21 Das, S.K., Foster, H.W., Adhikari, P.K., Mody, B.B., y Bhat  
tacharyya, D.K. :  
Gestational variation of fatty acid composition of  
human amniotic fluid lipids.  
Obstet. Gynecol. 45 ; 425 , 1975.
- 22 Masood, S :  
Amniotic fluid analysis in assessment of fetal matu  
rity.  
Am. J. Clin. Pathol. 68 : 235 , 1977
- 23 Shor, P.V., Soria Diaz, I.J., Murrieta, N.S. y Karch-  
mer, S. :  
Estudio de las relaciones metabólicas fetomaternas.  
II. Los lípidos en el líquido amniótico del embara  
zo normal.  
Ginec. Obstet. Mex. 32 ; 157 , 1972.

- 24 Desphande, T.V., Harding, P.G.R., y Jaco, N.T. :  
Estimation of gestational age from study of amniotic  
fluid and clinical assessment.  
Can. Med. Assoc. J. 117 ; 886, 1977.
- 25 Goldkrand, J.W., Varki, A., McClurg, J.E. :  
Rapid prediction of pulmonary maturity by amniotic  
fluid lipid globule formation.
- 26 Perkins, R.P. :  
Antenatal assessment of fetal maturity.  
Obstet. Gynecol. Sur. 29 : 369 , 1974.
- 27 Morrison, W.R. y Smith, L.L.M. :  
Preparation of fatty acid methyl esters and dimethyl  
acetals from lipids with fluoride-methanol.  
J. lip. Res. : 5 ; 690 , 1964.
- 28 Elrad, H., Beydoun, S.N., Hagen, J.H., Cabalum, M.T.,  
Aubry, R.H. y Smith, C. :  
Fetal pulmonary maturity as determined by fluores-  
cent polarization of amniotic fluid.  
Am. J. Obstet. Gynecol. : 132; 681 1978.
- 29 Biezenski, J.J., Pomerance, W., Goodman, J. :  
Studies on the origin of amniotic fluid lipids.  
I. - Normal composition.  
Am. J. Obs. Gynecol. 102 ; 853 , 1968.

- 30 Lerdo de tejada, H.A., López G. R., Correa, C.,  
Becerril, M. G., Alonso, C. D., y Karchmer, K. S. :  
Determinación de fosfatidil-glicerol en líquido am-  
niótico como prueba de madurez pulmonar.  
Ginec. Obstet. Mex. 48 ; 1 -4 ; 1980.
- 31 Biezenski, J.J. :  
Pulmonary surfactant and amniotic fluid lipids.  
Obstet. Gynecol. Annu. 5 ; 71 , 1976.
- 32 Forfar, J.O., Campbell, A.G.M. :  
Aspectos del metabolismo neonatal. Cambios metabó-  
licos en el síndrome de distress respiratorio.  
Clínica endocrinológica. 4 ; 54 - 79 , 1977.
- 33 Votta, R.A. :  
Líquido amniótico.  
Editorial Argentina S.A. Vol. I . cap. I -VI.  
Buenos Aires Arg. 1974.
- 34 BIBLIOGRAFIA ADICIONAL.  
Lenninger,  
Bioquímica. 2<sup>a</sup> ed. Editorial Omega.  
Barcelona España 1974.  
Tietz, N. :  
Análisis Clínicos. 3<sup>a</sup> ed. Editorial Interameri-  
cana. Buenos aires Arg. 1974.