

239  
27



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
ZARAGOZA

EFFECTO DEL TRAUMA QUIRURGICO EN NIÑOS, SOBRE LA  
CONCENTRACION SANGUINEA DE ACIDO ASCORBICO

# Tesis Profesional

Que para obtener el Título de  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
presenta

ROSAURA PEREZ MEDINA



México, D. F.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1989



## **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 está 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.

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

## INDICE

	Página
1.0 INTRODUCCION	1
1.1 Marco histórico	1
1.2 Química y bioquímica de la vitamina C	2
1.3 Requerimientos en condiciones de salud	5
1.4 La vitamina C en los procesos <u>in</u> fecciosos	6
2.0 FUNDAMENTO DEL PROBLEMA	8
3.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
4.0 OBJETIVOS	12
5.0 HIPOTESIS	13
6.0 MATERIAL Y METODOS	14
6.1 Material biológico	14
6.2 Procedimientos de laboratorio	17
6.3 Métodos estadísticos	24
7.0 RESULTADOS	25
8.0 DISCUSION DE RESULTADOS	38

9.0	CONCLUSIONES	48
10.0	RECOMENDACIONES	50
11.0	REFERENCIAS	51
12.0	ANEXOS	60

## 1.0 INTRODUCCION

### 1.1 Marco histórico

El conocimiento acerca de la eventual presencia del escorbuto en el hombre, precedió a la síntesis química de la vitamina C, en 3500 años.

Aun cuando desde el siglo XVIII se sabía que los cítricos curaban el escorbuto, el dramático final de la flota del almirante George A. Anson, integrada para dar la vuelta al mundo, motivó a James Lind a realizar en 1747 su histórico experimento en el barco Salisbury. Fue en base a esta experiencia que el almirantazgo inglés dictó medidas pertinentes para que los marineros fuesen abastecidos con jugo de limón durante sus prolongadas travesías.

En el presente siglo, el escorbuto adquirió resonancia mundial al conocerse la noticia de que los integrantes de la expedición comandada por el capitán Robert Falcon Scott, para explorar el polo sur, fallecieron a consecuencia de esta enfermedad.

En épocas recientes el escorbuto sólo se ha documentado en forma esporádica, particularmente en niños lactantes y ancianos. (1).

## 1.2 Química y bioquímica de la vitamina C

La vitamina C, conocida también como vitamina antiescorbútica o ácido ascórbico, se encuentra principalmente en las frutas y en algunos vegetales; en la leche recién ordeñada puede encontrarse en una concentración que disminuye rápidamente; a medida que este alimento es expuesto a la luz y al aire (2).

Sólo pocas especies animales (los monos y los conejillos de indias), además del hombre, necesitan de la vitamina C que proveen los alimentos. Casi todos los animales están bioquímicamente dotados para sintetizar la vitamina C a partir de la glucosa (1,3).

Entre 1910 y 1920, Zilva y sus colaboradores trabajaron intensamente para aislar y sintetizar la vitamina C. Sus estudios permitieron conocer que esta vitamina no sólo previene la aparición del escorbuto, sino que participa activamente en el desarrollo de los tejidos dentarios (1)

En 1928 Svirbely y Szent-Györgyi lograron aislar del jugo de naranja, de la col y de las glándulas suprarrenales, un ácido que calificaron como "hexahurónico". Mientras tanto King, auxiliado por sus colaboradores, obtuvo la vitamina del jugo de limón y demostró que el ácido hexahurónico era precisamente esta vitamina (1).

Químicamente el ácido L-ascórbico, es un compuesto altamente soluble en agua, con un peso molecular de 176. Se le identifica con la fórmula  $C_6H_8O_6$ . El ácido L-ascórbico es considerado como la forma activa de esta vitamina, sin embargo el ácido dehidro-L-ascórbico tiene también actividad antiescorbútica (1,4).

El ácido ascórbico es obtenido de frutas y vegetales frescos, particularmente de aquellos que tienen un crecimiento rápido. Los animales sintetizan el ácido ascórbico a partir de la glucosa que sufre una transformación a ácido L-gulónico, de éste a L-gulonolactona, que se transforma en 2-ceto-gulonolactona, la cual es convertida en ácido ascórbico. Hay evidencias que hacen pensar que el hombre no sintetiza la vitamina C, en virtud de que carece de los sistemas enzimáticos que permiten convertir la L-gulonolactona en ácido ascórbico (1,2 y 5).

El ácido ascórbico es fácilmente destruido por oxidación: la exposición al aire y a un medio alcalino, al calor y el contacto con el cobre o el hierro, favorecen la transformación del ácido ascórbico en ácido diceto gulónico, ácido oxálico y otros derivados. Curiosamente, la mayoría de los alimentos ricos en vitamina C contienen también otros ácidos orgánicos con actividad antioxidante, que preservan la vitamina C (2).

Su absorción ocurre en el intestino delgado. Cuando el aporte en la dieta es de 50 a 150 mg/día, el nivel de esta vitamina en el plasma se mantiene a una concentración de 1.2 mg/dL. El umbral renal del ácido ascórbico es aproximadamente de 1.4 mg/dL; una concentración mayor favorece su presencia en la orina, apareciendo en su forma química original o como sulfato (1,5 y 6).

Por ser el ácido ascórbico una substancia que tiene una gran capacidad reductora, forma parte de los sistemas enzimáticos de los tejidos donde ocurren procesos de oxidación y reducción. Participa en la hidroxilación de la prolina para la síntesis del colágeno. Por otro lado, interviene en la hidroxilación del triptofano y en la conversión de hidroxifenil-piruvato, para dar lugar al ácido homogentísico en el camino metabólico de la tirosina. Participa también en la hidroxilación y síntesis de esteroides en las glándulas suprarrenales (1).

En animales de experimentación se ha probado su participación en los procesos de regeneración neuromuscular y cicatrización de los tegumentos (1).

La deficiente ingestión de vitamina C por tiempo prolongado, da lugar a la aparición de los signos y síntomas que identifican al escorbuto. Las alteraciones patológicas de esta enfermedad, se encuentran relacionados

a los defectos que ocurren en la formación del tejido colágeno. Precisamente, el defecto en el revestimiento de los vasos sanguíneos, es debido a la deficiente unión de las células por anomalías en el cemento intercelular. Por esta misma razón acontecen alteraciones en el tejido osteoide que conforma la matriz de los huesos y las estructuras dentales (5-8).

Desde el punto de vista clínico, el escorbuto se manifiesta por los cambios patológicos en los vasos sanguíneos, la piel, los huesos, los dientes y las encías; se presenta anemia, fatiga, irritabilidad, dolor en los huesos, infecciones recurrentes, retardo en la cicatrización de los tejidos, fiebre y sangrado de las mucosas (5-8).

### 1.3 Requerimientos en condiciones de salud

La cantidad de ácido ascórbico para mantener el organismo en un estado de salud satisfactorio, ha sido motivo de controversia (9). Experimentos realizados en humanos han permitido comprobar que 10 mg/día de esta vitamina es suficiente para prevenir el escorbuto (10). No obstante esta evidencia, las recomendaciones dadas por organismos oficiales de diversos países, han variado entre 30 y 70 mg/día (11). La Organización Mundial para la Salud (OMS), conjuntamente con la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO), recomiendan 20 mg/día para los menor

res de 12 años, 30 mg/día en caso de ser mayores de 13 años y 50 mg/día para mujeres embarazadas y aquellas que se encuentren lactando (12).

Parece lógico suponer que las necesidades de ácido ascórbico sean mayores en condiciones fisiológicas caracterizadas por un incremento de la masa tisular activa; - tal situación se presenta durante el crecimiento y desarrollo del niño, es por esta razón que las recomendaciones diarias para este nutrimento son más altas. Por otro lado, a pesar de que en adultos se haya encontrado que - las necesidades de esta vitamina, para proteger a una persona del escorbuto, son de 10 mg/día, se recomienda una - cantidad tres veces mayor, debido a la variación biológica que caracteriza a la especie humana (13).

#### 1.4 La vitamina C en los procesos infecciosos

Durante las infecciones por virus que dan lugar a - manifestaciones de las vías respiratorias altas, los cambios en la concentración de vitamina C en los leucocitos hacen suponer que en estas enfermedades ocurre una drástica reducción en las reservas tisulares de esta vitamina (14); tal información parece ser congruente con observaciones que asignan a la vitamina C un efecto benéfico en la prevención de algunas enfermedades de origen viral

(15-17), cuando ésta es ofrecida diariamente a dosis elevadas. A este respecto se ha suscitado cierta controversia debido a que algunos autores no han podido confirmar el efecto profiláctico o terapéutico del ácido ascórbico en infecciones de las vías respiratorias altas (18-20), ni en la meningitis viral (21).

En animales de experimentación, tampoco se ha podido comprobar que la vitamina C refuerce los mecanismos de defensa del pulmón en contra de S. pneumoniae (22); sin embargo, en conejillos de indias se ha encontrado que la deficiencia de este nutrimento altera la función de los linfocitos T (23), y al suplementar estos animales con vitamina C, a dosis altas, se estimula la actividad mitótica de los linfocitos (24). En humanos no se ha demostrado que el consumo diario de 1 a 3 g de ácido ascórbico, promueva la síntesis de los compuestos proteínicos que intervienen en la inmunidad humoral (25), o de ocurrir un incremento en la síntesis de IgG e IgM, como ha sido informado por algunos investigadores (26), parece no tener significado clínico.

## 2.0 FUNDAMENTO DEL PROBLEMA

La participación del ácido ascórbico en los procesos de óxido-reducción que acontecen a nivel intracelular, y el papel que juega esta vitamina en la hidroxilación de diversos compuestos (1), permite suponer que su demanda biológica se incrementa substancialmente en situaciones clínicas caracterizadas por intenso catabolismo, como acontece en enfermedades infecciosas y traumáticas.

En pacientes con lesiones traumáticas múltiples, las necesidades de vitamina C aumentan debido a diversos factores, entre ellos: las pobres reservas de este nutrimento al suceder el trauma, a la severidad del daño, al hecho de que el enfermo sea manejado con oxígeno, o bien, a que éste sea intervenido quirúrgicamente (27). Todas estas circunstancias hacen difícil establecer los requerimientos de esta vitamina durante los traumatismos, no obstante esta dificultad, en la experiencia de algunos investigadores (27), los factores antes mencionados pueden contribuir a que se presenten manifestaciones de deficiencia, especialmente en enfermos atendidos en áreas destinadas a "terapia intensiva".

Las observaciones hechas por Crandon y Col. (28), hace tres décadas, en pacientes intervenidos quirúrgicamente, permitieron conocer que durante el periodo inmediato al trauma operatorio, ocurre una disminución significativa en la concentración de vitamina C en el plasma y en las células blancas de la sangre. En el mismo informe (28) se hace mención que 19 de los 47 pacientes en los que aconteció una dehiscencia de los bordes de la herida quirúrgica, los niveles de ácido ascórbico indicaban una franca deficiencia de esta vitamina. La experiencia obtenida por estos autores los condujo a recomendar una dosis diaria de 300 mg de ácido ascórbico en los pacientes quirúrgicos.

McGinn y Hamilton (29) explicaban el descenso de vitamina C durante el postoperatorio, por el volumen de sangre transfundida a los pacientes durante el acto quirúrgico. Estos investigadores hacen notar la drástica reducción en la concentración del ácido ascórbico contenido en los leucocitos de la sangre almacenada por siete días antes de ser transfundida. Sugieren, sin comprometerse, que los enfermos que vayan a ser llevados a un acto de cirugía mayor reciban vitamina C a grandes dosis.

Con la intención de aclarar algunas dudas que sur

gieron de los estudios referidos (28,29), Irvin y Col. (30) realizaron un estudio dividiendo a los pacientes según que el trauma fuese calificado como: ligero, moderado o severo. Esta investigación confirmó que, como consecuencia de la intervención quirúrgica, los requerimientos de vitamina C aumentan considerablemente, por lo cual se recomienda que los enfermos quirúrgicos reciban diariamente un suplemento de esta vitamina.

### 3.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las evidencias acumuladas en las pasadas décadas, no dejan duda alguna acerca de la disminución en las reservas orgánicas de vitamina C, como consecuencia del trauma quirúrgico.

Esta información cobra especial interés en países - donde prevalecen altos índices de desnutrición, debido en gran parte al consumo de dietas deficientes. Si se toma en cuenta que las experiencias han sido obtenidas en personas adultas de naciones donde la desnutrición no constituye un problema de salud pública, cabe suponer que los niños de los países en desarrollo, donde es común la desnutrición, el problema puede revertir caracteres de mayor gravedad.

Este argumento, y la circunstancia de que las observaciones hechas en adultos no siempre pueden ser extrapoladas a los niños, planteó la necesidad de estudiar este problema en niños intervenidos quirúrgicamente.

#### 4.0 OBJETIVOS

- 4.1 Determinar los niveles sanguíneos de ácido ascórbico en niños, antes y después de ser sometidos a una intervención quirúrgica.
- 4.2 Conocer en una situación hipercatabólica, dada por el trauma quirúrgico, el comportamiento de los niveles de ácido ascórbico en plasma, en relación a la concentración de esta vitamina en los leucocitos. Considerando esta última de terminación como un indicador de las reservas orgánicas.
- 4.3 Valorar un método de cromatografía de líquidos de alta resolución, para la medición de ácido ascórbico en muestras biológicas.

## 5.0 HIPOTESIS

Si la vitamina C interviene en diversas reacciones bioquímicas y procesos fisiológicos, entonces se esperará que los niveles de ácido ascórbico en el plasma y en los leucocitos se encuentren por debajo de los niveles normales en aquellos pacientes sometidos a una situación hipercatabólica (acto quirúrgico).

## 6.0 MATERIAL Y METODOS

### 6.1 Material biológico

La muestra para estudio se integró de 70 muestras de sangre venosa provenientes de 20 niños del servicio de Cirugía General del Hospital Infantil de México "Federico Gómez", de ellos 8 correspondieron al sexo femenino.

A criterio de los cirujanos, los niños fueron clasificados en dos grupos: en el grupo A se incluyeron los operados por problemas relacionados con anomalías de la pared del abdomen, o de los planos superficiales, el grupo B se integró con los niños que fueron sometidos a una intervención de "cirugía mayor", de urgencia o bien que implicaba la reconstrucción minuciosa de algunas estructuras.

En los cuadros 1 y 2 se presenta la información detallada acerca de los niños, incluyendo la valoración del estado de nutrición de acuerdo al criterio de Gómez (31); con esta finalidad se calculó el porcentaje de peso, con respecto al valor ponderal sugerido para la edad cronológica en las tablas de Ramos Galván (32).

CUADRO 1

CARACTERISTICAS SOMATICAS Y TIPO DE INTERVENCION QUIRURGICA REALIZADA  
EN LOS NIÑOS QUE INTEGRARON EL GRUPO A

N°	REGISTRO	SEXO	EDAD		PESO (Kg)	PESO* (%)	INTERVENCION
			años	meses			
1	038345	F	-	10	8.1	84.4	Cierre de colostomía
2	030852	M	12	0	53.8	135.3	Extirpación de hemolinfangioma
3	037270	F	-	4	4.9	70.9	Resección de linfangioma axilar
4	641031	F	5	7	16.0	78.7	Hernia inguinal
5	037999	M	11	0	44.0	124.4	Extirpación de linfangioma inguinal
6	051879	M	9	0	15.5	54.0	Descenso testicular por criptorquidea IV
7	635868	M	8	0	29.5	114.1	Descenso testicular por criptorquidea II B
8	641334	M	9	3	31.0	108.0	Hernia inguinal y orquidopexia
$\bar{X}$			7	0	25.35	97.3	
s			4	1	16.23	25.8	

\* De acuerdo a las tablas de Ramos Galván (Somatometría pediátrica) Arch Inv Med Méx, 1975;6: Supl. 1.

CUADRO 2

CARACTERÍSTICAS SOMÁTICAS Y TIPO DE INTERVENCIÓN QUIRÚRGICA REALIZADA  
EN LOS NIÑOS QUE INTEGRARON EL GRUPO B

N°	REGISTRO	SEXO	EDAD		PESO (Kg)	PESO* (%)	INTERVENCIÓN
			años	meses			
1	641674	M	7	0	23.5	91.4	Colostomía y orquidopexia
2	646631	F	16	3	52.5	94.0	Laparotomía por tumoración abdominal
3	646763	M	5	2	20.0	96.0	Corrección de epispadias
4	646806	M	13	9	28.4	98.6	Laparotomía exploradora por tumoración abdominal y sangrado de tubo digestivo
5	643347	F	8	0	19.5	63.3	Salpingitis aguda, drenaje de cavidad, cierre de perforación y apendicectomía
6	638001	M	1	9	11.5	95.8	Fístula recto-escretal y cierre de colostomía
7	641690	M	10	7	23.5	66.4	Duplicación vesical e incontinencia anal-uretral
8	639532	M	4	9	15.5	84.0	Colectomía ascendente, colostomía y sigmoideoscopia subtotal
9	591299	F	5	7	14.4	70.3	Cierre de colostomía y fístula recto-urinary
10	643988	F	13	4	50.0	101.5	Resección de quiste de ovario
11	646173	M	-	3	4.3	72.0	Necrosis intestinal con perforaciones múltiples
12	646136	F	-	4	5.3	84.4	Cierre de ileostomía y resección de estenosis con anastomosis
$\bar{x}$			7	4	22.3	77.9	
s			5	4	10.3	10.9	

\* De acuerdo a las tablas de Ramos Galván (Somatometría pediátrica) Arch. Inv. Med. Méx., 1975; 6: Supl. 1.

Las muestras de sangre para la determinación del ácido ascórbico fueron obtenidas durante el transcurso de las 24 h previas a la intervención quirúrgica, a las 24 h del postoperatorio y a los 7 días. En el grupo B se obtuvo además una muestra a las 72 h. Para cada muestra se realizaron determinaciones en el plasma y en los leucocitos. Tan pronto como se obtenían las muestras de sangre, eran trasladadas al laboratorio para su procesamiento.

#### 6.2 Procedimientos de laboratorio

La determinación del ácido ascórbico se hizo mediante un procedimiento de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (fase reversa y par de iones), sugerido por Lee y Col. (33). El procedimiento se adaptó para ser desarrollado en un cromatógrafo Perkin Elmer, modelo Series 2/2 (Perkin Elmer Co., Norwalk Conn.), equipado con una columna analítica C<sub>18</sub>-ODS para fase reversa y un detector espectrofotométrico Perkin Elmer modelo LC-75 (Perkin Elmer Co.). La determinación de ácido ascórbico se hizo separadamente en el plasma y en los leucocitos.

La identificación y cuantificación de ácido ascórbico en el perfil cromatográfico se realizó cotejando el trazo de las muestras problema con respecto al obtenido

con una solución estándar de ácido ascórbico, tomando como referencia el tiempo de retención en el que aparece el ácido y la altura de ambos "picos" en el perfil cromatográfico.

Los resultados obtenidos se expresaron en miligramos de ácido ascórbico por decilitro de plasma (mg/dL). Para la determinación de este compuesto en los elementos figurados de la serie blanca presentes en la sangre, se separaron las células mediante un procedimiento de sedimentación diferencial, utilizando un agente químico (Dextran T-500, Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala Sweden) - para lograr una mejor separación, tal como lo recomienda Denson (34). Los resultados obtenidos en leucocitos se expresaron en microgramos de ácido ascórbico por  $10^8$  células ( $\mu\text{g}/10^8$  cél). La cuantificación de estas células se efectuó por un procedimiento rutinario (35). En la figura 1 se ilustran a manera de ejemplo, dos de los trazos obtenidos con muestras problema.

#### 6.21 Separación de leucocitos y extracción del ácido ascórbico

1.- Extraer 5 mL de sangre venosa con los cuidados recomendados de asepsia en un tubo de vidrio con anticoa

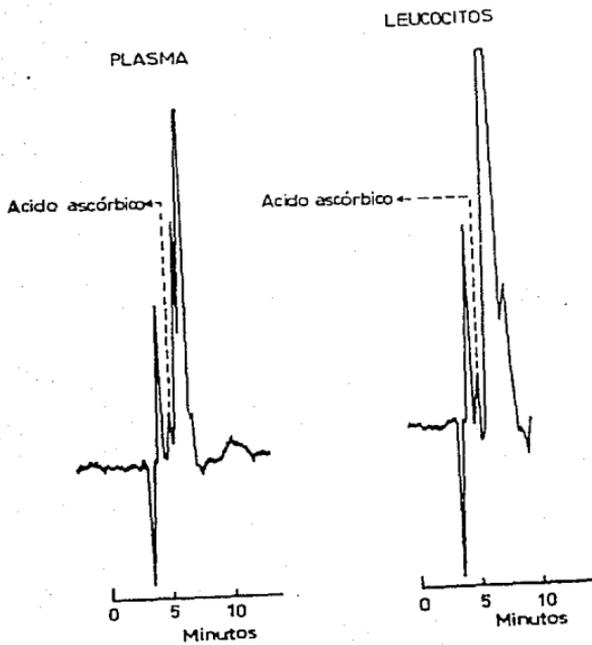


Figura 1 Perfil cromatográfico para la identificación del ácido ascórbico en el plasma y en los leucocitos.

gulante (1 mg de EDTA/mL de sangre).

2.- Con una pipeta depositar, gota a gota, 3 mL de sangre homogenizada sobre 12.5 mL de diluyente en un tubo para centrifuga de 15 mL y mezclarlo por inversión lenta.

3.- Conservar el tubo a temperatura ambiente durante 60 min. En los 2 mL de sangre restantes determinar la cuenta de leucocitos y el resto centrifugarlo a 3000 rpm por 10 min., recuperar el plasma y conservarlo en refrigeración para la determinación cromatográfica de ácido ascórbico.

4.- Del tubo del paso 2, separar la capa superior clara (12-13 mL) y depositarla en un tubo cónico para centrifuga. Desechar la capa inferior de eritrocitos.

5.- Centrifugar a 3000 rpm por 30 min.

6.- Desechar el sobrenadante y lavar el botón celular (glóbulos blancos y unos cuantos glóbulos rojos) con 5-7 mL de solución salina amortiguadora de fosfatos para eliminar residuos de diluyente, centrifugando a 3000 rpm por 5-10 min cada vez.

7.- Eliminar los glóbulos rojos del botón celular homogenizado agregando 10 mL de agua destilada fría y agitando el tubo por inversión lenta. Inmediatamente agregar 5 mL de solución salina fisiológica y agitar.

8.- Centrifugar a 3000 rpm por 10 min y recuperar -

el botón celular dejándolo escurrir para eliminar lo más posible de líquidos.

9.- Homogenizar el botón celular y adicionarle 0.275 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.003 M fría y 0.025 mL de ácido perclórico concentrado.

10.- Cubrir el tubo y agitarlo en el "mixer" durante 10 min a máxima velocidad.

11.- Congelar el tubo a  $-40^{\circ}$  C por 10-20 min y descongelarlo a temperatura ambiente.

12.- Centrifugar a 3000 rpm por 10 min. Recuperar el sobrenadante para el ensayo cromatográfico. Si el extracto no se analiza inmediatamente mantenerlo en congelación a  $-40^{\circ}$  C.

13.- Transferir 0.025 mL del sobrenadante en un tubo de vidrio y adicionarle 0.025 mL de solución de carbonato de sodio 0.13 M y 0.025 mL de solución amortiguadora fría (dilución 1:3). Agitar.

14.- Inyectar 20  $\mu$ L de esta solución en el cromatógrafo combinándolo con 15  $\mu$ L de solución amortiguadora fría en el "loop". Si la muestra así lo requiere, puede ser diluida 1:5 ó 1:7 con solución amortiguadora fría conservando la proporción de carbonato.

15.- Medir la altura del "pico" para el ácido ascórbico en el perfil cromatográfico y calcular el contenido de éste en la muestra.

#### 6.22 Cuenta de leucocitos

- 1.- Mezclar homogéneamente bien la sangre.
- 2.- Llenar con sangre la pipeta de Thoma para leucocitos hasta la marca de 0.5.
- 3.- Limpiar con una gasa la sangre adherida en el exterior de la pipeta.
- 4.- Completar hasta la marca de 11 con líquido de - Turk.
- 5.- Homogenizar durante un min. en el agitador de - pipetas.
- 6.- Desechar las 4 ó 5 primeras gotas de la pipeta y llenar la cámara de Neubauer por los bordes, dejando penetrar el líquido hasta que cubra toda la superficie.
- 7.- Reposar de 1 a 3 min. a temperatura ambiente.
- 8.- Observar en el microscopio con el objetivo de - 10 X contando los leucocitos contenidos en  $0.4 \text{ mm}^3$  distribuidos en los cuatro cuadrantes de los extremos de la cámara.
- 9.- Calcular el número de células por  $\text{mm}^3$  y en los 3 mL empleados para la extracción de ácido ascórbico.

#### 6.23 Acido ascórbico en el plasma

- 1.- En un tubo de plástico transferir 0.5 mL de plasma más 0.5 mL de solución de ácido perclórico 0.35 M

y agitar vigorosamente.

2.- Centrifugar a 10 000 rpm,  $-4^{\circ}$  C por 15 min.

3.- Separar y conservar el sobrenadante para el ensayo cromatográfico. Si la muestra no se analiza inmediatamente mantenerla a  $-40^{\circ}$  C.

4.- Transferir 0.050 mL de la muestra en un tubo de vidrio y diluirlo con 0.050 mL de solución de carbonato de sodio 0.05 M y 0.05 mL de solución amortiguadora de fosfatos fría (dilución 1:3).

5.- Inyectar 20  $\mu$ L de la dilución, combinándolo en el "loop" con 15  $\mu$ L de solución amortiguadora de fosfatos. Si se requiere, la muestra puede diluirse con solución amortiguadora fría a 1:5 manteniendo la proporción de carbonato.

6.- Calcular la altura del pico para el ácido ascórbico en el perfil cromatográfico y el contenido de éste en la muestra.

#### 6.24 Condiciones experimentales de cromatografía

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución, modelo Series 2/2, Perkin Elmer.

- Fase móvil: Solución amortiguadora de fosfatos 0.003 M, más 23 % de metanol, más 5 mL de hidróxido de te-

trabutil amonio, pH = 4.5.

- Flujo de las bombas: 1 mL/min., isocrático
- Temperatura: 22-24° C.
- Inyector de muestras: Rheodyne modelo 7105, "loop" de 175 µL.
- Columna: Analytical C<sub>18</sub> (10 µm) de 25 cm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno.
- Empaque de la columna: ODS (octadecilsilano) unido a sílice. Tamaño de partícula: 10 µm.
- Detector: Espectrofotométrico modelo LC-75 Perkin Elmer. Longitud de onda 254 nm. Atenuación 0.01 AUFS (Absorbance Units Full Scale).
- Registrador: modelo 023 Perkin Elmer, entrada 10 mV. Velocidad de la carta: 30 cm/h.
- Tiempo de retención para el ácido ascórbico: 5 min.

### 6.3 Métodos estadísticos

El manejo de la información se hizo de acuerdo a los procedimientos de la estadística descriptiva. Para el análisis acerca de la significación de las diferencias registradas durante el experimento, se utilizó la prueba de "Student" para muestras dependientes (36) y las pruebas no paramétricas de Fisher y Mann - Whitney (37).

## 7.0 RESULTADOS

### 7.1 Valoración del método cromatográfico

En la figura 2 se ilustra la curva estándar empleada para la estimación del ácido ascórbico. En ella se presentan también los cálculos acerca de la reproducibili--dad del método, considerando para ello la altura del pico en el perfil cromatográfico, después de inyectar al aparato, en 14 ocasiones, 50 ng de ácido ascórbico; el coeficiente de variación  $(s/\bar{x} \cdot 100)$  fue de 1.62. En lo que respecta a la linealidad, ésta se obtuvo efectuando por triplicado siete determinaciones de ácido ascórbico, entre 0 y 50 ng. El límite de detección de la vitamina en el perfil fue de 2 ng/10  $\mu$ L, el nivel del ruido se estimó en 0.2 cm. El estándar de ácido ascórbico fue diluido en ácido percló--rico, haciendo las determinaciones tan pronto se hizo la dilución; como estándar se usó ácido L-(+)-ascórbico con una pureza de 99.7 % (E. Merck, Darmstad).

La sensibilidad del procedimiento se valoró mediante el método de la recuperación, habiendo obtenido un índice de 96.4 % , para lo cual se emplearon muestras entre 10 y 40  $\mu$ g. En el cuadro 3 aparce la información obtenida a este respecto.

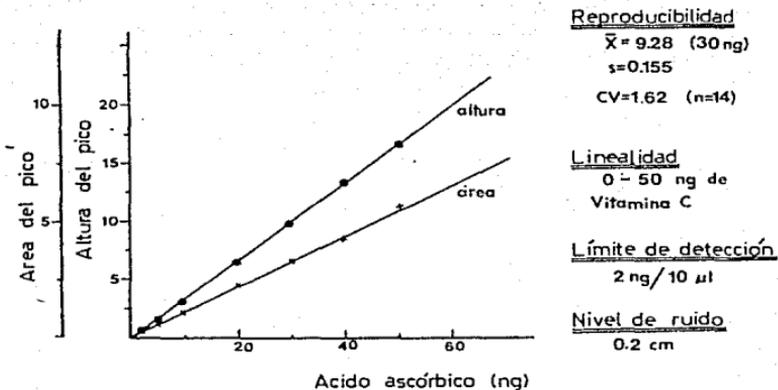


Figura 2 Curva estándar utilizada para la cuantificación del ácido ascórbico. En ella aparecen también los índices de reproducibilidad, linealidad, límite de detección del compuesto y nivel de ruido.

CUADRO 3

RESULTADOS OBTENIDOS AL VALORAR EL PROCEDIMIENTO  
CROMATOGRAFICO PARA LA ESTIMACION DE ACIDO ASCOR-  
BICO MEDIANTE LA "RECUPERACION"

CONCENTRACION DE ACIDO ASCORBICO (ng)	ALTURA DEL PICO DEL ESTANDAR (cm)	ALTURA DEL PICO DE UN POOL DE SUEROS ADICIONA- DO DE ESTANDAR* (cm)	RECUPERACION (%)
10	2.0	1.9 1.9 $\bar{x} = 1.9$	95.00
20	4.0	4.2 4.5 $\bar{x} = 4.35$	94.50
30	5.1	4.9 5.0 $\bar{x} = 4.95$	97.00
40	6.5	6.3 6.5 $\bar{x} = 6.4$	<u>98.00</u> $\bar{x} = 96.37$

\* Tratado de igual manera que los problemas.

## 7.2 Resultados del estudio

En el cuadro 4 se puede observar que la concentración plasmática del ácido ascórbico fue menor en el grupo sometido a un trauma mayor (grupo B); en estos niños los promedios variaron (en mg/dL), entre 0.18 en el preoperatorio y 0.14 a las 72 h de la intervención. Mientras tanto, el grupo A registró un promedio de 0.38 en el preoperatorio, 0.45 a las 24 h y 0.30 a los 7 días; estos promedios representan, aproximadamente, una concentración tres veces más alta que en el grupo B. A pesar de esta notoria divergencia, al comparar las concentraciones de uno y otro grupo en cada uno de los lapsos de estudio, sólo a las 24 h hubo una diferencia estadísticamente significativa: el valor de  $z$ , obtenido a partir de la  $U$  de Mann - Whitney, fue de 2.20 ( $p < 0.05$ ). Por otro lado, al estimar la significación del cambio ocurrido después de la intervención, tomando como cifra basal la del preoperatorio, en ninguno de los dos grupos se registraron diferencias significativas.

Si bien en el grupo A los cambios en la concentración del ácido ascórbico en los leucocitos (expresados en  $\mu\text{g}/10^8$  cél), no fueron estadísticamente significativos a las 24 h y a los 7 días, en el grupo B las diferencias

CUADRO 4

CONCENTRACION PLASMATICA DE ACIDO ASCORBICO (mg/dL) EN NIÑOS SOMETIDOS  
A TRAUMA QUIRURGICO

	GRUPO A				Valor de t	GRUPO B				Valor de t
	n	"Rango"	$\bar{X}$	( $\pm s$ )		n	"Rango"	$\bar{X}$	( $\pm s$ )	
Preoperatorio	8	0.13-0.73	0.38	(0.20)	-	12	0.03-0.48	0.16	(0.14)	-
A las 24 h	7	0.11-0.98	0.45	(0.27)	0.79	12	0.03-0.34	0.15	(0.09)	0.62
A las 72 h	-	-	-	-	-	10	0.08-0.24	0.14	(0.05)	0.14
A los 7 días	8	0.10-0.86	0.30	(0.24)	0.88	12	0.08-0.34	0.18	(0.08)	0.12

fueron significativas a las 24 h y a las 72 h de la intervención quirúrgica. En el cuadro 5 se aprecia cómo los promedios descendieron desde 10.70 en el preoperatorio a 5.13 y 3.95, a las 24 h y 72 h respectivamente; a los 7 días el promedio se elevó a 7.79 desapareciendo la significación estadística. También en la concentración de ácido ascórbico en los leucocitos hubo notorias discrepancias entre ambos grupos; en el grupo A las cifras variaron entre 16.91 y 23.60, mientras que en el grupo B la concentración más alta fue de 10.70 en el preoperatorio, descendiendo a 3.95 a las 72 h. Las diferencias al contrastar las cifras obtenidas en ambos grupos fueron significativas a las 24 h ( $z = 2.70, p < 0.01$ ) y a los 7 días ( $z = -3.00, p < 0.01$ ).

En la figura 3 se puede ver que la concentración plasmática de ácido ascórbico se mantuvo estable en el grupo B, mientras que hubo un decremento de esta vitamina en los leucocitos. Entre tanto, en el grupo A la disminución en los leucocitos fue de menor magnitud; en este grupo el promedio a los 7 días fue más alto.

En las figuras 4 y 5 se presentan gráficamente los cambios relativos en la concentración de ácido ascórbico en el plasma y en los leucocitos, tomando como referencia

CUADRO 5

CONCENTRACION DE ACIDO ASCORBICO EN LOS LEUCOCITOS ( $\mu\text{g}/10^8$  LEUCOCITOS)  
DE NIROS SOMETIDOS A TRAUMA QUIRURGICO

	GRUPO A				Valor de t	GRUPO B				Valor de t
	n	"Rango"	$\bar{X}$	(+s)		n	"Rango"	$\bar{X}$	(+s)	
Preoperatorio	8	6.56-25.86	16.91	(6.11)	-	12	2.12-30.12	10.70	(8.77)	-
A las 24 h	7	10.27-36.47	17.15	(8.78)	0.51	12	1.08-25.27	5.13	(6.94)	3.17*
A las 72 h	-	-	-	-	-	10	1.23-12.24	3.95	(3.04)	2.42**
A los 7 días	8	17.48-36.10	23.60	(6.95)	2.33	12	2.76-31.59	7.79	(8.39)	1.25

\*  $p < 0.01$  (t para muestras dependientes)

\*\*  $p < 0.05$

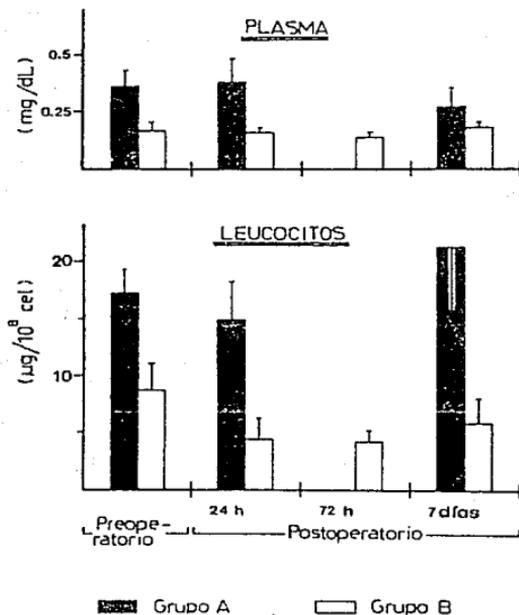


Figura 3 Concentración del ácido ascórbico en el plasma y en los leucocitos, durante el experimento. Nótese la relativa estabilidad en las cifras registradas en el plasma y los cambios que ocurrieron en los leucocitos, particularmente en el grupo B.

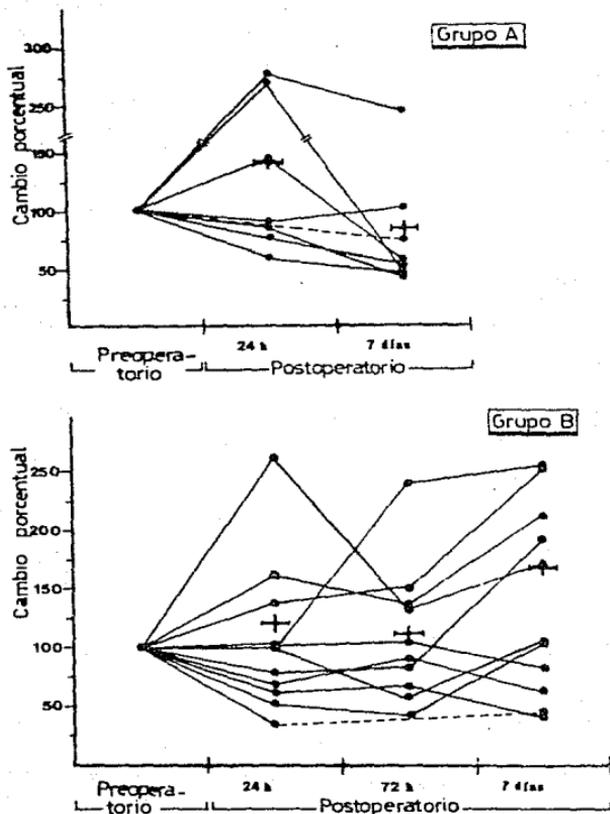


Figura 4 Cambio porcentual de la concentración del ácido ascórbico en el plasma, ocurrido en ambos grupos, según la cifra de este compuesto en el preoperatorio.

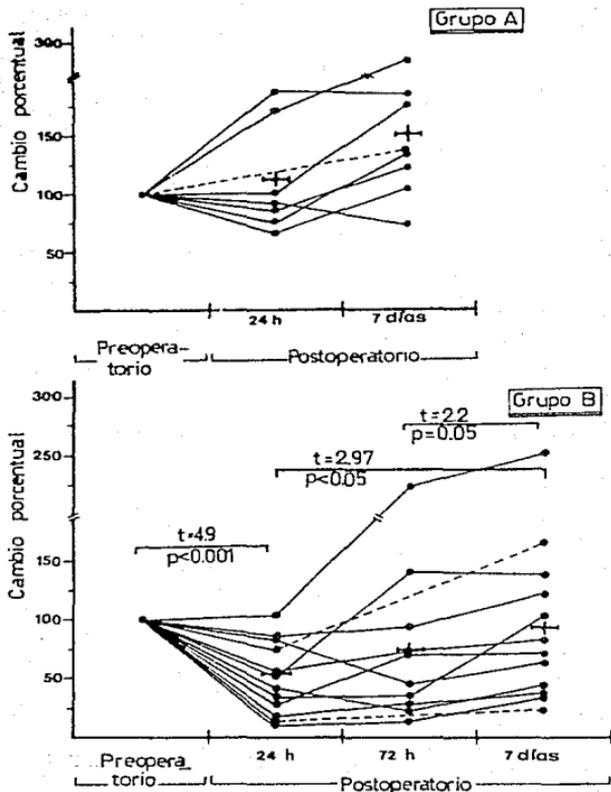


Figura 5 Cambio porcentual de la concentración del ácido ascórbico en los leucocitos, ocurrido en ambos grupos, según la cifra de este compuesto durante el preoperatorio.

(100 %) las cifras del preoperatorio; en ambos grupos la concentración plasmática a las 24 h de la operación, mostró que en la mayoría de los casos hubo cierto decremento, o al menos la cifra de ácido ascórbico permaneció estable; sin embargo algunos niños registraron aumento. Si bien en el grupo B ciertos niños mantuvieron hasta los 7 días el incremento porcentual registrado a las 24 h, en el grupo A sólo un niño mantuvo a los 7 días el incremento inicial. Un cambio más uniforme se observó en la concentración de esta vitamina en los leucocitos. Mientras en el grupo B hubo un decremento generalizado, hasta una cifra extrema del 10 %, sólo uno de los niños tuvo desde las 24 h cifras más altas que en el preoperatorio. En el grupo A, 5 de los 8 niños tuvieron decremento a las 24 h, pero de ellos el más afectado disminuyó a 65.6 %.

Es conveniente hacer notar que en el grupo B la disminución a las 24 h fue altamente significativa ( $p < 0.001$ ); lo mismo sucedió al contrastar los cambios cuantitativos que se suscitaron entre las 24 h y los 7 días ( $p < 0.05$ ); la magnitud del cambio entre las 72 h y los 7 días dió un valor de "t" (para muestras pareadas) que cae justamente en el nivel de significación de 0.05.

Con el objeto de conocer si los niveles de ácido as

córbico en el plasma y la concentración de éste en los leucocitos mantenían cierta relación causal, en el cuadro 6 se presentan los coeficientes de correlación y las pendientes de regresión de la línea recta; sólo en el preoperatorio del grupo B, el coeficiente alcanzó significación estadística a nivel de 5 % ( $r = 0.59$ ). La magnitud de las pendientes disminuyó desde 0.019 en el preoperatorio a 0.002 a las 72 h y 7 días; una cifra igual a esta última se obtuvo en el grupo A durante el preoperatorio y los 7 días. Los datos permiten señalar que las cifras de ácido ascórbico en el plasma y en los leucocitos no mostraron tener relación.

CUADRO 6

VALOR DE LAS PENDIENTES OBTENIDAS AL CORRELACIONAR LA  
CONCENTRACION PLASMÁTICA DE VITAMINA C CON RESPECTO  
A LA OBTENIDA EN LOS LEUCOCITOS

	GRUPO A		GRUPO B	
	b*	r**	b*	r**
Preoperatorio	0.002	0.03	0.019	0.59
A las 24 h	0.011	0.17	0.011	0.41
A las 72 h	-	-	0.002	0.05
A los 7 días	0.002	0.03	0.002	0.09

\* Pendiente al calcular la ecuación de la línea recta

\*\* Coeficiente de correlación.

## 8.0 DISCUSION DE RESULTADOS

Considerando los criterios para valorar los niveles del ácido ascórbico en el plasma, sugeridos por el Comité Interdepartamental de Nutrición para la Defensa Nacional de los Estados Unidos de Norteamérica (ICNND, USA), y las cifras propuestas por Hodges (1), después de analizar los informes de diversos autores sobre la concentración de esta vitamina en los leucocitos, en el cuadro 7 se puede ver que las cifras registradas en el grupo B fueron significativamente más bajas; los valores de "p", calculados mediante el método de las Probabilidades Exactas de Fisher, son altamente significativos. Cabe hacer notar que desde el preoperatorio las cifras de ácido ascórbico fueron deficientes o bajas en 8 de los 12 niños del grupo B y en sólo 1 de los 8 niños del grupo A. Por otro lado, a las 24 h de la intervención y a los 7 días de ésta, 10 de los niños del grupo B tenían en los leucocitos una concentración de ácido ascórbico deficiente o baja, es decir menor de  $10 \mu\text{g}/10^8$  cél.

Al comparar estos resultados se puede considerar que la disminución durante el postoperatorio en la con--

CUADRO 7

VALORACION DE LOS NIVELES DE ACIDO ASCORBICO REGISTRADOS DURANTE  
EL ESTUDIO EN AMBOS GRUPOS DE NIÑOS

	PLASMA*			LEUCOCITOS**		
	Deficiente o bajo	Aceptable o alto	Valor de p	Deficiente o bajo	Aceptable o alto	Valor de p
<u>Preoperatorio</u>						
Grupo A	1	7		1	7	
Grupo B	0	4	0.32	0	4	0.02
<u>A las 24 h</u>						
Grupo A	1	6		0	7	
Grupo B	0	3	0.01	10	2	0.0007
<u>A los 7 días</u>						
Grupo A	1	7		0	6	
Grupo B	7	5	0.05	10	2	0.0003

\* Interdepartmental Committee on Nutrition for National Defense (ICNND): Manual for Nutrition Surveys, 2a ed. Bethesda: ICNND, National Institutes of Health; 1963:225.  
En  $\mu\text{g/dl}$ ; Deficiente:  $< 0.1$ , bajo:  $0.1-0.19$ , Aceptable:  $0.20-0.35$  y Alto:  $> 0.40$ .

\*\* De acuerdo a los criterios de Hodges 45. (Referencia 1).  
En  $\mu\text{g}/10^3$  células; Deficiente:  $< 2$ , bajo:  $2-10$ , Aceptable:  $11-15$  y Alto:  $> 15$ .

centración del ácido ascórbico en los leucocitos observada en el presente estudio, puede ser debida a un incremento en los requerimientos de esta vitamina durante el trauma quirúrgico, como lo sugieren algunos autores (28). Los hallazgos confirman las observaciones hechas en adultos (28-30), sin embargo adquieren aun mayor trascendencia, debido a que la mayoría de los niños sometidos a un trauma quirúrgico "mayor", registraron desde el preoperatorio niveles deficientes o bajos.

Las experiencias de Irvin y Col. (30) parecen indicar que la reducción en la concentración del ácido ascórbico, no está asociada a la severidad del trauma, ni con el volumen de sangre transfundido, como fue propuesto por McGinn y Hamilton (29). Estos investigadores encontraron una correlación inversa entre la cantidad de esta vitamina en los leucocitos y el número de estas células circulando en el torrente sanguíneo, concluyeron en que la leucocitosis consecutiva al trauma quirúrgico ocurre a expensas de la liberación de leucocitos que tienen concentraciones bajas de ácido ascórbico. Otros autores (38), estudiando pacientes con infarto al miocardio, coinciden con esta idea, naciendo notar que los polimorfonucleares tienen una concentración intermedia entre las cifras registradas en los linfocitos y las plaquetas. En el presen

te estudio el análisis orientado en este sentido, no permitió confirmar tal presunción.

El almacenamiento del ácido ascórbico en los leucocitos, ocurre activamente en presencia del ión ferroso (39); la captación se realiza después de que los eritrocitos transforman el ácido dehidro-ascórbico en ácido ascórbico y lo liberan hacia el plasma (40). En base a esta observación puede considerarse al ácido ascórbico como un componente lábil de la sangre, en cuanto a su concentración en el plasma o en los leucocitos.

Se ha observado que los niveles en el plasma y en los leucocitos son indicadores bastante confiables de la ingesta de esta vitamina (41). En este sentido llama la atención que 8 de los 12 niños, integrantes del grupo B, tuvieran antes de la intervención cifras deficientes o bajas, tanto en los leucocitos como en el plasma, tal parece que el consumo de esta vitamina en la dieta de algunos de ellos, era insuficiente para cubrir la demanda generada por la enfermedad que motivó la intervención.

En niños menores de 3 años, de la población que asiste al mismo hospital, se ha encontrado cierta variación -

estacional en la concentración plasmática del ácido ascórbico (42); sin embargo, en el informe citado, sólo un lactante registró una cifra deficiente. Por otro lado, en niños con desnutrición grave, la concentración sanguínea de este nutrimento parece variar dentro de cifras normales, pero la respuesta que se obtiene a una carga de vitamina, es compatible en muchos de ellos con escasas reservas de este nutrimento (43).

Si bien el ácido ascórbico en los leucocitos es un indicador de las reservas de esta vitamina en otros tejidos, es importante conocer los niveles en el plasma, porque de ellos depende la disponibilidad de este compuesto para su distribución en los tejidos de reserva y en sentido eferente, para su utilización en los sistemas metabólicos (44). La disminución del ácido ascórbico en los leucocitos de los niños del grupo B, 24 h después de la intervención, se debió, probablemente, al incremento de las demandas de esta vitamina durante el trauma quirúrgico; cabe suponer que la concentración en los leucocitos disminuya para mantener el nivel homeostático que asegure su adecuada distribución ante el incremento de la demanda. Por otro lado, parece lógico suponer que a mayor trauma y a menores reservas de esa vitamina, el problema es más evidente; tal vez este razonamiento explica

el motivo por el cual en los niños sujetos a un trauma quirúrgico menor, no hubo cambios significativos en los niveles plasmáticos ni en los leucocitos; en cambio, en los niños sometidos a un trauma mayor, fue notoria la disminución en la concentración registrada en las células, mientras que en el plasma no hubo cambios significativos

La participación del ácido ascórbico en la síntesis de la sustancia colágena dentro del fibroblasto (1), permite especular acerca de las consecuencias de una eventual disminución en la disponibilidad de esta vitamina, en pacientes sometidos a una intervención quirúrgica. Es razonable suponer que para la reparación de las estructuras anatómicas dañadas durante el acto quirúrgico, es preciso que esta vitamina esté presente en cantidades que permitan cubrir una mayor demanda de ella.

Si bien en estudios realizados en voluntarios humanos sometidos a dietas libres de ácido ascórbico (45--46), no se investigó la cicatrización de los tejidos, la aparición de hemorragias petequiales, subconjuntivales y de las encías en las personas bajo estudio, traduce alteraciones en las estructuras vasculares que dependen de la colágena, la cual participa en el proceso de cicatrización. A este respecto, Crandon y Col. (26) tuvieron espe--

cial interés en investigar el significado clínico de la disminución del ácido ascórbico, durante el postoperatorio; estos autores pudieron constatar que 19 de 47 pacientes con dehiscencia en los bordes de la herida quirúrgica, tenían en el plasma niveles muy bajos, comparables a los observados en enfermos atendidos por escorbuto en el mismo hospital,

Por otro lado, valorando el estado de nutrición de personas sometidas a operaciones quirúrgicas, se ha observado que el ácido ascórbico y la vitamina B<sub>2</sub> están particularmente disminuidos entre los pacientes sometidos a cirugía mayor (47), los autores encontraron que la concentración de ácido ascórbico en los leucocitos, disminuyó de 22.5  $\mu\text{g}/10^8$  cél en el preoperatorio, a 12.5  $\mu\text{g}/10^8$  cél después de 7 días; estas cifras permiten suponer que en algunos enfermos la concentración descendió a niveles deficientes o bajos ( $< 10 \mu\text{g}/10^8$  cél). No obstante, en la mayoría de los pacientes adultos no se han registrado las concentraciones que se observaron en el presente estudio especialmente entre aquellos sometidos a un trauma operatorio mayor, donde los niveles fueron bajos o francamente deficientes en 10 de 12 niños.

Si bien queda por probar que la disminución en la -

concentración de ácido ascórbico tiene cierto significado clínico, mientras se obtiene información a este respecto, es conveniente adoptar una conducta precautoria. Con la experiencia obtenida en adultos y con los resultados obtenidos en la presente investigación, se reafirma la convicción de que todo niño sometido a un acto quirúrgico debe recibir un complemento generoso de ácido ascórbico.

Tomando en cuenta la concentración del ácido ascórbico en la leche humana, se puede estimar que a las 6 semanas los lactantes reciben 7 mg por cada decilitro de leche que ingieren, mientras que los niños alimentados con fórmulas comerciales reciben un aporte de 5.3 mg por decilitro (48).

Con estos datos se puede esperar que a las 6 semanas de vida un niño lactado artificialmente recibirá 30 mg de esta vitamina cada 24 h. Esta cifra es muy parecida a la de 35 mg recomendada diariamente durante los 6 primeros meses de la vida (11).

Aceptando que durante el trauma quirúrgico la disminución en la concentración del ácido ascórbico en los leucocitos, origina una mayor demanda de esta vitamina, pa

reco-lógico-recomendar que los niños sometidos a un acto operatorio reciban diariamente entre 100 y 200 mg de vitamina C, tal cantidad es de tres a cinco veces la recomendación diaria sugerida para niños menores de 5 años - (11).

Hasta hace pocos años la vitamina C había sido analizada por el método titrimétrico del 2,6-diclorofenol - indofenol (47) y el fluorométrico, así como por el procedimiento colorimétrico basado en la medición de la 2,4--dinitrofenilhidrazona del ácido dehidroascórbico (50). Otras técnicas tales como la espectroscopía indirecta - (51) y la cromatografía de gases (52) han sido también reportadas. Sin embargo, cada uno de estos métodos está limitado por un gran número de sustancias que pueden interferir en la determinación y que se encuentran usualmente en muestras biológicas; o bien debido a que los procedimientos para la obtención y preparación de las muestras son tan laboriosos que no pueden ser empleados como técnicas de rutina, como en el caso de las técnicas microbiológicas (49).

En la actualidad, en un intento por desarrollar un método rápido y exacto para el análisis de vitaminas hidrosolubles, como la vitamina C, se han investigado los

procedimientos de cromatografía de líquidos de alta resolución. En el caso particular de la vitamina C, este es un método bastante apropiado ya que las características del ácido ascórbico en cuanto a carácter iónico y absorptividad permiten adecuarlo efectivamente para su análisis; así mismo, en el análisis de muestras biológicas, esta vitamina se encuentra en concentraciones relativamente altas respecto a otras vitaminas hidrosolubles con lo que la probable interferencia se reduce considerablemente.

Respecto a la valoración del método cromatográfico empleado para la estimación del ácido ascórbico, se observa que los parámetros de linealidad, reproducibilidad y "recuperación" son bastante aceptables, por lo que este procedimiento, cuando se cuente con el equipo necesario, puede ser ampliamente usado para la determinación de vitamina C en muestras biológicas.

El descenso en la concentración del ácido ascórbico registrada en los leucocitos, fue más evidente a las 24 h de la intervención quirúrgica habiendo disminuído en uno de los grupos de estudio hasta una cifra equivalente al 10 % de la obtenida en el preoperatorio; a partir de este valor la concentración aumentó hasta alcanzar, aproximadamente, el nivel inicial.

Los niveles de ácido ascórbico en el plasma de los niños sometidos a un trauma "mayor" se mantuvieron más o menos estables, mientras que en los leucocitos, donde esta vitamina se encuentra como reserva, hubo una franca disminución; este fenómeno es debido a la movilización de la vitamina de los leucocitos hacia el plasma.

## 10.0 RECOMENDACIONES

Aun cuando queda por dilucidar el significado clínico del descenso en la concentración de Vitamina C en los leucocitos, es conveniente sugerir que los niños sometidos a un trauma quirúrgico reciban un suplemento de 100 a 200 mg diarios de esta vitamina. Tal recomendación es particularmente deseable en los niños sujetos a un trauma quirúrgico "mayor" y en aquellos infantes que cursen con alguna enfermedad hipercatabólica que exige una mayor demanda de ácido ascórbico.

Respecto a la técnica empleada para la determinación de ácido ascórbico en sangre, las características de esta vitamina y los resultados obtenidos en cuanto a la valoración, permiten considerarla como un método rápido y exacto para la medición de ácido ascórbico en muestras biológicas.

11.0 REFERENCIAS

1.- Hodges RS: Ascorbic Acid. En: Goodhart RS, Shils ME: Modern Nutrition in Health and Disease, 6ª ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 1980; 259-273.

2.- Fox BA, Cameron AG: Food Science, a chemical approach, 2ª ed. Londres: University of London Press, 1970; 263-272.

3.- Fisher P, Bender A: Valor nutritivo de los alimentos. México: LIMUSA/WILEY, 1972; 52-68.

4.- Antia FP: Clinical dietetics and nutrition, 2ª ed. Londres: Oxford University Press, 1973; 115-121.

5.- Davidson S, Passmore R, Brock JF, Truswell AS: Human nutrition and dietetics. Edinburgo: Churchill Livingstone, 1979; 129-135.

6.- Green HL: Disorders of the water soluble vitamin B-complex and C. En: Suskind RM: Textbook of Pediatric Nutrition. New York, Raven Press, 1981; 128-131.

7.- McLaren DS: Vitamin deficiency, toxicity and dependency. En: Textbook of Pediatric Nutrition. Edinburgo: Churchill Livingstone, 1976; 168-172.

8.- Woodruff C: Infantil scurvy. The increasing incidence of scurvy in the Nashville area. JAMA, 1956; 161: 448-450.

9.- Junkes TH: Further comments on the ascorbic acid requirements. Proc Nat Acad Sci, 1975; 72: 4151-4152.

10.- Medical Research Council: Vitamin-C requirement of human adults. Lancet, 1948; 1: 853-855.

11.- National Research Council: Recommended Dietary Allowances, 6a ed. Washington: National Academy of Sciences 1964; 38-39.

12.- FAO/WHO Expert Group: Requirements of ascorbic acid, vitamin B<sub>12</sub>, folate and iron. Wld Hlth Org techn Rep Serv, 1970; 1°452.

13.- National Research Council: Recommended Dietary Allowances, 9a. ed. Washington: National Academy of Sciences, 1980; 72-82.

14.- Hume R, Weyers E: Changes in leucocyte ascorbic acid during the common cold. Scott Med J 1973;18:3. Cita- do por Destro RL, Sharma V: Clin Pediatr (Phila) 1977;16: 936-939.

15.- Pauling L: Ascorbic acid and the common cold. Am J Clin Nutr, 1971;24:1294-1299.

16.- Coulehan LJ, Reisinger SK, Rogers DK, Bradley WD: Vitamin C prophylaxis in a boarding school. N Engl J Med 1974;290:6-10.

17.- Rebora A, Dallegri F, Patrone F: Neutrophil - dysfunction and repeated infections: influence of levami- sole and ascorbic acid. Br J Dermatol, 1980;102:49-56.

18.- Coulehan LJ, Eberhard S, Kapner L, et al: Vitamin C and acute illness in Navajo schoolchildren. N Engl J Med, 1976;295:973-977.

19.- Holborow PL: Ascorbic acid, dietary restriction and upper respiratory tract infection. Pediatrics, 1980; 65:1191-1192.

20.- Schwatz RA, Togo Y, Hormic BR, Tomonaga S, Gleckman AR: Evaluation of the efficacy of ascorbic acid in prophylaxis of induced Rhinovirus 44 infection in man. - J Infect Dis, 1973; 120: 506-508.

21.- Destro LR, Sharma V: An appraisal of vitamin C in adjunct therapy of bacterial and "viral" meningitis. Clin Pediatr (Phila), 1977; 10: 936-939.

22.- Esposito LA: Ascorbate modulates antibacterial mechanisms in experimental pneumococcal pneumonia. Am Rev Respir Dis, 1986; 133: 643-647.

23.- Anthony E, Kurahara GC, Taylor BK: Cell-mediated cytotoxicity and humoral immune response in ascorbic acid-deficient guinea pigs. Am J Clin Nutr, 1979; 32: 1691-1698.

24.- Fraser CR, Pavlovic S, Kurahara GC, et al: The effect of variations in vitamin C intake on the cellular immune response of guinea pigs. Am J Clin Nutr, 1976; 33: 839-847.

25.- Anderson R, Oosthuizen R, Maritz R, Theron A, Van Rensburg AJ: The effects of increasing weekly doses of

ascorbate on certain cellular and humoral immune functions in normal volunteers. Am J Clin Nutr,1980;33:71-76.

26.- Vallance S: Relationships between ascorbic acid and serum proteins of the immune system. Br Med J,1977;  
2:437-438.

27.- Lloyd E LL,Edge EG: Leucocyte ascorbic acid levels in patients with multiple injuries. Brit J Anaesth,1973;45:532.

28.- Crandon HJ,Landau B,Mikal S,et al: Ascorbic acid economy in surgical patients as indicated by blood ascorbic acid levels. N Engl J Med,1958;256:105-113.

29.- McGinn FP,Hamilton JC: Ascorbic acid levels in stored blood and in patients undergoing surgery after blood transfusion. Br J Surg,1976;63:505-507.

30.- Irvin TT,Chattopadhyay XD,Smythe A: Ascorbic acid requirements in postoperative patients. Surg Gynecol Obstet,1978;117:49-55.

31.- Gómez F: Desnutrición. Bol Med Hosp Infant MEx, 1946;3:543-551.

32.- Ramos Galván R: Somatometría Pediátrica. Arch -  
Inv Méd (Méx), 1975; 6: Supl 1.

33.- Lee W, Hamerynk P, Hutchinson M, Raisys V: Ascorbic acid in lymphocytes: cells preparation and liquid chromatographic assay. Clin Chem, 1982; 28: 2165-2169.

34.- Benson KW: The determination of ascorbic acid - in white blood cells. A comparison of WBC, ascorbic acid - and pantoic acid excretion in elderly patients. Clin -  
Sci, 1961; 21: 157-162.

35.- Cartwright GE: El laboratorio en el diagnóstico hematológico. Barcelona: Editorial Científico Médica, 1973; 47-55.

36.- Moroney MJ: Facts from figures. 3a ed. Baltimore: Penguin books, 1962; 227-233.

37.- Sigel S: Nonparametric Statistics, (International Students Edition). Tokio: Kogakusha Co. (McGraw Hill Book Co.) 1968; 116-127.

38.- Vallance JB, Hume R: Vitamin C and surgical - trauma. Br Med J, 1979; 1: 955.

39.- Loh HS, Wilson CWM: Relationships between leucocyte ascorbic acid and plasma iron. Br J Pharmacol, 1970; 40:566-567.

40.- Loh HS, Wilson CWM: The origin of ascorbic acid stored in leucocytes. Br J Pharmacol, 1970; 40:169-170.

41.- Jacob RA, Skala JH, Gmayer ST: biochemical indices of human vitamin C status. Am J Clin Nutr, 1978; 40:818-826.

42.- Vega Franco L, De León BS, Ijeza CC: Variación estacional en la concentración de ácido ascórbico en niños de la Ciudad de México. Bol Med Hosp Infant Méx, 1976; 35:1141-1145.

43.- Vega Franco L, Acevedo CJ, Meza CC: Tolerancia a la vitamina C en niños desnutridos. Bol Med Hosp Infant Méx, 1973; 32:1131-1140.

44.- Loh HS, Wilson CWM: Relationship between leucocyte and plasma ascorbic acid concentration. Br Med J, 1971; 3:733-735.

45.- Medical Research Council: Vitamin C requirement of human adults. Lancet,1948;1:853-858.

46.- Hodges Re,Hood J,Cannham JE y col: Clinical manifestations of ascorbic acid deficiency in man. Am J Clin Nutr,1971;24:432-443.

47.- Hill GL,Blackett RI,Pickford I y col: Malnutrition in surgical patients. Lancet,1977;1:689-692.

48.- Vega Franco L,Arzuaga RMF,Reza CC y col: Concentración de vitamina C en la fase final del embarazo y en la etapa temprana de la lactancia. Bol Med Hosp Infant - Méx,1965;42:92-96.

49.- AOAC,Official Methods of Analysis,11 ed.Washington D.D.,1970;777.

50.- Roe HS,Mills MB,Cesterling J: The determination of diketo-L-gulonic acid,dehydroascorbic acid and L-ascorbic acid in the same tissue extract by the 2,4-dinitrophenylhydrazine method. J Biol Chem,1948;174:201.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

51.- Jaselkis B, Helapaty J: Spectrophotometric -  
determination of micro amounts of ascorbic acid in citric  
fruits. Anal Chem, 1972; 44: 379.

52.- Senello LT, Argoudelis CJ: A gas chromatographic  
procedure for the determination of pyridoxine, ascorbic -  
acid and nicotinamide vitamin capsules and tablets. Anal  
Chem, 1969; 41: 171.

## 12.0 ANEXOS

### 11.1 Preparación de reactivos

#### 11.11 Soluciones para cromatografía

##### 1.- Diluyente para sangre

- Sol. A: Solución salina fisiológica al 0.85 %: Pesar 0.85 g de cloruro de sodio (J. T. Baker, Xalostoc, Edo. Méx.), disolverlos y aforar a 100 mL con agua destilada estéril para irrigación (Laboratorios PISA, Guadalajara México).

Nota: Si las soluciones no se preparan con agua estéril para irrigación, deberán filtrarse con filtros Millipore de 45  $\mu$ m (Millipore Corporation, Bedford, Mass.).

- Sol. B: Solución de dextrán al 6 %: Pesar y disolver 3 g de dextrán T-500 (Farmacia Fine Chemicals AB Uppsala, Sweden) en 50 mL de agua destilada.

- Sol. C: Solución de EDTA al 10 %: Pesar 1 g de EDTA sódico (Eastman Organic Chemicals, Rochester, N. Y.), disolverlo y aforar a 10 mL con agua estéril.

Mezclar 200 mL de la Sol. A con 50 mL de la Sol. B y 2 mL de la Sol. C.

##### 2.- Solución salina amortiguadora de fosfatos

- Sol. 0.01 de fosfatos en solución salina, -

pH = 7: Pesar 0.45 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (J. T. Baker Chemical Co., Phillipsburg, N. Y.), 1.8 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (J.T. Baker Chemical Co.) y 7.4 g de  $\text{NaCl}$ , disolverlos en 900 mL de agua estéril, ajustar el pH a 7 con  $\text{H}_3\text{PO}_4$  o  $\text{NaOH}$  diluidos, aforar a 1000 mL con agua.

3.- Solución de ácido perclórico 50 mM

Diluir 4.3 mL de  $\text{HClO}_4$  concentrado, densidad 1.67 g/mL, pureza 70 % (E. Merck, Darmstad, Alemania) y aforar a 1000 mL con agua destilada.

4.- Solución de ácido perclórico 0.35 M

Diluir 5 mL de  $\text{HClO}_4$  concentrado y aforar a 100 mL con agua destilada.

5.- Solución patrón de ácido ascórbico

Pesar 100 mg de ácido L-(+)-ascórbico, pureza - 99.7 % (E. Merck, Darmstad, Alemania), disolverlos y aforar a 100 mL con solución de ácido perclórico 50 mM. Esta solución es poco estable aun en refrigeración.

6.- Fase móvil: Solución amortiguadora de fosfatos - 0.003 M más 23 % de metanol más 5 mL de hidróxido de tetrabutilamonio, pH = 4.5

- Sol. A: Pesar 0.4083 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  anhidro (J.T. Baker Chemical Co.), disolverlos y aforar a 1000 mL con agua estéril.

- Sol. B: Diluir 1 mL de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (J. T. Baker) en 100 mL de agua estéril.

A 700 mL de la Sol. A adicionarle 230 mL de metanol absoluto (Photrex Reactivo para Espectroscopía, J. T. Baker) y disolver en esta mezcla 1.5 g de hidróxido de tetrabutylamonio (Sigma Chemical Co., St Louis Mo.). Ajustar el pH a 4.5 por adición de la Sol. B, aproximadamente 14-15 mL. Aforar a 1000 mL con la Sol. A.

7.- Solución salina fisiológica 0.85 %

Pesar 8.5 g de NaCl anhidro, disolverlos y aforar a 1000 mL con agua destilada estéril.

8.- Solución de carbonato de sodio 0.13 M

Pesar 1.37 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (J. T. Baker), disolverlos y aforar a 100 mL con agua destilada estéril.

9.- Solución de carbonato de sodio 0.05 M

Pesar 0.53 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , disolverlos y aforar a 100 mL con agua estéril.

11.12 Reactivos para la cuenta de leucocitos

1.- Líquido de Turk

- Sol. A: Solución de violeta de genciana al 1 %  
Pesar 100 mg de violeta de genciana, disolver y aforar a 10 mL con agua destilada.

Mezclar 1 mL de la Sol. A con 3 mL de ácido acético glacial (Merck de México) y aforar a 100 mL con agua destilada.

### 11.2 Material de laboratorio

- Tubos cónicos para centrifuga de 15 mL
- Tubos de ensaye de vidrio de 13 x100, 12 x 75 y 15 x 100
- Tubos de ensaye de plástico con tapón
- Pipetas graduadas de 1, 2, 5 y 10 mL
- Pipetas volumétricas de 1 y 5 mL
- Vasos de precipitados de 20, 50, 100 y 1000 mL
- Matraces aforados de 10, 25, 50, 100, 1000 y 2000 mL
- Probetas graduadas de 50, 100 y 500 mL
- Pipetas Pasteur con bulbo
- Pipetores automáticos de 5, 10, 20, 25, 50 y 100  $\mu$ L
- Embudo de vidrio
- Pipeta de Thoma para glóbulos blancos
- Cámara de Neubauer
- Gradilla para tubos de ensaye
- Puntas desechables para pipetores
- Jeringas desechables, torundas con alcohol, gasas, tela adhesiva, maskin tape

### 11.3 Equipo de laboratorio

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Perkin Elmer, modelo Series 2/2 equipado con dos bombas recíprocas e independientes con rango de flujo de 0.1 a 29.9 -

mL/min y límite de presión de 41.4 a 43.4 mPa, Perkin Elmer Corp., Norwalk Conn., columna de acero inoxidable de 25 cm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno, empacada con ODS (octadecilsilano) unida a sílica, tamaño de partícula de 10  $\mu$ m, Perkin Elmer 0256-0184, Perkin Elmer Corp.

- Inyector de muestras Rheodyne, modelo 7105, "loop" de 175  $\mu$ L, Rheodyne Co., Berkeley, Cal.

- Detector espectrofotométrico para cromatografía Perkin Elmer, modelo LC-75, Perkin Elmer Corp.

- Centrífuga International, modelo Cs, International Equipment Co., Needham Hts., Mass.

- Espectrofotómetro Coleman Junior II A, modelo 6/20 A, Coleman Instruments, Maywood, Ill.

- Balanza granataria Ohaus, modelo Harvard Trip, Ohaus Scale Corp., Union, N. J.

- Microscopio óptico Carl-Zeiss, modelo LKTL, Carl-Zeiss Corp., Germany.

- Agitador de tubos, modelo Super Mixer 19973, Curtin Scientifics Co., Houston, Texas.

- Contador de células, modelo 50188, Cly Adams Inc., N. Y.

- Ultracentrífuga con refrigeración Sorvall, modelo 06852 Ivan Sorvall Inc., Norwalk, Conn.

- Balanza analítica Mettler, modelo H6T, Hoffmann-Pinther & Bosworth, Switzerland.

- Potenciómetro Beckman Expandomatic, Beckman Instruments Inc., Fullerton, Ca.
- Registrador Perkin Elmer, modelo 023, Perkin Elmer Corp.
- Cronómetro General Electric, modelo 1134, General Electric Co., Chicago, Ill.
- Regulador electrónico de voltaje, modelo R1 5101, Promisa Industronic, México.
- Microjeringas Hamilton, modelos 710-N y 701-N de 10 y 100 uL, Hamilton Company, Reno, Nevada.
- Jeringa de alta presión Hamilton, modelo HP-1805 de 50 uL, Hamilton Company
- Regulador de voltaje Sola, modelo CVH, Industrias Sola-Basic S. A., México.