

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE QUIMICA

La Comparación de Métodos Colorimétricos y  
Ultravioleta, para la Cuantificación de  
Triglicéridos en Suero

28

T E S I S  
Q U E P A R A O B T E N E R  
E L T I T U L O D E :  
Q U I M I C O F A R M A C E U T I C O B I O L O G O  
P R E S E N T A  
R I C A R D O A V I L A V A L D E Z



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.

CLAS. Tesis  
ADQ. 1974  
FECHA 1974  
PRCC. M1225



Para aquellos que con sus sacrificios, consejos y comprensión amor y ternura, y sin esperar otra recompensa, que la íntima satisfacción de ver coronadas mis ilusiones y esfuerzos con - los míos, hicieron posible la culminación de esta etapa de - mi vida.

Mis Padres:

ERNESTO AVILA SOSA.

RAQUEL VALDEZ DE AVILA.

A mis Hermanos:

SUSANA, ERNESTO, VICTOR M., ESTHER,

ANTONIO, ROLANDO, ROBERTO, RAQUEL.

Agradezco infinitamente su inmensa ayuda y colaboración especial, para el desarrollo de este trabajo a la maestra:

DEA CORONADO.

Así como: a todas aquellas personas, maestros, familiares, amigos, que en una u otra forma contribuyeron a la feliz terminación de mi carrera.

RICARDO AVILA V.

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA:

PRESIDENTE	GUADALUPE VELEZ
VOCAL	DEA CORONADO PERDOMO
SECRETARIO	MARIA ELENA BUSTAMANTE
1er. SUPLENTE	MARIO MIRANDA CASTRO
2do. SUPLENTE	ALFREDO GARZON SERRA

Sitio donde se desarrolló el tema:

LAB. HOSPITAL FERROCARRIL DGO.

Nombre completo y firma del Sustentante:

RICARDO AVILA VALDEZ \_\_\_\_\_

Nombre completo y firma del asesor del tema:

DEA CORONADO \_\_\_\_\_

## INTRODUCCION

La determinación de los lípidos nos informa sobre la cantidad de colesterol de triglicéridos y eventualmente de otras fracciones que, en un momento dado circulan en el sistema vascular.

El clínico pide normalmente al laboratorio la determinación de colesterol, y en raras ocasiones de triglicéridos o fosfolípidos sin tener en cuenta que la determinación de lipoproteínas aunadas a éstos, nos permite el diagnóstico de hiperlipidemias; el motivo por el cual estas determinaciones no se llevan a cabo es debido a las dificultades técnicas y al costo de ellas.

La hiperlipidemia se define, tomando como base las determinaciones químicas con tg fosfatidos, aún cuando en el aspecto clínico nos podemos conformar en una mayoría de los casos con la determinación de colesterol y triglicéridos, ya que por ejemplo los fosfátidos no desempeñan ningún papel en lo hasta ahora estudiado, por lo tanto no tiene ningún significado.

Ningún método de los que disponemos en la actualidad puede por sí sólo, analizar adecuadamente la mezcla compleja de lípidos sanguíneos.

Importancia de las lipidemias.

Dado que la determinación de triglicéridos presenta exigencias técnicas considerables, se calcula frecuentemente su concentración en forma indirecta, por la ayuda de fórmulas semiempíricas dada la siguiente fórmula:

$$\text{Triglicéridos} = \text{lípidos totales} - (\text{colesterol total} + 70\% \text{ de ésteres del colesterol} + \text{Fosfátidos} + 15) \text{ mg\%}.$$

A simple vista se observa que esta fórmula proporciona inexactitud.

Ahora bien, ya que los triglicéridos son de relevante importancia en la clasificación de las hiperlipidemias ( las cuales tienen un importante papel en las afecciones de tipo vascular y cardíaco ) es pues de considerable atención su determinación química.

Debido a ésto se realiza una revisión de los métodos más importantes para establecer su exactitud, precisión, costo y posible aplicación rutinaria.

Deseo que su contenido contribuya a una mejor realización dentro del trabajo diario al químico clínico.



## II.- GENERALIDADES

El término lípido comprende a las grasas y a numerosas sustancias de estructura química diversa parecida a las grasas, los lípidos se definen como sustancia que:

- a) Son solubles en los llamados disolventes de grasas a solventes orgánicos como éter, cloroformo, alcohol caliente, éter del petróleo, bisulfuro de carbono, etc., siendo la mayoría de ellos insolubles en agua.
- b) Son ésteres o sustancias que forma ésteres.
- c) Suelen tener funciones específicas en el organismo animal -- que pueden ser de tipo estructural o como productores de -- energía.

La utilidad biológica de las grasas es variable; las grasas neutras constituyen un amortiguador físico y aislante de temperatura corporal, forman amplias reservas energéticas, tanto por su gran valor calórico, como porque se puede acumular en los tejidos adiposos en forma prácticamente pura, sobre todo las grasas neutras, los lípidos compuestos tienen propiedades estructurales, y realizan funciones importantes en el metabolismo, otras

substancias asociadas a los lípidos como las hormonas esteroideas, las vitaminas liposolubles, etc., tienen funciones específicas.

#### TRIGLICERIDOS.

Los triglicéridos son ésteres de ácidos grasos con el trihidroxialcol glicerol, si los ácidos grasos tienen una determinada longitud y grado de saturación, y es un compuesto sólido a temperatura ambiente, se dice que es una grasa, si el ácido graso es insaturado y líquido se dice que es un aceite.

Como los triglicéridos vegetales son insaturados son considerados como aceites y los triglicéridos animales son saturados se dice que son grasas.

Los triglicéridos son fácilmente hidrolizados por álcalis y ácidos y por ciertas enzimas llamadas lipasas que se encuentran en suero, jugo pancreático y heces.

#### METABOLISMO DE LOS LIPIDOS.

La entrada de los alimentos al intestino, produce liberación de 2 hormonas, la secretina y la colecistoquina, que van a determinar la salida de los jugos pancreático y biliar respectivamente, prácticamente toda la digestión de las grasas ocurre en el lumen del intestino delgado.

La primera etapa consiste en desintegrar los grandes glóbulos de

grasa en otros menores, de manera que las enzimas digestivas e hidrosolubles puedan actuar sobre la superficie de los glóbulos, a éste proceso se le denomina emulsión de las grasas y se logra por la acción de la bilis secretada por el hígado, que contiene gran cantidad de sales biliares ( sales de sodio ionizado ), el carboxilo de la molécula es la sal biliar es muy soluble en agua y elesterol lo es en la grasa por lo que las sales biliares se concentran en la superficie de las gotitas de grasa del contenido intestinal, y el esterol disuelto en la misma grasa mientras que el carboxilo se proyecta al exterior de la gota y se disuelve en los líquidos vecinos, así se disminuye la tensión superficial de las grasas.

La función de las sales biliares es facilitar la emulsión de las grasas en el intestino delgado.

La lipasa pancreática actúa sobre los triglicéridos al llegar al intestino después de ser vertida por el páncreas, su actividad aumenta debido a la acción de las sales biliares.

El pH óptimo de la enzima es de 7 a 9, dependiendo del tipo de estructura química de los ácidos grasos de los triglicéridos a los cuales hidrolizan.

#### HIDROLISIS COMPLETA DE LAS GRASAS ( TRIGLICERIDOS ).

La hidrolisis completa de las grasas produce glicerol y ácidos grasos, Mattson y Beck en 1956, presentaron pruebas de que la lipasa pan-

creática es específica para la hidrólisis de las uniones éster primarias, por esta razón en la digestión de un triglicérido por la mencionada enzima ocurre primero la separación de un ácido graso terminal, para producir 1,2-diglicérido y después separar el otro ácido graso terminal, para dar 2-monoglicérido, puesto que este último ácido graso está unido a un grupo éster secundario su hidrólisis requiere la isomerización a una unión éster primaria.

Esto constituye una reacción relativamente lenta por lo cual resulta que los monoglicéridos son los productos principales de la digestión de las grasas, ya que menos de la tercera parte de la grasa ingerida es hidrolizada hasta glicerol y ácidos grasos.

Debido a que el glicerol es hidrosoluble, es fácilmente absorbido por el intestino, pero los ácidos grasos y los monoglicéridos son poco solubles en un medio acuoso por lo que requieren un mecanismo auxiliar para su absorción, se cree que la combinación de las sales biliares con los ácidos grasos origina o dará lugar a un producto soluble ( los co-hidrotropicos ) que pueden ser absorbidos en la luz del intestino por las células de la mucosa que revisten su pared.

Después de que los complejos de los ácidos grasos y sales biliares y glicerol han pasado las células de la mucosa intestinal, el ácido graso es liberado de la sal biliar y se recombina con el glicerol para resinte-

tizar una grasa neutra, las sales biliares son absorbidas por la circulación portal y pasan al hígado donde son excretadas de nuevo por la bilis.

En la figura 1 están representadas las reacciones que ocurren antes de la absorción de las grasas en el intestino delgado.

#### SINTESIS DE LAS GRASAS.

Este mecanismo es llevado a cabo a partir del glicerol y los ácidos grasos, siendo lo mismo que la biosíntesis de triglicéridos y fué propuesto por Kennedy en 1957; primeramente la formación de glicérol activo ( alfa-glicerofosfato ) por la acción de la enzima glicerocinasa, siendo el ATP donador de radicales fosfóricos; el glicerofosfato con el ácido graso activo ( coenzima "A" ) producen el 1,2 diglicérido fosfatídico que es desfosforizado resultando 1,2-diglicérido que reacciona con una molécula de ácido-graso activado para unirse en la posición libre dando el triglicérido.

Síntesis de los triglicéridos en el intestino ( Biosíntesis de los -- músculos ) cabe mencionar que el glicerol que se emplea en la resíntesis no es el mismo que el absorbido.

La activación de los ácidos grasos para la resíntesis de los triglicéridos es llevado a cabo por una enzima tiocinasa, dependiente del ATP y se ha demostrado su existencia en las células de la mucosa intestinal.

LA REACCION ES LA SIGUIENTE:

# OXIDACION DE ACIDOS GRASOS

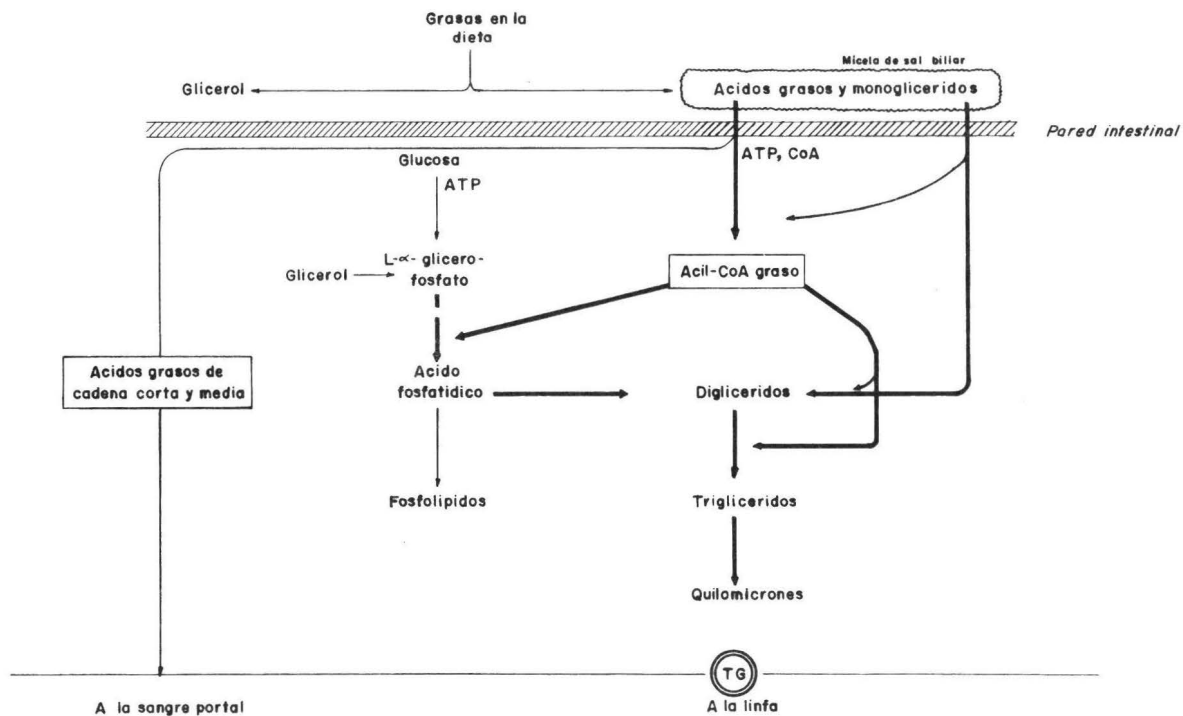
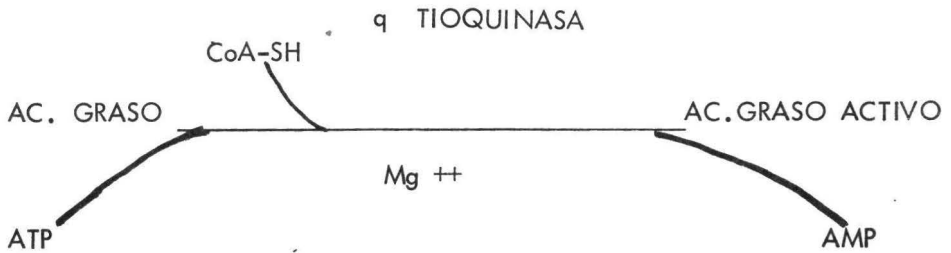


Fig. 1. Ilustración esquemática de los caminos seguidos en la absorción de ácidos grasos y monoglicéridos a través de la célula epitelial de la mucosa intestinal; TG = triglicérido



Las gotitas de grasa microscópicas son transferidas a los vasos linfáticos, como quilomicrones cuyo tamaño varía de 35 nm a 1 micra y llegan a la sangre por vía del conducto torácico y de ahí al hígado.

Se asegura que los quilomicrones son gotitas de grasa revestidas de proteína, lo cual impide su coalescencia y en general no contienen ac. grasos de cadena más corta de C-4 a G12 y éstos ácidos de cadena corta pueden llegar al hígado por transporte directo en la sangre portal y en parte como ácidos grasos no esterificados unidos a albúmina y como mono y diglicéridos. Está bien establecido que los quilomicrones de la sangre y linfa aumentan después de la ingestión de grasas.

Los quilomicrones son transportados por vía linfática hasta la sangre y de ahí al tejido adiposo donde la enzima lipo-protein-lipasa hidroliza los triglicéridos hasta ácidos grasos y glicerol o glicéridos parciales, el tejido adiposo entonces absorbe y almacena a los ácidos grasos como triglicéridos.

Los ácidos grasos de cadena corta ( probablemente una pequeña -

cantidad ), son utilizados para obtener energía, el hígado almacena otra parte de ellos durante un largo tiempo.

Los ácidos grasos y los carbohidratos son sintetizados hasta triglicéridos en el hígado, si no hay exceso en la ingestión de los carbohidratos se producen los llamados triglicéridos endógenos.

Los triglicéridos en el hígado se combinan con una proteína y son transportados como prebeta lipoproteínas. Estos contienen algo de colesterol y fosfátidos. Al igual que los quilomicrones las prebetas lipoproteínas son transportados por vía hemática hasta el tejido adiposo; donde la mayor parte de los triglicéridos son removidos. ( Fig. No. 1 )

Las betalipoproteínas transportan fundamentalmente colesterol y puede considerarse como un complejo lipoprotéico, que permanecen después de que la mayor parte de los triglicéridos fueron removidos de las prebeta-lipoproteínas ( quizá también de los quilomicrones ).

Las betalipoproteínas regresan al hígado y son catabolizados o bien resintetizados en prebetalipoproteínas.

El hígado requiere cierta energía que algunas veces es tomada de las grasas o triglicéridos.

Los triglicéridos del tejido adiposo al hígado son hidrolizadas hasta ácidos grasos y glicerol, este último puede ser convertido en glucógeno en el hígado y es metabolizado como carbohidrato. La formación de



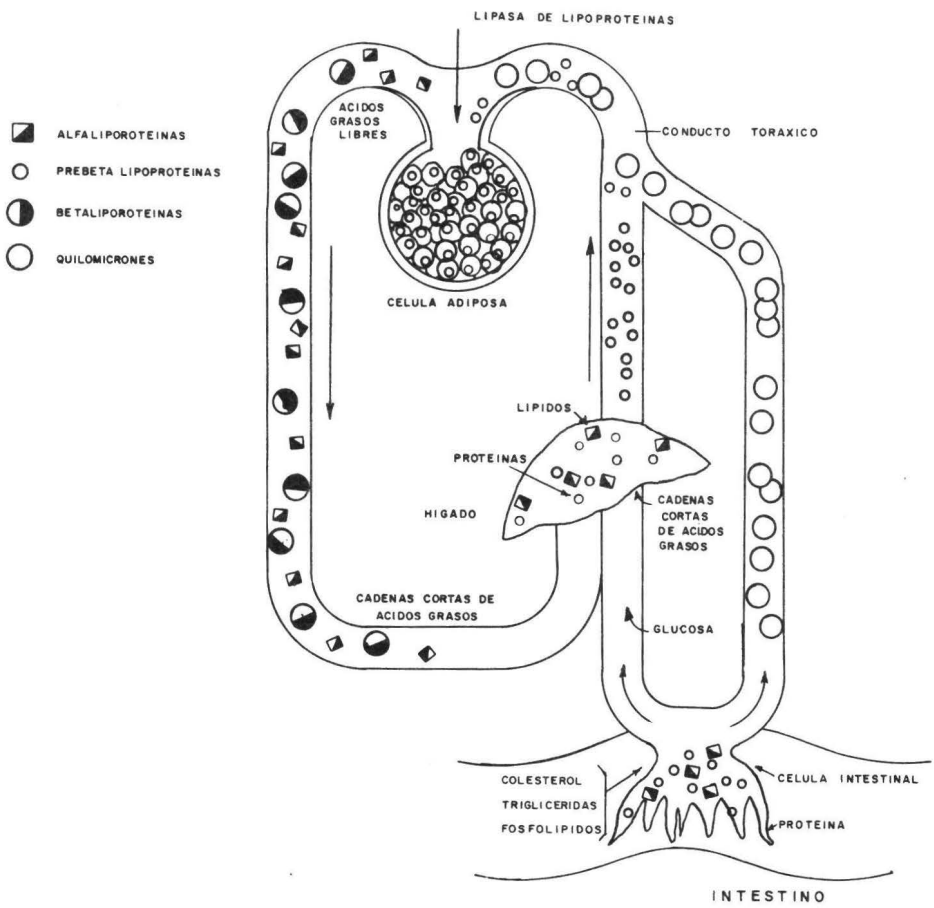


FIG. N° I.

glucógeno se lleva a cabo con la oxidación del glicerol o gliceraldehído (triosa) que es entonces convertida en glucógeno.

Knoop postuló que la cadena de los ácidos grasos es degradada de manera progresiva por la eliminación repetida de los últimos átomos de carbono beta, de esta manera la cadena de 18 átomos de carbono del ácido esteárico sería primero oxidado convirtiéndose en ácido palmítico de 16 y éste a su vez sería convertido en otro de 14 átomos de carbono, etc., hasta que toda la cadena se desintegrara en  $\text{CO}_2$  y agua.

Las funciones principales del hígado en el metabolismo lipídico son:

- A) Desdoblar triglicéridos en compuestos pequeños que se pueden metabolizar para obtener energías.
- B) Sintetizar triglicéridos, principalmente a partir de carbohidratos, y en menor proporción a partir de proteínas.
- C) Sintetizar otros lípidos a partir de triglicéridos.

#### LIPOPROTEINAS.

Hay 4 familias principales de lipoproteína, y recordando que la separación de ellas en la ultracentrífuga se basa en la diferencia de densidades en la combinación de lípidos y proteínas. También hay otros métodos para la separación de los grupos lipoprotéicos como la electroforesis y la -

tinción pero no son merecedores de tanta confianza como la ultracentrifugación.

La primera familia está formada por los quilomicrones; las VLDL- ( lipoproteínas de muy baja densidad ) o prebeta lipoproteínas ( electroforesis ); las LDL ( lipoproteína de baja densidad ) o betalipoproteínas ( electroforesis ); las HLD o lipoproteínas de alta densidad o alfa lipoproteínas - ( electroforesis ).

Podemos decir que los quilomicrones, los VLDL, los LDL, y HLD están involucrados en el transporte de los triglicéridos, como se observa en el siguiente cuadro:

FORMA	ULTRACENT.	ELECTROF.	DEN.	%TG	%COL.	%PLIP	% PROT. ORIGEN
EMUL.	QUILOMIC.	ORIGEN	0.94	90	5	5	2 EXO.
LP/EM.	VLDL	Prebeta	0.96 1.006 1.006	60	15	15	10 END.
LP	LDL	Beta	1.063	5	50	20	20 END.

Como nos damos cuenta todas las fracciones llevan triglicéridos - por lo tanto son importantes; las de mayor interés para nosotros por su gran contenido de triglicéridos son: los quilomicrones, y las prebetas lipoproteínas.

De acuerdo a Fredickson y Lees las hiperlipoproteinemias las clasifican en:

TIPO I.- Hiperquilomicronemia, presencia de quilomicrones en plasma; las prebetas lipoproteínas pueden ser normales o ligeramente aumentadas.

CARACTERISTICAS DEL SUERO.- Cuando éste se deja en reposo, se deposita una capa de lípidos sobre el líquido plasmático claro, el colesterol plasmático, pueden estar aumentado, en cambio los triglicéridos siempre están aumentados, la relación colesterol/triglicéridos es menor a 0.20.

Tolerancia a la glucosa normal.

TIPO II.- Hiper-beta-lipoproteinemia: aumento anormal en la concentración de las fracciones beta. Este tipo se distingue en dos subtipos: TIPO II-A y TIPO II-B, en ambos casos es válido el criterio para el tipo II o sea aumento de las fracciones beta, pero en el II-B se encuentra además, aumentada la fracción prebeta. El reconocimiento del subtipo II-B es importante, ya que puede requerir un tratamiento adicional del que normalmente se le proporciona al paciente con hipercolesterolemia, ambos tipos pueden encontrarse en el mismo grupo de pacientes afectados con hiperbetalipoproteinemia del tipo familiar; es por esta razón que ambos deben considerarse dentro del grupo principal tipo II.

TIPO II-A. Aumento de la fracción beta, la fracción prebeta es normal.

CARACTERISTICAS DEL SUERO.- Cuando éste se deja en reposo, permanece claro. El colesterol plasmático generalmente se encuentra aumentado los triglicéridos del plasma son normales, la relación Col/TG es mayor de 1.5.

TIPO II-B.- Aumento de la fracción beta y la fracción prebeta.

CARACTERISTICAS DEL SUERO.- Al dejar el plasma en reposo, éste puede ser claro o con una ligera turbidez sin llegar a tener una capa de quílimicrones. El colesterol plasmático se encuentra generalmente aumentado, los triglicéridos del plasma siempre están aumentados; la relación Col/TG es variable.

TIPO II-A.- Puede diagnosticarse generalmente por el análisis de colesterol y TG, especialmente cuando la relación Col/TG es mayor de 2.0.

TIPO II-B.- Es difícil de seleccionar únicamente por el análisis de lípidos.

TIPO III.- Beta anormal, tiene la fracción beta amplia.

La presencia de una fracción prebeta teniendo niveles anormales altos de colesterol.

CARACTERISTICAS DEL SUERO.- Es habitualmente turbio después de dejarlo en reposo, frecuentemente con una ligera capa cremosa característica de los quilomicrones ( dato útil pero no diagnóstico ). El colesterol y los triglicéridos siempre están aumentados.

La relación Col/TG se acerca a la unidad en la mayoría de los casos, sin embargo puede variar de 0.3 a un valor superior de 2.0; aún cuando análisis repetidos muestran una marcada inestabilidad, tanto en la concentración de triglicéridos como de colesterol.

TIPO IV.- Hiperbetalipoproteinemias: Incremento de la fracción prebeta, ningún aumento de la fracción beta y ausencia de quilomicrones.

CARACTERISTICAS DEL SUERO.- Al dejar el suero en reposo este puede ser claro o turbio, sin embargo no se observa una capa de quilomicrones, el colesterol plasmático se encuentra normal o aumentado, los triglicéridos plasmáticos siempre están aumentados, la relación Col/TG es variable.

Tolerancia a la glucosa normal.

TIPO V.- Hiperbetalipoproteinemia y quilimicronemia; aumento de la fracción prebeta y presencia de quilomicrones.

CARACTERISTICAS DEL SUERO.- Al dejar en reposo el suero se observa una capa cremosa de quilomicrones sobre un líquido turbio, este dato diagnóstico si es excluida de la anomalía III.

El análisis de colesterol y de triglicéridos plasmáticos se encuentran aumentados, la relación Col/TG es habitualmente mayor de 0.15 y menor de 0.60, este dato, es de valor pero no siempre se presenta.

Tolerancia a la glucosa normal.

El efecto de una dieta rica en carbohidratos, puede producir un aumento de la fracción prebeta lipoproteínas, que constituye la síntesis de triglicéridos endógenos por el hígado y por el tejido adiposo; estas moléculas son algo más pequeñas que los quilomicrones que representan los triglicéridos absorbidos por el hígado.

La siguiente tabla contiene una sinopsis de las características más importantes de los 5 tipos.

T I P O	I	II	III	IV	V
QUILOMICRONES	+++	NO	NO	NO	++
BETA LOPORROT	NO	+++	+	NO	NO
PREBETALIPOPROT	NO	NO	++	+++	++
SUERO TURBIO	+++	-	(++)	(+++)	+++
TRIGLICERIDOS	+++	NO	++	+++	+++
COLESTEROL	(+)	+++	++	(++)	+
TOL. GLUCOSA	NO	NO	A	A	(A)
LP-LIPASA	A	-	-	-	(A)

<u>CLINICA</u>	I	II	III	IV	V
XANTOMAS	+++	-	-	-	++
INDUCCION DE G.	ERUPTI VO	TENDI NOSO TUBE- ROSO	TODOS	ERUP- TIVO	ERUP- TIVO
XANTELASMAS	-	+	+	-	-
HEPATOESPLENOMEGALIA	++	-	-	+	+
PANCREATITIS	++	-	-	+	++
ARTERIOESCLEROSIS	?	+++	++	++	+

Existe cierta evidencia de que el aumento del nivel de triglicéridos es importante como factor de trombosis, pues interfiere en la actividad fibronolítica, que disminuye el flujo coronario y la oxigenación de los tejidos en situaciones que favorecen la aparición de angina de pecho o infarto al miocardio. Aunque el papel del colesterol en la arterioesclerosis generalmente se considera importante, existe la posibilidad de que el aumento de triglicéridos también tenga algún significado patológico lo cual puede o mejor dicho debe de tenerse en cuenta cuando se estudian los hábitos dietéticos de los pacientes, así como los patrones de lípidos séricos.

Así mismo una situación de estres fisiológicos, es tan importante como el infarto al miocardio, puede producir una hiperlipidemia, en la fracción de triglicéridos, esto sugiere que el estudio metabólico de las li-



poproteínas no debe iniciarse en el curso de las enfermedades agudas; por ejemplo:

Después de un infarto al miocardio, conviene esperar varios meses para realizarlo.

TIPO DE ALGUNAS ENFERMEDADES QUE SE ASOCIAN CON LAS VARIACIONES DE LIPIDOS:

PADECIMIENTO	LIPIDOS AUMENTADOS
Embarazo	Alfa LP, TG y COL.
Dieta rica en carbohidratos	TG
Pancreatitis	TG
Diabetes mellitus	TG, COL.
Obstrucción Biliar.	COL.
Alcoholismo.	TG.
Hipertiroidismo	AGNE, TG.
Hipotiroidismo	COL, TG.
Insuficiencia renal	TG.
Nefrosis	TG, COL.
Hígado graso	TG.
Glucogenosis	TG, AGNE, COL.
Hipercalcemia idiopática	TG, COL.

PADECIMIENTO	LIPIDOS AUMENTADOS
Gota	COL.
Enfermedad de Gaucher	COL.
Estres	TG.
Enfermedad de Niemann Pink	COL.
Adenoma Basófilo	TG.
Síndrome de Cushing	TG.
Plasmocitoma	COL, TG.

TG=TRIGLICERIDOS

COL=COLESTEROL

AGNE=ACIDOS GRASOS NO ESTERIFICADOS

ALFA LP=ALFALIPOPROTEINAS.

TIPO DE DIETAS Y DROGAS DE ACUERDO A LAS HIPERLIPO--  
PROTEINEMIAS.

- TIPO 1.- Dieta
- 1) Restricción de las grasas 25 gr. por día.
  - 2) Reemplazo de los triglicéridos de cadena media.  
Esto es comprensible por cuanto se trata de una hiperlipidemia exógena proveniente de las grasas de la alimentación.

Droga: No es efectiva ninguna droga.

- TIPO II.- Dieta
- 1) Baja en Colesterol menos de 300 mgs. por día.
  - 2) Incremento de las grasas polinsaturadas.
- Drogas:
- 1) colesteramina ( Questran o Quemid ).
  - 2) thiroxine sódico ( choloxin ).
  - 3) ácido nicotínico.
- TIPO III.- Dieta
- 1) Reducción peso ideal.
  - 2) Dieta balanceada 40% de calorías en grasas 40% en carbohidratos, 20% en proteínas.
  - 3) Dieta baja en colesterol 300 mgs., por día.
- Drogas:
- 1) Clofibrate ( atromid s ).
  - 2) El D-thiroxine.
  - 3) Acido nicotínico.
- TIPO IV.- Dieta
- 1) Reducción peso ideal.
  - 2) Incremento de las grasas polinsaturadas.
  - 3) Restricción de los carbohidratos.
- Drogas:
- 1) Clofibrate.
  - 2) Acido nicotínico.
- TIPO V.- Dieta
- 1) Reducción peso ideal.
  - 2) Incremento ingesta de proteínas.
  - 3) Reducción de las grasas a menos de 70 gr. por día.

4) Restricción de los carbohidratos cuando sea posible.

Drogas: 1) Acido nicotínico.

2) Clofibrate.

#### MODO DE ACCION DE LAS DROGAS HIPOLIPEMICAS.

Clofirate.- Es un bloqueador de la síntesis de colesterol y disminuye la síntesis o liberación de lipoproteínas del hígado, aunque ésta última acción es dudosa.

D-Thiozine-Sódico.- Baja las concentraciones de colesterol por el aumento del metabolismo de éste y de las betalipoproteínas.

Acido nicotínico.- Aunque su mecanismo de acción no es todavía claro, se cree que inhibe la liberación de los ácidos grasos del tejido adiposo.

Colesteramina.- Fija los ácidos biliares en el intestino, previniendo su reabsorción. Esta interrupción del ciclo, entero-hepático lleva un incremento en el catabolismo del colesterol y transformación de los ácidos biliares. A altas dosis esta resina puede interferir en la absorción normal del colesterol; la colesteraimina no se absorbe por el tracto intestinal.

Oxandrolona.- ( Lonavar ) es un anabólico que actúa especialmente disminuyendo los niveles de triglicéridos. Su mecanismo de acción se cree es debido a un aumento de la actividad de liposalipoprotéica. Y se usa preferentemente en los tipos III, IV y V de hiperlipoproteinemias.

Se recomienda usar con cuidado a pacientes con lesión hepática y aquellos con tratamiento anticoagulante.

## ANTECEDENTES DE LA DETERMINACION DE TRIGLICERIDOS.

En 1957 Van Handel y Zilversmit ( 1 ) propusieron un método químico para la determinación directa de triglicéridos séricos. Carlson y Wadstrom ( 2,3 ) en forma independiente propusieron un método similar. Estos 2 métodos se basan en:

- a) Extracción de los lípidos con isopropil éter.
- b) Separación de los fosfátidos por silicagel.
- c) Saponificación completa de los triglicéridos a glicerol y ac. grasos.
- d) La oxidación del glicerol a formaldehido con exceso de peryodato y la reducción de este exceso de peryodato por la adición de una sustancia reductora.
- e) Determinación colomimétrica del formaldeído con ácido cromotrópico.

Muchos investigadores en diferentes laboratorios emplean estas técnicas para la determinación de triglicéridos en suero, pero algunos de ellos han realizado algunas modificaciones para incrementar la especificidad-

y reproductividad del método. Así mismo Van Handel y Zilversmit ( 1 ), -- Carlson y Wadstrom ( 2,3 ) encontraron que es necesario remover los áci-- dos grasos y Leveille et al ( 4 ) remover el colesterol del sistema antes de la determinación de triglicéridos como glicerol.

Jagannathan ( 11 ) encontró que la cantidad de peryodato especi\_ ficada por Van Handel y Zilversmit era demasiada. Carlson y Wadstrom -- también reportan la necesidad de mantener la concentración salina lo más -- bajo posible, pero para esto Van Handel y Zilversmit emplean el arsenito -- de sodio para remover el exceso de peryodato.

Frisell y Mackenzie ( 5 ) descubrieron en el curso de sus investi\_ gaciones que el arsenito interfiere en la producción del color al reaccio-- nar el formaldehído y el ácido cromotrópico, y recomendaron el uso de bi\_ sulfito de sodio en lugar del arsenito de sodio como reductor del exceso de oxidante, y sugirieron también el uso de tiourea al 5% ( 1 ml/det ) antes -- de la medición fotocolorimétrica para disminuir el color rojo producido por los reactivos.

Además de todas modificaciones anteriores encontraron que el -- glicerol resultante de la saponificación es bastante volátil y que se había -- de tener la precaución de la pérdida del mismo en la evaporación del al-- cohol empleado en la saponificación, así se han propuesto el uso de  $P_2O_5$  y de cloruro de calcio entre otros procedimientos; Jagannathan encontró --

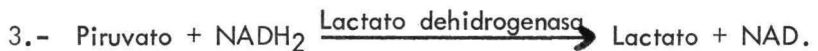
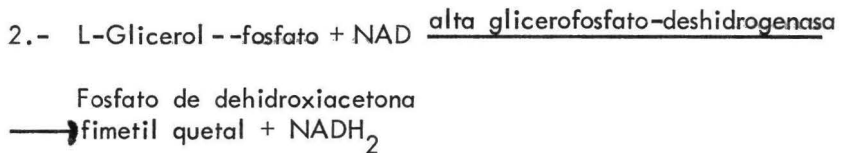
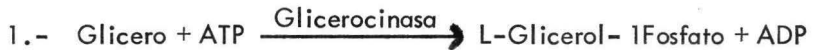
que la adición de 2 gotas de ac. acético permitía la evaporación a 55°C.

En 1968 Royer y Howart Ko propusieron el siguiente fundamento para la medición de los triglicéridos séricos:

- a) Extracción de los glicéridos ( de los fosfalípidos ) por medio de nonano.
- b) Transesterificación de los triglicéridos con metilato de sodio en iso-propanol.
- c) Separación del glicerol y los ésteres resultantes por cloroformo.
- d) Oxidación a formaldehído del glicerol y reducción del exceso de oxidante con arsenito de sodio.
- e) Reacción del formaldehído con la acetilacetona para la producción de dihidrolutidina compuesto de color amarillo medible fotocolorimétricamente a fluoremétricamente.

Levy y Keylon ( 1970 ) propusieron el uso de arsenito de sodio -- como reductor del exceso de oxidante y en 1973 Gottfried y Rosemberg -- propusieron el uso de heptano como extractor de los triglicéridos y el uso de hidróxido de potasio ( saponificación ) en lugar del metilato de sodio -- sin realizar la separación de los ácidos grasos resultantes del glicerol antes de la producción de la dehidrolutidina.

En 1968 Eggstein y Schmidt desarrollaron 2 métodos que miden - D.O., o la extinción en el cercano ultravioleta por la transformación enzimática del glicerol; y se basa en la siguiente reacción:



El presente trabajo consistió en la determinación de Triglicéridos por varios métodos:

- 1.- Ultravioleta ( Eggstein y Krotz ).
- 2.- Gottfried, S.D. y Rosemberg, B .
- 3.- DADE ( Roger y Howard ).
- 4.- Jagannathan S.N.

- 1.- ULTRAVIOLETA ( Eggstein y F.H. Krotz ).

Estimar la posible utilización de uno de ellos como práctico en el laboratorio por su confiabilidad así como costo y rapidez.



## MATERIAL Y METODO

Material Biológico.- El material biológico utilizado en este trabajo estuvo constituido por suero de 100 personas, la mayoría comprendida entre 20 y 60 años de edad escogidos al azar.

Toma de la Muestra.- La muestra de la sangre fué obtenida en condiciones basales, y en ayuno de 8 h a 12 h., evitando la actividad muscular excesiva antes de la punción, administración y/o una situación de estrés ya que estos factores influyen en el metabolismo de triglicéridos.

No debe utilizarse suero hemolizado.

Almacenamiento.- El almacenamiento por más de 24 horas en refrigeración a 4°C produce un decremento de los triglicéridos.

Se observó que en congelación permanecen estables 96 horas, -- aunque es recomendable que las determinaciones se efectúen en sueros frescos. Para proceder a las determinaciones se usó en cada uno de los métodos patrón equivalente a 100 mg% de triglicéridos obtenido de DADE de México.

METODO ULTRAVIOLETA ( M. Eggstein y F.H. Krotz ).

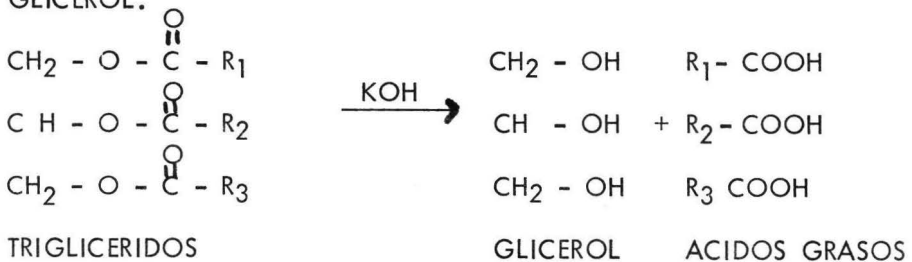
Se llevó a cabo determinación enzimática de glicerol y triglicéridos en suero ( ultravioleta con NADH ).

Fundamento.- Los triglicéridos mediante la saponificación son hidrolizados en ácidos grasos y glicerol libre. El glicerol es fosforilado con ATP en una reacción catalizada con enzima glicerocinasa ( OK ) obteniendo como producto L-Glicerol-ifosfato y ADP.

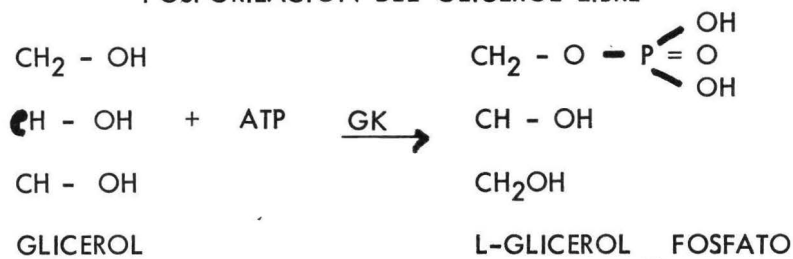
Mediante otra reacción enzimática catalizada por la piruvatoki—nasa y el ADP, reaccionan con el fosfoenol piruvato obteniendo como producto el piruvato y ATP posteriormente el piruvato más NADH<sub>2</sub> reaccionan catalizados por la dehidrogenasa láctica y se produce lactato y NAD.

La cantidad de NADH<sub>2</sub> consumida durante la reacción es proporcional a la cantidad de glicerol presente en la muestra. El NADH<sub>2</sub> puede ser medido por su absorbancia a 340 ó 366 nm.

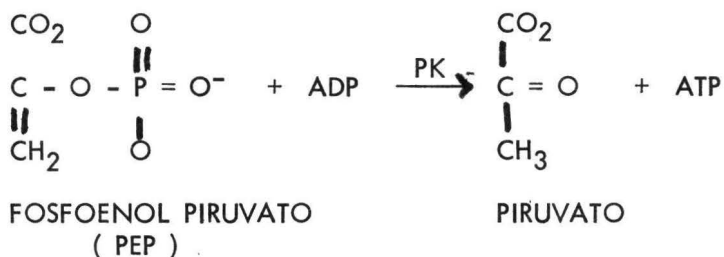
REACCIONES EMPLEADAS EN LA DETERMINACION ENZIMATICA DEL GLICEROL.



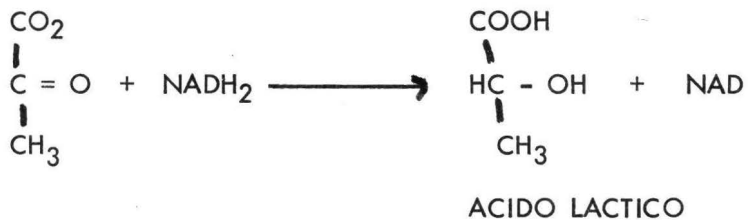
## FOSFORILACION DEL GLICEROL LIBRE



## REACCION ENZIMATICA AUXILIAR



## REACCION ENZIMATICA FINAL



## PIRUVATO

## II.- Material y Equipo.-

- a) Tubos de ensaye de 13 x 100
- b) Pipetas serológicas de 10.5 y 1 ml. graduadas en 0.1 ml.

- c) Centrífuga.
- d) Espectrofotómetro Coleman Junior II.

### III.- Reactivos.-

- a) Amortiguador.
- b) NADH/ATP/PEP
- c) LDH/PK
- d) GK
- e) Sulfato de magnesio 0.15 M
- f) Hidróxido de potasio 0.5 N ( Etanol ).

### Preparación.-

- a) Amortiguador ( 0.1 M, trietanol amina pH 7.6-sulfato de -- magnesio 0.004 M ). Se disuelve el contenido de la botella No. 1 con 150 ml. de agua bidestilada. La solución es estable a temperatura ambiente durante 2 meses.
- b) NADH/ATP/PEP.- ( NADH 0.006 M, 0.033 M ATP, PEP - 0.011 M ). Se reconstituye el frasco No. 2 con 2 ml., de agua bidestilada. La solución es estable durante 1 año a refrigeración.
- c) LDH/PK (LDH 2 mg. PK/ml ). Se utiliza la suspensión frasco 3, sin diluir, estable en refrigeración 1 año.

d) GK ( 2 mg. de GK/ml. ) Se usa la suspensión del frasco --  
no. 4 sin diluir, es estable en refrigeración durante 1 año.

e) Potasa alcohólica ( 0.5 N ).

Hidróxido de Potasio            3.3 g.

Agua bidestilada                10 ml.

Etanol c.b.p.                    100 ml.

f) Sulfato de magnesio ( 0.15 M ).

Sulfato de magnesio .7 H<sub>2</sub>O        3.7 g.

Agua bidestilada c.b.p.        100 ml.

Premezcla.- 13 ml. de soln. a.

0.5 ml. de soln. b.

0.1 ml. de soln. c.

NOTA.- Mediante la saponificación obtenemos el glicerol de los triglicé-  
ridos, en la sangre tenemos glicerol libre en una cantidad constante aproxi-  
madamente 1. mg.% ( 10 mg% de triglicéridos ), por lo tanto no necesita-  
mos saponificar para determinar glicerol libre.

De este modo se determina glicerol total ( glicerol de triglicé-  
ridos + glicerol libre ).

IV.- Procedimiento.-

Saponificación.-

a) Suero 0.2 ml.

b) KOH Etanólico 0.5 ml.

Mezclar e incubar en baño maría a 55°C-70°C durante 30'

c) Dejar enfriar temperatura ambiente.

d) Agregar 1 ml. de sulfato de magnesio, mezclar y centrifugar.

DETERMINACION DE LA MUESTRA.

e) Pipetear 0.2 ml. de sobrenadante

f) Pipetear 1.05 ml. de la premezcla ( reactivos 1,2 y 3 ), — leer a los 10 minutos E<sub>1</sub> en D.O. ( blancos de aire ) a 366 nm.

g) Agregar 0.01 ml., de la suspensión 4 leer a los 10 minutos E<sub>2</sub> en D.C. contra blanco de aire a 366 nm.

NOTA: Todas las cantidades son para la determinación semicrométodo.

V.- Cálculos.-

El volumen total del macro-método 3.14 ml.

El volumen total del mico0método 1.27 ml.

La diferencia es menor del 0.1% y no produce error y por lo -- tanto el factor o factores usados en el macro-método pueden ser usados en el semi micro-método.

$$\frac{D.O. \times V \times PM \times 8.5}{C \times A \times b \times D \times Vm.} = mg\%$$

D.O.....	Diferencias de lecturas
V .....	Volumen total, 3.14 ml.
PM .....	Peso molecular del glicerol = 92
Coefficiente de absorbancia .....	3.3 cm <sup>2</sup> /mola 366 nm. 6.22 cm <sup>2</sup> /mola 344 nm.
D .....	Trayectoria de la luz 1 cm.
V <sub>m</sub> .....	Volumen de la muestra = 0.5 ml.
Factor para el glicerol total derivado de la fórmula a 366 nm.	

$$D.O. \times 149 \text{ mg\%}$$

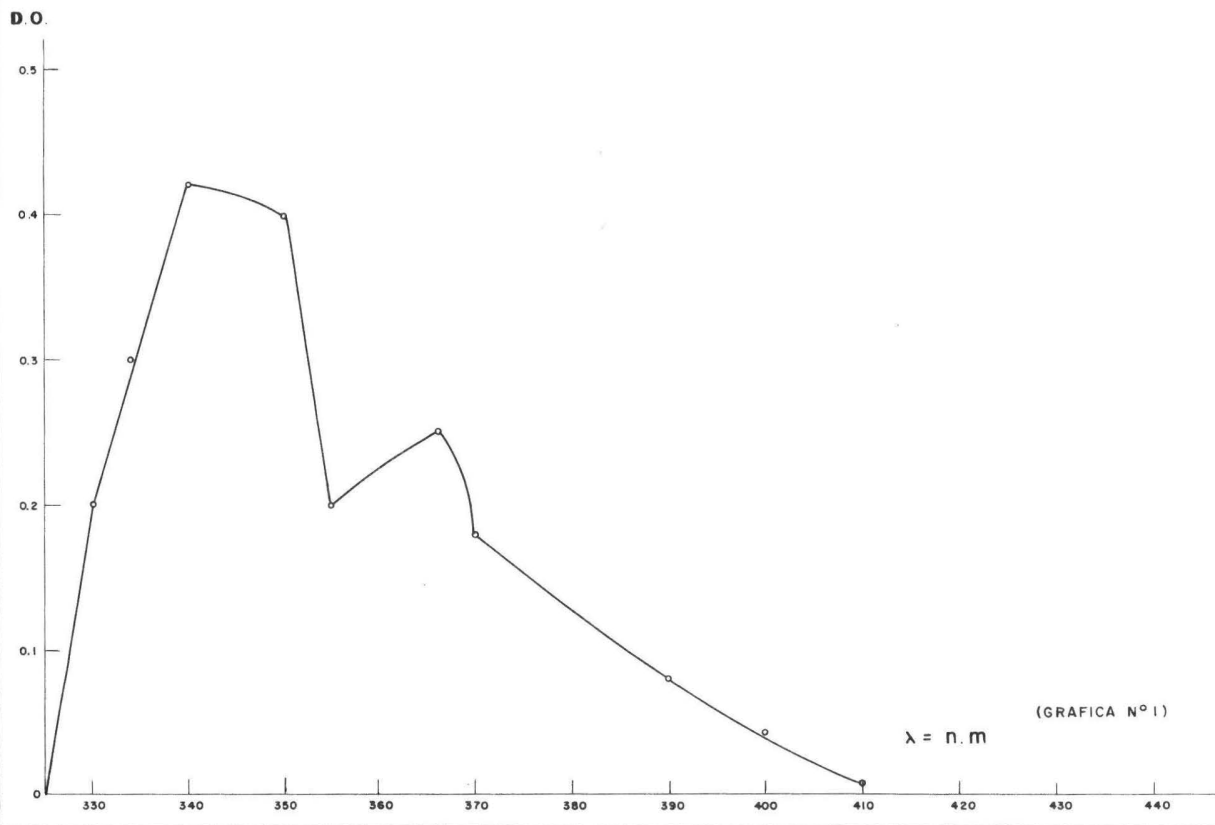
$$D.O. = E_1 - E_2$$

Triglicéridos.-

$$(\text{Glicerol total mg\%} - 1 \text{ mg\%}) \times 0.62 = \text{mg\% de TG.}$$

Factor 9.62 se deriva entre la relación de peso molecular de --  
los triglicéridos ( 385 ) y el peso molecular del glicerol ( 92 )  $385/92 =$   
9.62. Valores normales - de 74a 172 mg% de TG.

ESPECTRO DE ABSORCION DEL (GLISEROL)  $\text{NADH}_2$   
METODO ULTRAVIOLETA  
APARATO COLEMAN JUNIOR II  
344 - 366  $\mu\text{m}$ .





ESTABILIDAD DE LA REACCION DEL (GLISEROL)  $\text{NADH}_2$   
METODO ULTRAVIOLETA  
APARATO COLEMAN JUNIOR II  
344 - 366 nm.

D. O.

0.3

0.2

0.1

0

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

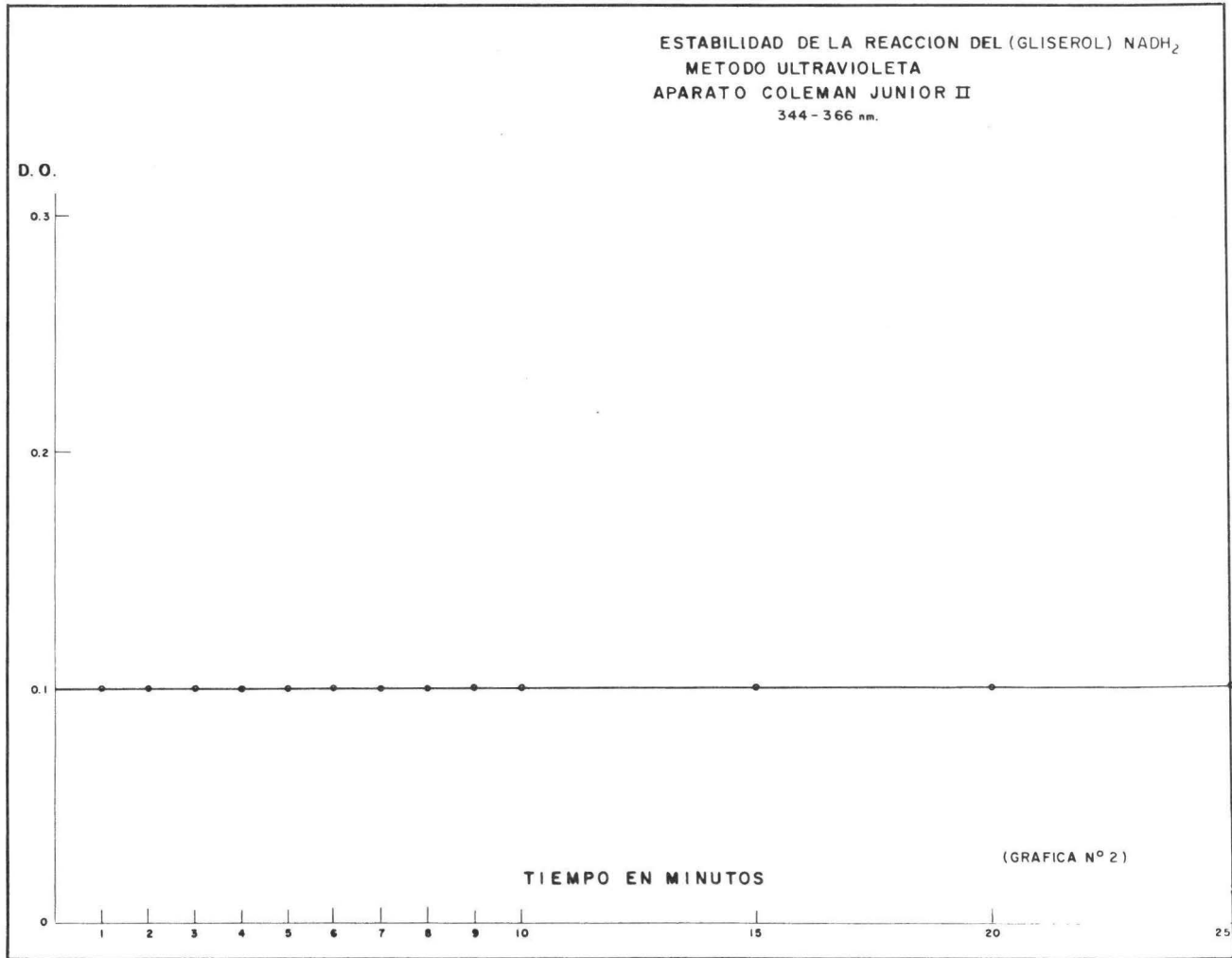
15

20

25

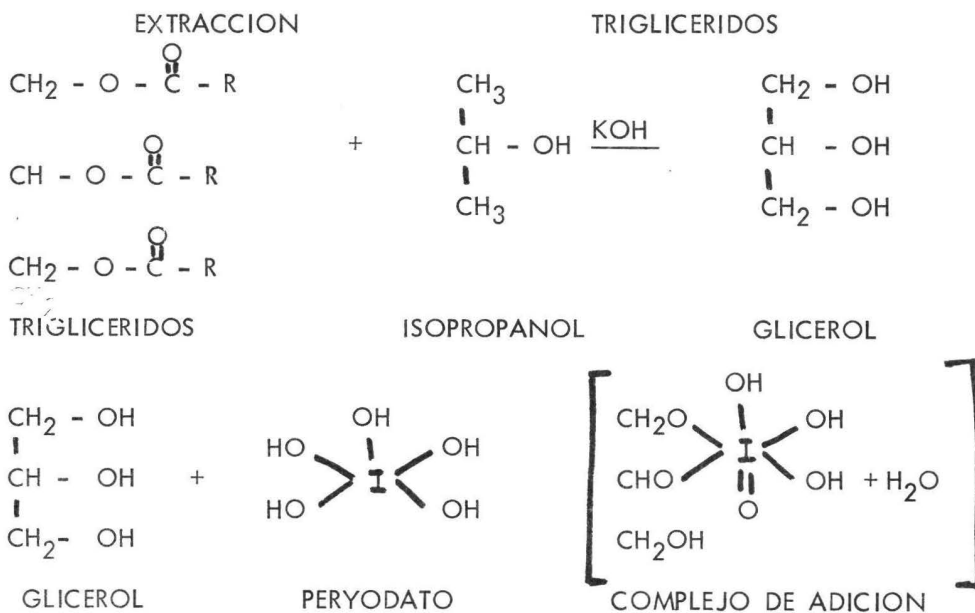
TIEMPO EN MINUTOS

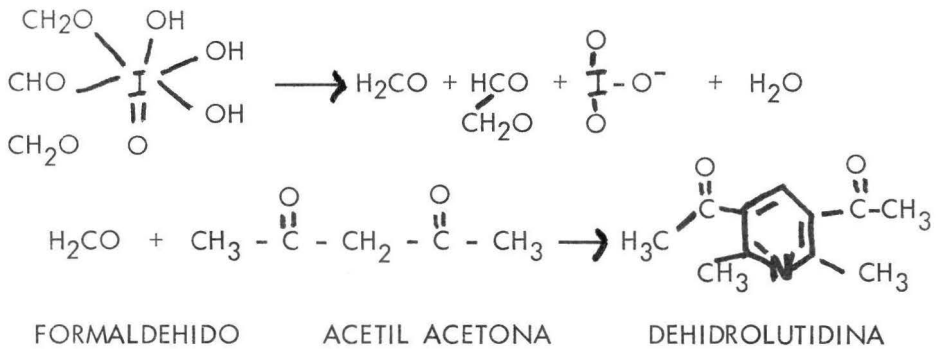
(GRAFICA N° 2)



METODO Gottfried S.D. y Roseberg. S.

I.- Fundamento.- La extracción es hecha con iso-propanol, seguida de una absorción de las sustancias que puedan interferir en la determinación por medio de heptano-n, luego una saponificación para liberar el glicerol, este se oxida con meta-peryodato, para formar el formaldehido el cual se -- condensa con acetilacetona, para formar un derivado amarillo, la dehidro-lutidina que se proporciona a la concentración del formaldehido transformado, medible colorimétricamente a una longitud de onda de 425 nm.





## II.- Material y Equipo.-

- a) Tubos de ensaye 13 x 100
- b) Pipetas serológicas de 10, 5 y 1 ml. graduadas en 0.1 ml.
- c) Baño serológico.
- d) Espectrofotómetro Coleman Junior II.
- e) Suero sanguíneo.

## III.- Reactivos.-

- 1) Meta peryodato de sodio.
- 2) Acetato de amonio.
- 3) Acetilacetona.
- 4) Solución patrón de reserva de trioleína.
- 5) Hidróxido de potasio 6.25 M.
- 6) Heptano-n.
- 7) Iso-propanol G.R.

8) Ac. sulfúrico.

Preparación.-

- 1) 6 g. m-peryodato de sodio a 1,000 ml. de H<sub>2</sub>O incluyendo 50 ml. de ac. acético glacial.
- 2) Acetato de amonio 2M.- 150 gm. de acetato de amonio c.p.b. 1,000 ml. de H<sub>2</sub>O ( estable indefinidamente ).
- 3) 1.5 ml. de acetilacetona de 200 ml. de acetato de amonio-2M ( se debe preparar 1 hr. antes de su uso, estable 3 semanas en refrigeración ).
- 4) Solución patrón de reserva de trioleína.- 100 gm c.b.p. — 100 ml. de iso-propanol.
- 5) Solución patrón de trabajo de trioleína.- 2.5 ml de solu—ción patrón de reserva de trioleína c.b.p. 25 ml. iso-propa—nol equivalente a 100 mg de triglicéridos ( estable 6 sem ).
- 6) Hidróxido de potasio 6.25 M.- 406 gm c.b.p. 1,000 ml de agua.

IV.- Procedimiento.-	BLANCO	PATRON	PROBLEMA
Suero	_____	_____	0.5 ml.
Patrón	_____	0.5 ml	_____
Agua	0.5 ml	0.5 ml	_____
Heptano-n	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml
Iso-propanol	3.5 ml	3.0 ml	3.5 ml
ac. sulfúrico	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml

Mezclar 30 seg., separar las fases por centrifugación pasar de -  
la fase superior a otra serie de tubos marcados.

	BLANCO	PATRON	PROBLEMA
Fase superior	0.4 ml	0.4 ml	0.4 ml
Iso-propanol	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml
Potasa	0.05ml	0.05ml	0.05 ml
Incubar a 70°C 10'			
m-peryodato de sodio	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Acetilacetona	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml

Tapar e incubar a 70°C 10 minutos

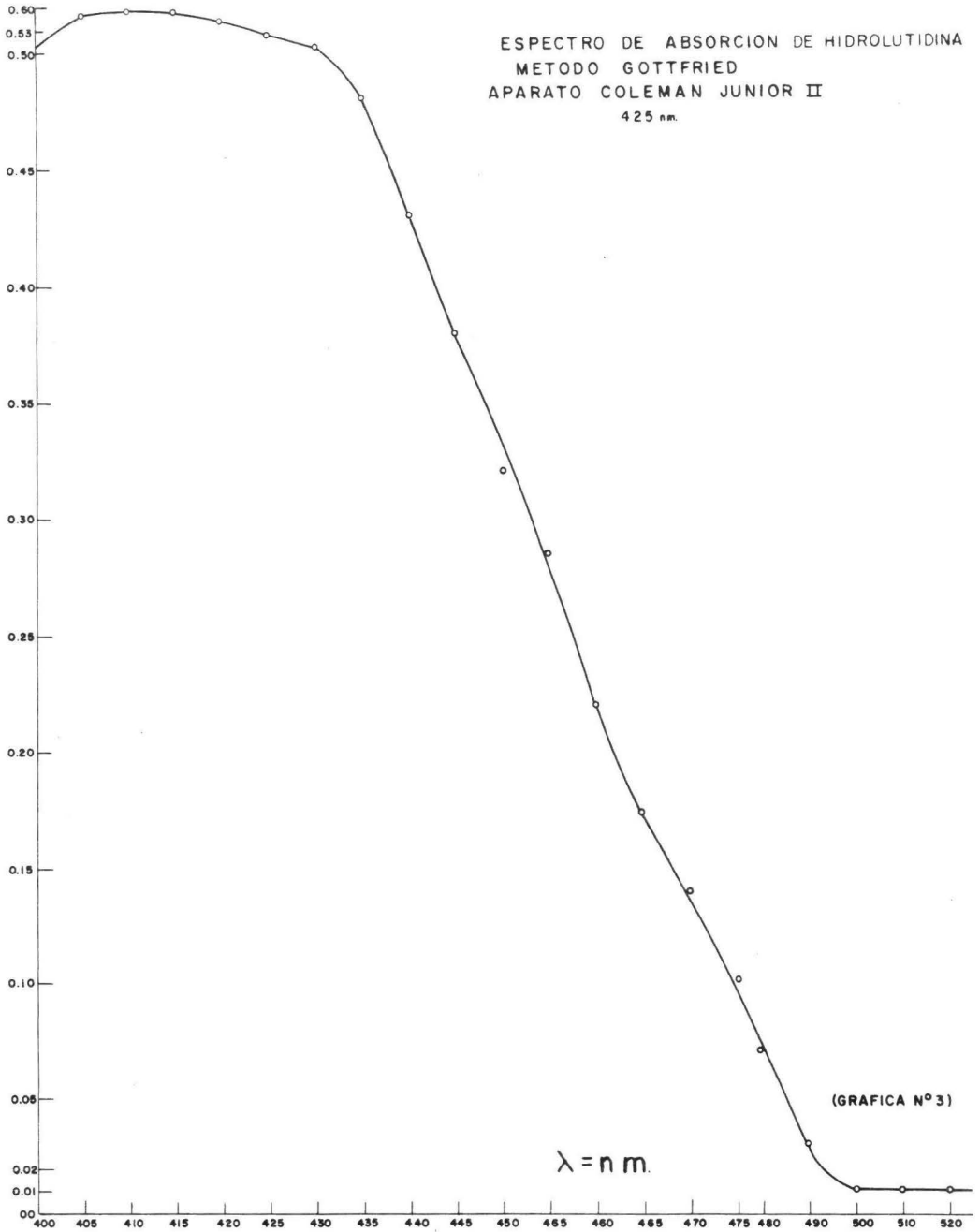
Enfriar a temperatura ambiente, leer a 425 nm con el blanco de reactivos.

V.- Cálculos.-

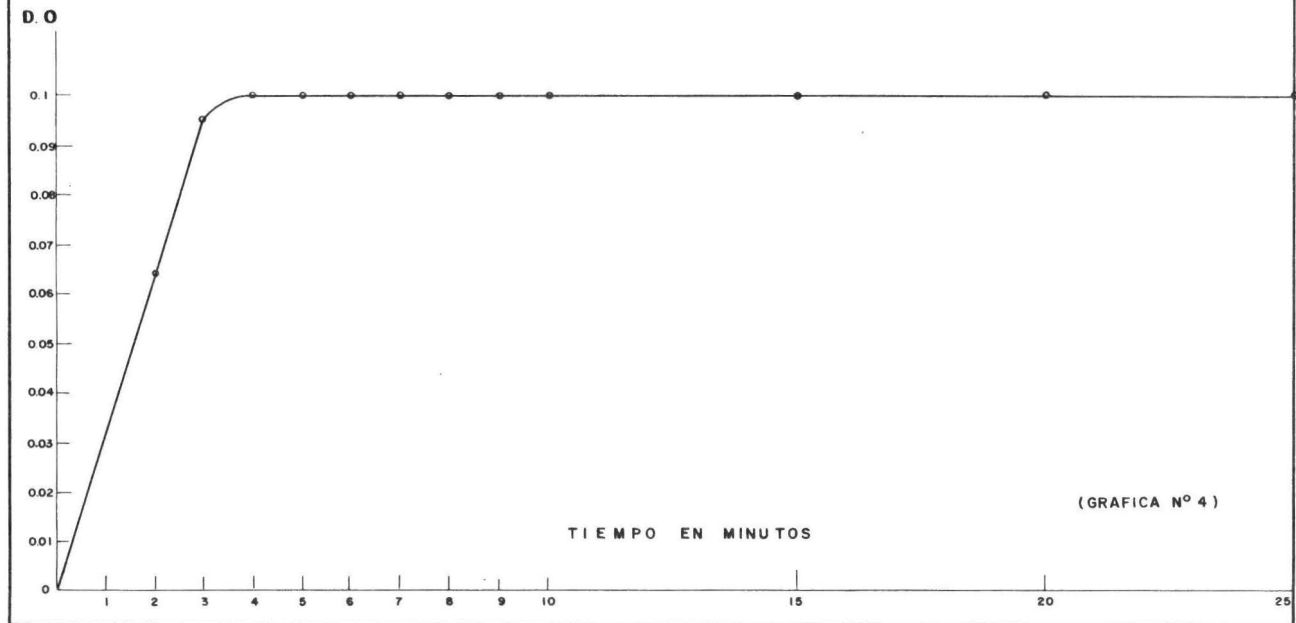
$$\frac{\text{D.O. del problema}}{\text{D.O. del Patrón}} \times 100 = \text{mg\% de TG}$$

Valores Normales.- 42 a 167 mg% en ayunas.

ESPECTRO DE ABSORCION DE HIDROLUTIDINA  
METODO GOTTFRIED  
APARATO COLEMAN JUNIOR II  
425 nm.



ESTABILIDAD DE LA REACCION DE HIDROLUTIDINA  
METODO GOTTFRIED  
APARATO COLEMAN JUNIOR II  
425 m.m.





METODO DADE ( Roger y Howard )I.- Fundamento

Los triglicéridos son extraídos del suero con nonano el cual extrae los triglicéridos pero no los fosfolípidos. El glicerol es liberado por una trasesterificación con metilato de sodio 0.1 M en iso-propanol, luego es oxidado a formaldehído con meta-peryodato de sodio, el exceso de éste es reducido con arsenito de sodio. El formaldehído reacciona con la acetilacetona para formar dehidrolutidina de color amarillo, medible fotocolórimétricamente a 425 nm. La dehidrolutidina formada es proporcional del formaldehído transformado.

II.- Material y Equipo.-

- a) Tubos de ensaye de 13 x 100 mm.
- b) Pipetas serológicas de 10, 5 y 1 ml graduadas en 0.1 ml.
- c) Baño serológico.
- d) Espectrofotómetro Coleman Junior II.
- e) Centrífuga clínica.

Material biológico: Suero sanguíneo.

III.- Reactivos.

- 1.- Ac. sulfúrico.

- 2.- Reactivo de extracción ( nonano-n )
- 3.- Reactivo de oxidación ( soln. de meto-peryodato de sodio ).
- 4.- Reactivo reductor ( soln. de arsenito de sodio ).
- 5.- Amortiguador ( soln. de acetato de amonio ).
- 6.- Reactivo de color.
- 7.- Patrón de triglicéridos.
- 8.- Cloroformo.
- 9.- Reactivo transterificador ( metilato de iso-propanol ).

Preparación.-

- 1.- Ac. sulfúrico 0.8 m.  
4.4 ml. de ac. sulfúrico concentrado ( 98% ) cbp. 100 ml.  
( precaución ).
- 2.- Ac. sulfúrico 0.04 M. 15 ml. de la soln. anterior c.b.p.  
100 ml. de H<sub>2</sub>O bidestilada.
- 3.- Reactivo de oxidación.  
6 gm. de meta-peryodato de sodio a 1,000 ml. de agua bi  
destilada.
- 4.- Reactivo reductor ( Arsenito de sodio ).
- 5.- Reactivo amortiguador de color ( soln. de acetato de amo-  
nio ).

## 6.- Reactivo de color.

Adicionar 1 gota ( 0.05 ml ) de reactivo de color en solución del amortiguador de acetato de amonio ( preparar por lo menos 15 minutos antes de la prueba ).

## 7.- Solución patrón de triglicéridos.

Solución de trioleína en nonana o en cloroformo equivalente a 100 mg.% de triglicéridos.

## 8.- Transesterificador.

Metilato de sodio 0.1 en iso-propanol.

## IV.- Procedimiento.-

	PROBLEMA	PATRON	BLANCO
Reacc. Extracción	2.5 ml	2.4 ml	2.5 ml
Ac. Sulfúrico 0.04 M	0.5 ml.	0.5 ml	0.5 ml
Agua	_____	0.1 ml	0.1 ml
Suero Problema	0.1 ml	_____	_____

Tapar y mezclar por 15 segundos y dejar reposar 1 minuto para separar las fases, centrifugar si es necesario.

Transferir de la fase sup.	0.5	0.5 ml	0.5 ml
Reac. de trasesterificación	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml

Tapar, mezclar e incubar a 60°C 15 minutos

Ac. sulfúrico 0.8 M.	1 ml	1 ml	1 ml
Cloroformo	2 ml	2 ml	2 ml
Tapar, mezclar, dejar reposar, centrifugar si es necesario.			
Transferir de la fase sup.	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
Reac. oxidante	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
Dejar reposar 10 minutos			
Reactivo de reducción	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
Mezclar y dejar reposar 5 minutos			
Reactivo de color	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
Mezclar e incubar a 60°C 10 minutos.			
Enfriar a temperatura ambiente; leer a 425 nm.			

## V.- Cálculos.-

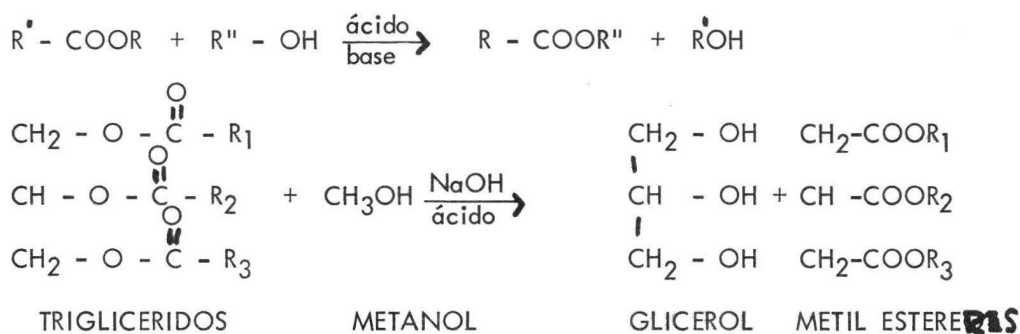
$$\frac{\text{D.O. del problema}}{\text{D.O. del patrón}} \times 100 = \text{mg\% de TG}$$

Valores normales: de 30 a 135 mg. de TG en 12 hs.

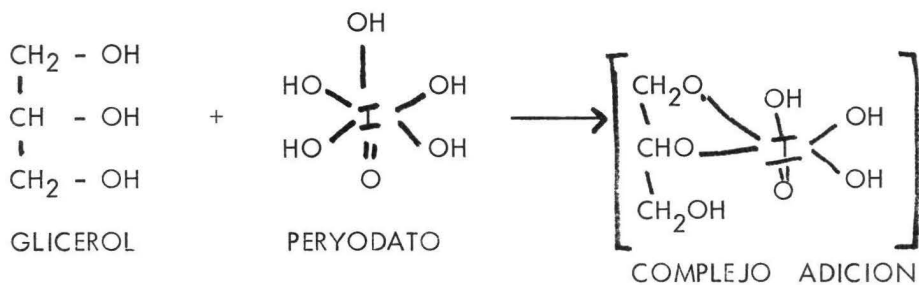
## METODO Jagannathan, S.N.

## I.- Fundamento.-

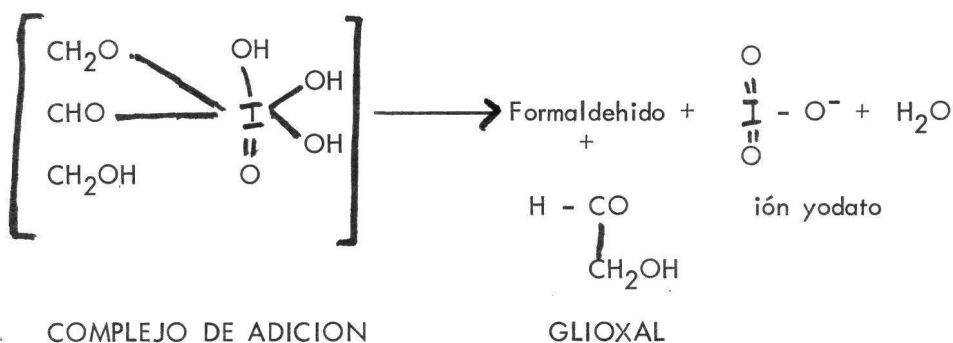
Se efectúa una extracción cuidadosa de los triglicéridos, para — evitar la interferencia de las restantes fracciones lipídicas; una vez aisla— dos los triglicéridos se realiza una transesterificación para obtener glicerol.



En seguida escisión de un átomo de carbono del glicerol por el — ion-peryodato ( sódico ), en este proceso el átomo de carbono perdido se — convierte en formaldehido, este mecanismo de reacción depende de la for— ma hidratada del ion peryodato como se muestra en la siguiente reacción:



Dos de los grupos hidróxilo del ion peryodato hidratado se condensan en dos grupos hidroxilos adyacentes, con eliminación simultánea de una molécula de agua, la estructura cíclica resultante es relativamente inestable y se descompone por una ruptura de un enlace carbono-carbono, entre dos átomos del glicerol adyacentes; de este modo el resto del complejo se vuelve aún más inestable y se descompone para dar formación a un ion yodato, aldehído glioxílico y formaldehído.



Cuando se trata el formaldehído con una solución de ácido cromotrópico ( ac. 4,5 dihidroxi-2,7 naftalensulfónico ) en ac. sulfúrico se forma un complejo color de rosa de composición desconocida; la absorban- cia de la solución colorida es directamente proporcional a la cantidad de formaldehído formado y sigue la ley de Beer.

La extracción de los triglicéridos debe ser cuidadosa ya que está sujeta a la interferencia de otras sustancias que pueden reaccionar con el peryodato, entre éstas están la glucosa, algunos amino ácidos que pueden-

proceder de fosfátidos y algunas reacciones lipídicas. La extracción depende de cada método, en éste es usado el cloroformo seguida de una adsorción de las sustancias de interferencia con Zeolita o Permutita, después una saponificación o trasesterificación para liberar el glicerol y reaccionar con peryodato, el exceso de éste es reducido con bisulfito de sodio y el desarrollo de color con ácido cromotrópico.

## II.- Material y Equipo.-

- a) Tubos de ensaye de 15 x 150 ml.
- b) Pipetas serológicas de 10,5 y 1 ml. graduadas en 0.1 ml.
- c) Baño serológico.
- d) Espectrofotómetro Coleman Junior II

Material biológico: Suero sanguíneo.

## III.- Reactivos.-

- 1.- Reactivos hidróxido de potasio.
- 2.- Ac. sulfúrico.
- 3.- Ac. acético.
- 4.- Meta-peryodato de sodio.
- 5.- Bisulfito de sodio.
- 6.- Ac. cromotrópico.
- 7.- tiourea.

- 8.- Zeolita o permutita.
- 9.- Etanol absoluto.
- 10.- Cloroformo G.R.
- 11.- Eter de petróleo.
- 12.- Solución patrón de triglicéridos de concentración a 100 mg%.

Preparación:

- 1.- Hidróxido de potasio en soln. acuosa.  
Pesar 2.5 gr. de KOH, disolver en H<sub>2</sub>O y llevar a 100 ml.
- 2.- Ac. Sulfúrico 0.7 N.  
Diluir 19.5 ml. de ácido sulfúrico y llevarlo a 1,000 con agua bidestilada.
- 3.- Ac. acético al 6% en soln. acuosa.  
Llevar 6 ml. de ac. acético a 100 ml. con agua bidestilada.
- 4.- Meta-peryodato de sodio 0.025 M.  
Disolver 535 ng. de meta-peryodato de sodio con agua y diluir a 100 ml.
- 5.- Bisulfito de sodio al 10% en soln. acuosa.  
Pesar 10 gm. de bisulfito de sodio, disolver y llevar a 100 ml. con agua destilada.



6.- Ac. cromotrópico.

Soln. A) A 300 ml. de agua añadir 600 ml. de ac. sulfúrico concentrado ( poco a poco y enfriando ).

Soln. B) Disolver 2.24 gm. de 4,5 dihidroxi-2,7 naftalendisulfónico sal - modo sódica en 200 ml. de agua guardar en refrigeración y desechar cuando toma color rojizo.

Soln. C) Mezclar las 2 soluciones anteriores, guardarla en botella de color ámbar en refrigeración. Estable 2 semanas ( generalmente se prepara la décima parte: 90 ml. de A y 20 de B ).

7.- Tiourea al 5% en soln. acuosa.

Llevar 5 gm. de tiourea a 100 ml. de agua destilada.

IV.- Procedimiento.

1.- En un tubo que contenga 3 gm. de permutita y 2 ml. de cloroformo, agregar 0.3 ml. de suero, agitar fuertemente.

2.- Añadir 13 ml. de cloroformo, tapar y agitar bien por 5 minutos, centrifugar a 1,500 rpm. por 5 minutos.

3.- Rotular tres tubos.

	BLANCO	PATRON	PROBLEMA
Cloroformo	5.0 ml	_____	_____
Patrón	_____	5.0 ml	_____

Sobrenadante	_____	_____	5.0 ml
Evaporar el contenido a 60°C			
KOH	0.05 ml	0.05 ml	0.05 ml
Etanol	1 ml	1 ml	1 ml

Mezclar por rotación asegurándose que las paredes de los tubos - sean lavadas; incubar a 60°C 30 minutos.

Ac. Acético	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
-------------	--------	--------	--------

Mezclar por rotación; evaporar a sequedad a 55°C ( puede dejar se toda la noche ).

Eter de petróleo	10 ml.	10 ml	10 ml
Ac. Sulfúrico	3 ml	3 ml	3 ml

Tapar y agitar bien ( la capa etérea contiene lípidos y ac. grasos ) ( la capa ácida inferior contiene el glicerol ).

Descartar lo más posible de la capa etérea aspirándola y medir 2 ml de la capa ácida tapar y colocar en el baño a 60°C, 15 minutos.

Soln. de metaperyodato	0.3 ml	0.3 ml	0.3 ml
------------------------	--------	--------	--------

Mezclar y dejar reposar 10 minutos.

Bisulfito de sodio	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
--------------------	--------	--------	--------

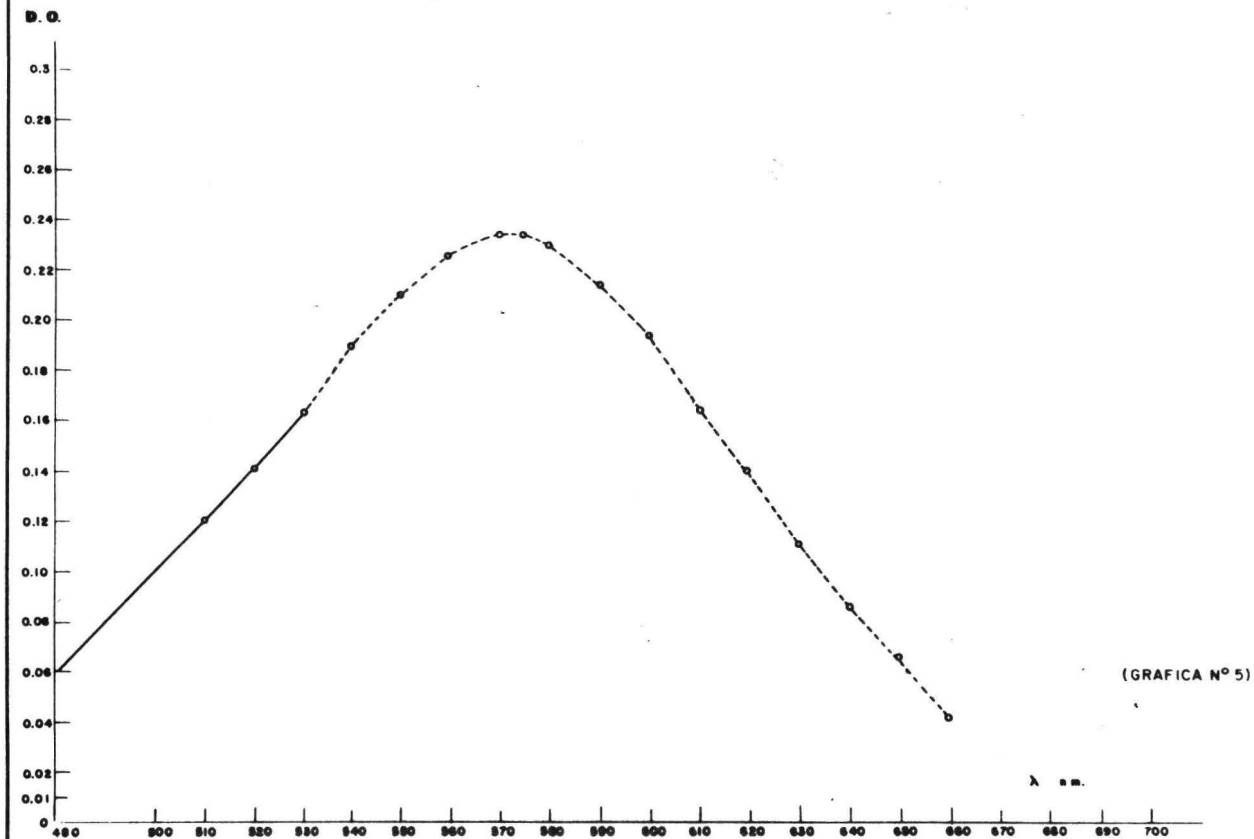
a mezclar

ac. cromotrópico	10 ml	10 ml	10 ml
------------------	-------	-------	-------

Mezclar, tapar y poner en agua hirviente por 30 minutos en la -

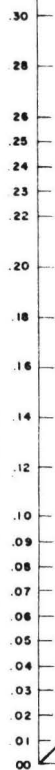


ESPECTRO DE ABSORCION DE COMPLEJO DESCONOCIDO (FORMALDEHIDO)  
METODO JAGANNATAN  
APARATO COLEMAN JUNIOR II  
 $\lambda = 570 \text{ nm.}$



ESTABILIDAD DE LA REACCION DE COMPLEJO DESCONOCIDO (FORMALDEHIDO)  
METODO JAGANNATAN  
APARATO COLEMAN JUNIOR II  
 $\lambda = 570$

D.O



TIEMPO EN MINUTOS

(GRAFICA N°6)

## RESULTADOS

NO. MUESTRA	UV (EGGSTEIN) ( mg % D E	GOTT T R I G L I C E R I D O S )	DADE (ROGER Y HOWARD)	JAGANNATHAN
1	52	50	60	77
2	53	48	58	65
3	73	62	75	76
4	74	70	77	83
5	78	76	75	80
6	78	79	80	92
7	80	75	83	91
8	80	86	85	99
9	86	80	90	115
10	92	76	81	120
11	92	85	80	105
12	96	81	80	110
13	97	87	93	105
14	97	90	102	104
15	100	105	100	110
16	101	95	91	110
17	101	95	90	110
18	101	105	109	120
19	103	101	100	110
20	103	108	103	120
21	103	99	108	119
22	104	98	96	115
23	104	102	102	116
24	105	110	82	116
25	109	110	98	120
26	110	113	117	128
27	115	119	90	95
28	115	107	105	125
29	117	125	113	122
30	119	115	120	128
31	120	123	126	135
32	125	124	120	135
33	127	119	116	136
34	129	120	130	135
35	130	134	121	150

36	131	120	100	135
37	131	140	130	135
38	131	121	130	142
39	134	139	125	150
40	135	156	186	170
41	135	120	123	130
42	135	125	125	145
43	136	130	133	155
44	138	138	140	150
45	139	130	131	152
46	140	129	131	149
47	142	145	145	157
48	143	135	152	159
49	143	136	135	153
50	144	147	150	170
51	145	139	135	158
52	145	140	150	170
53	148	144	150	142
54	150	153	189	170
55	150	165	170	169
56	151	147	140	165
57	152	142	130	160
58	152	143	150	186
59	156	155	152	172
60	159	159	145	150
61	159	140	155	150
62	159	159	170	157
63	160	150	150	204
64	162	147	142	168
65	163	150	140	188
66	164	170	174	185
67	164	160	165	175
68	165	191	173	183
69	166	140	160	170
70	168	147	159	150
71	169	157	163	160
72	169	174	179	182
73	170	162	172	190
74	170	155	146	210
75	170	185	164	167
76	172	167	175	180

77	176	170	168	180
78	176	170	168	180
79	177	160	175	195
80	178	153	183	200
81	178	160	175	195
82	185	178	176	196
83	190	200	180	200
84	191	192	201	210
85	192	182	199	202
86	196	192	199	218
87	200	193	190	209
88	209	204	211	235
89	200	199	190	209
90	209	204	211	245
91	211	203	210	230
92	225	200	230	240
93	227	220	214	235
94	246	238	235	260
95	252	254	246	260
96	255	260	250	269
97	275	275	250	260
98	275	250	270	300
99	285	296	290	297
100	302	290	280	300



CALCULOS ESTADISTICOS DE CADA METODO:

( ULTRAVIOLETA, GOTTFRIED, DADE, JAGANNATHAN )

En el cálculo estadístico de cada método se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n} ; \text{ en donde}$$

$x$  = cada uno de los valores hallados.

= Suma

$n$  = no. total de los valores hallados.

$\bar{x}$  = valor medio.

$$\text{D.S.} = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n}} ; \text{ en donde}$$

$x - \bar{x}$  = la diferencia entre el valor medio ( $\bar{x}$ ) y cada uno de los valores ( $x$ ) observados.

D.S. = Desviación estándar.

$$\text{E.S.} = \frac{\text{D.S.}}{\sqrt{n}} ; \text{ en donde}$$

E.S. = Error estándar.

R.L. =  $y = ax + b$  ; en donde

$a$  = es la pendiente.

$b$  = ordenada al origen.

$x, y$  = son las variables.

$$D.S. = \sqrt{\frac{(x_1 - \bar{x}_1)^2 + (x_2 - \bar{x})^2}{n_1 + n_2 - 2}} ; \text{ donde}$$

$x_1 - \bar{x}_1$  = a la diferencia entre el valor medio ( $\bar{x}$ ) y cada uno de los valores ( $x$ ) o sea la desviación de la media de un método.

$x_2 - \bar{x}_2$  = desviación de la media del segundo método.

$n_1$  = no. de observaciones y nos. de los grados de libertad.

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{D.S.} \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}}$$

CALCULO ESTADISTICO DEL METODO ULTRAVIOLETA

( M. EGGSTEIN Y E.H. KROTZ )

$$\bar{x} = 146.9600$$

$$D.S. = 54.52$$

CALCULO ESTADISTICO DEL METODO GOTTFRIED

$$\bar{x} = 112.5$$

$$D.S. = 54.3512$$

CALCULO ESTADISTICO DEL METODO DADE

( ROGER Y HOWARD )

$$\bar{x} = 144.47$$

$$D.S. = 56.947$$

CALCULO ESTADISTICO DEL METODO JAGANNATHAN

$$\bar{x} = 160.04$$

$$D.S. = 57.27$$

CALCULOS ESTADISTICOS, COMPARACION DE UN METODO CON OTRO METODO ( ULTRAVIOLETA, - DADE, GOTTFRIED, JAGANNATHAN ), REGRESION LINEAL.

ULTRAVIOLETA ( M. EGGSTEIN, F.H. KROTZ ) - GOTTFRIED

$$y = ax + b$$

$$a = 0.9898$$

$$b = 5.9169$$

x; y = Son variables

$$R(x,y) = 0.987$$

$$E.S. = 8.62$$

$$t_1 = 0.579$$

DADE - GOTTFRIED

$$y = ax + b$$

$$a = 1.0218$$

$$b = 1.1419$$

$x, y =$  Son variables.

$$R(x,y) = 0.975$$

$$E.S. = 12.653$$

$$t_2 = -0.250$$

JAGANNATHAN - GOTTFRIED.

$$y = ax + b$$

$$a = 0.9833$$

$$b = 19.9227$$

$x,y =$  Son variables

$$R ( x, y ) = 0.933$$

$$E.S. = 20.713$$

$$t_3 = -2.221$$

ULTRAVIOLETA ( M. EGGSTEIN F.H. KRTOZ ) - DADE ( ROGER,  
HOWARD ).

$$y = ax + b$$

$$a = 0.9331$$

$$b = 12.1549$$

$x,y =$  Son variables

$$R ( x y ) = 0.974$$

$$E.S. = 12.305$$

$$t_4 = -0.316$$

## ULTRAVIOLETA ( M. EGGSTEIN F.H. KROTZ ) - JAGANNATHAN

$$y = ax + b$$

$$a = 0.9949$$

$$b = 13.8362$$

$x, y$  = Son variables

$$R ( X, y ) = 0.947$$

$$E.S. = 18.474$$

$$t_5 = -1.654$$

## DADE ( ROGER, HOWARD ) - JAGANNATHAN

$$y = ax + b$$

$$a = 0.9433$$

$$b = 23.7610$$

$xy$  = Son variables

$$R ( x y ) = 0.938$$

$$E.S. = 19.979$$

$$t_6 = -1.928$$

## CALCULOS ESTADISTICOS ( T ) DE STUDENTS.

Hay una diferencia significativa entre los Grupos a un 99%.

Si T de Students de los Grupos son:

$$t_1 = -0.579$$

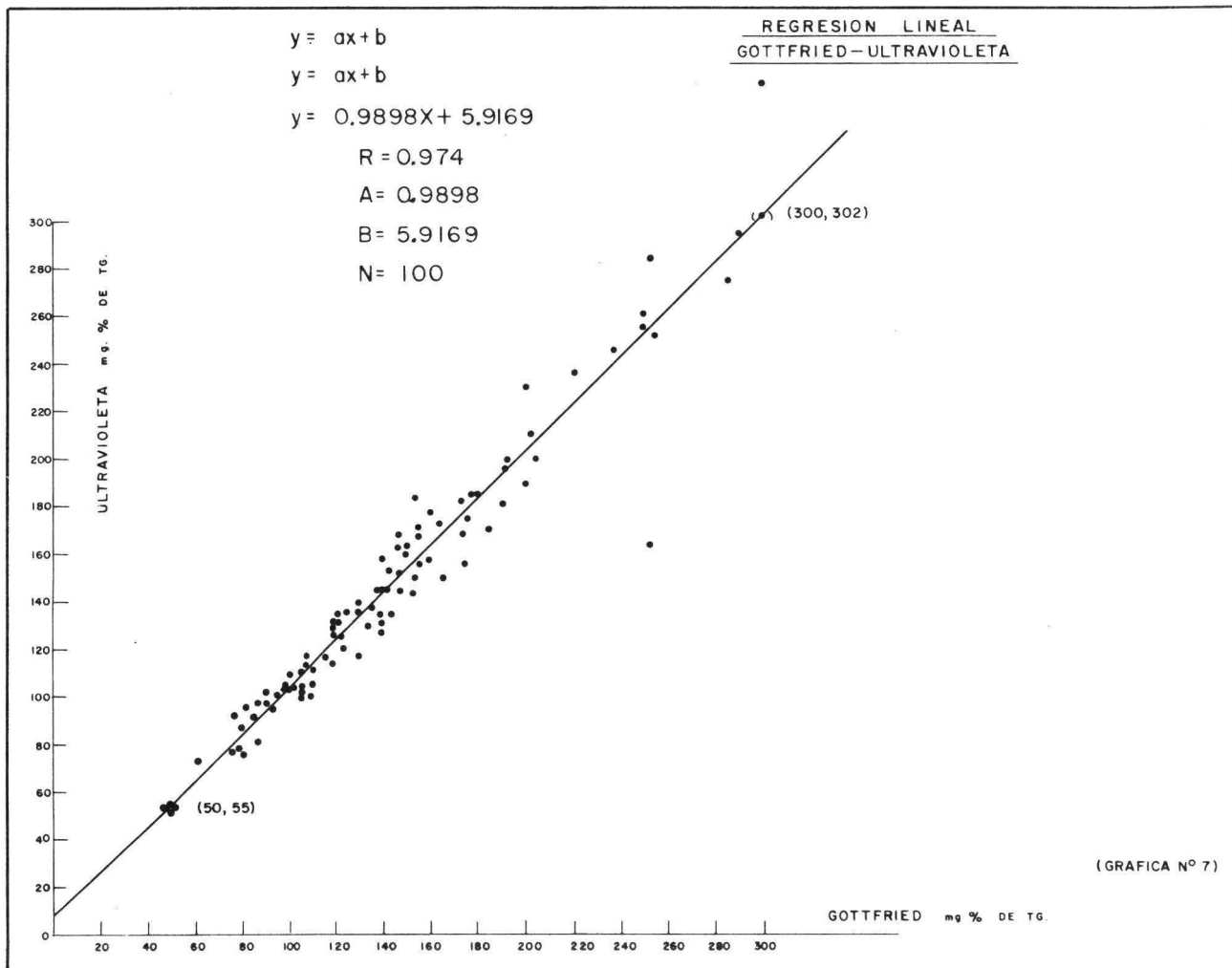
$$t_2 = -0.250$$

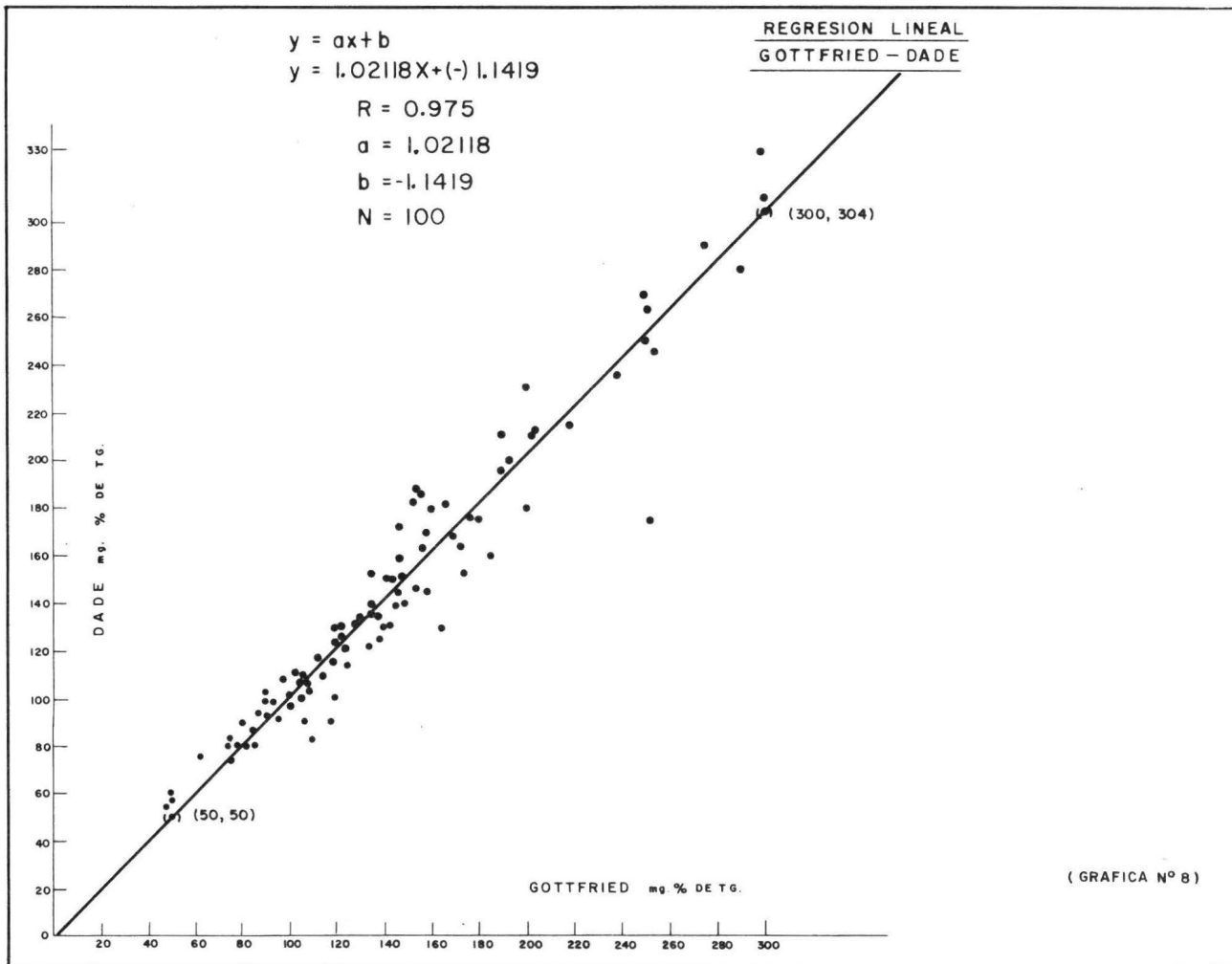
$$t_3 = -2.221$$

$$t_4 = -0.316$$

$$t_5 = -1.654$$

$$t_6 = -1.928$$



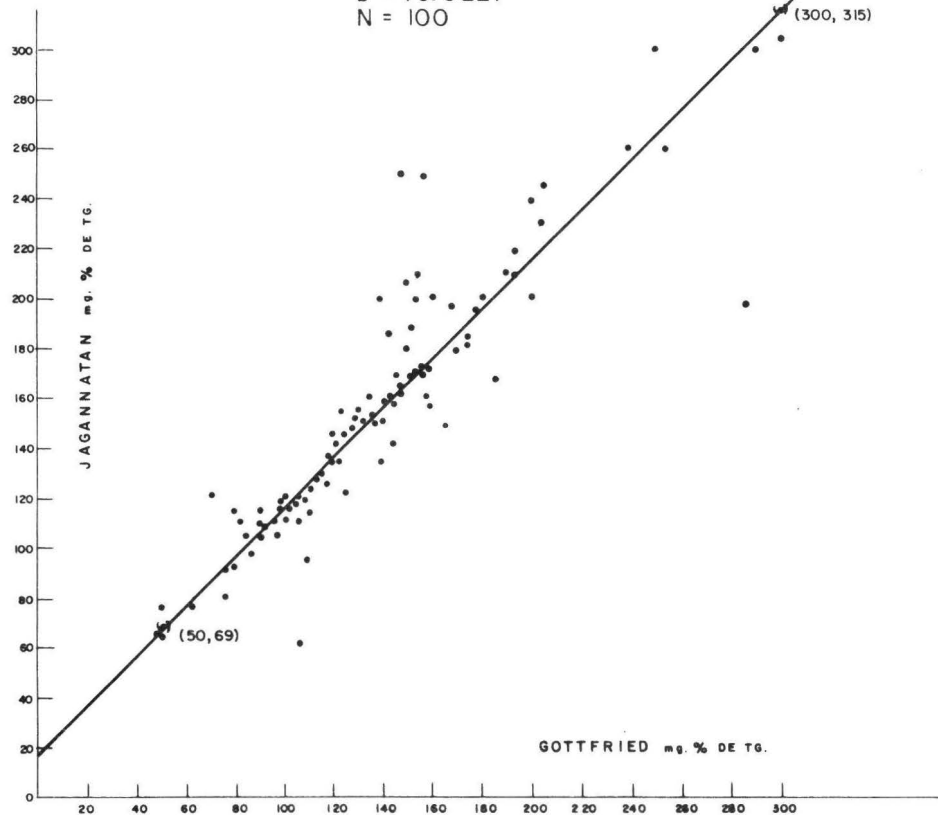




$$y = ax + b$$
$$y = 0,9833X + 19,9227$$

REGRESION LINEAL  
GOTTFRIED - JAGANNATAN

R = 0,933  
a = 0,9883  
b = 19,9227  
N = 100

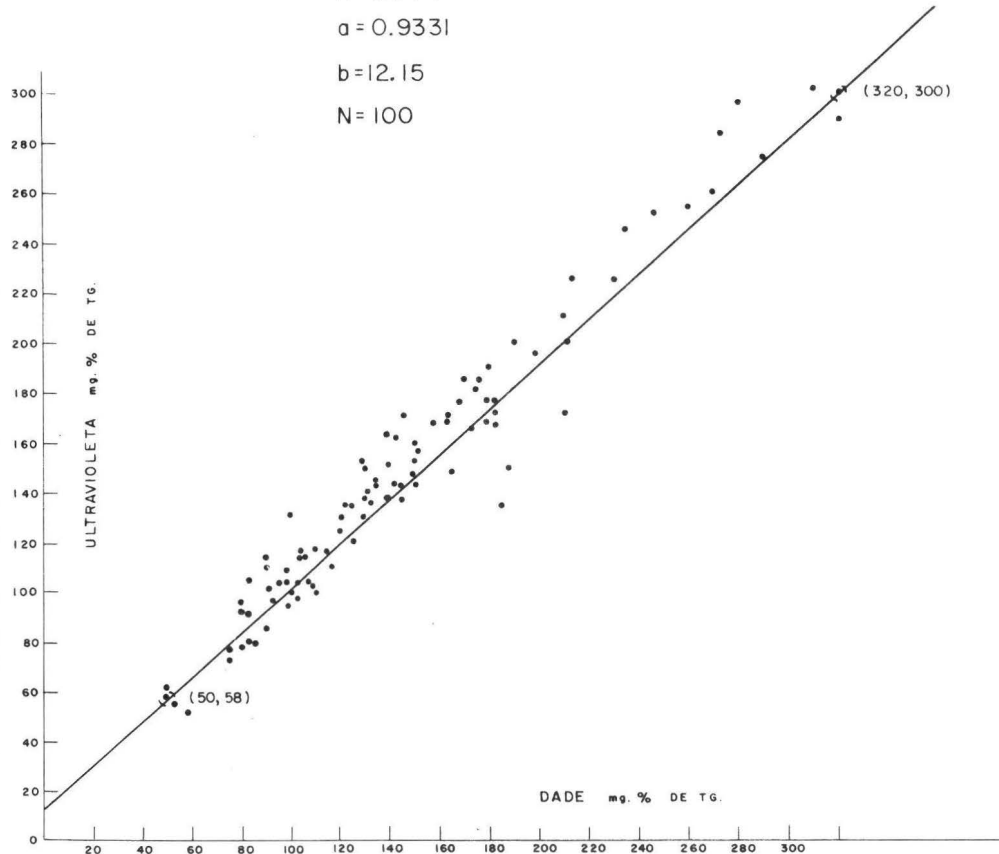


(GRAFICA N° 9)

$$y = ax + b$$
$$y = 0.9331X + 12.15$$

REGRESION LINEAL  
DADE - ULTRAVIOLETA

$R = 0.974$   
 $a = 0.9331$   
 $b = 12.15$   
 $N = 100$

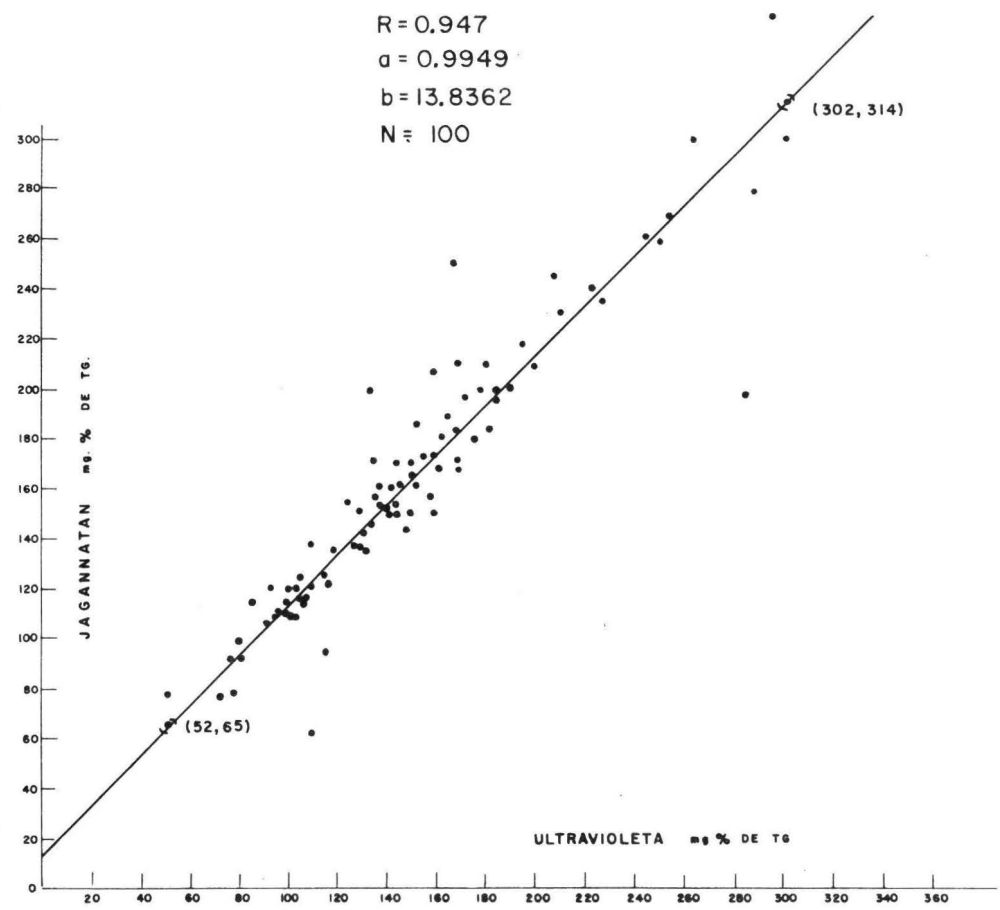


(GRAFICA N° 10)

REGRESION LINEAL  
ULTRAVIOLETA - JAGANNATAN

$$y = ax + b$$
$$y = 0.9949X + 13.8362$$

$R = 0.947$   
 $a = 0.9949$   
 $b = 13.8362$   
 $N = 100$

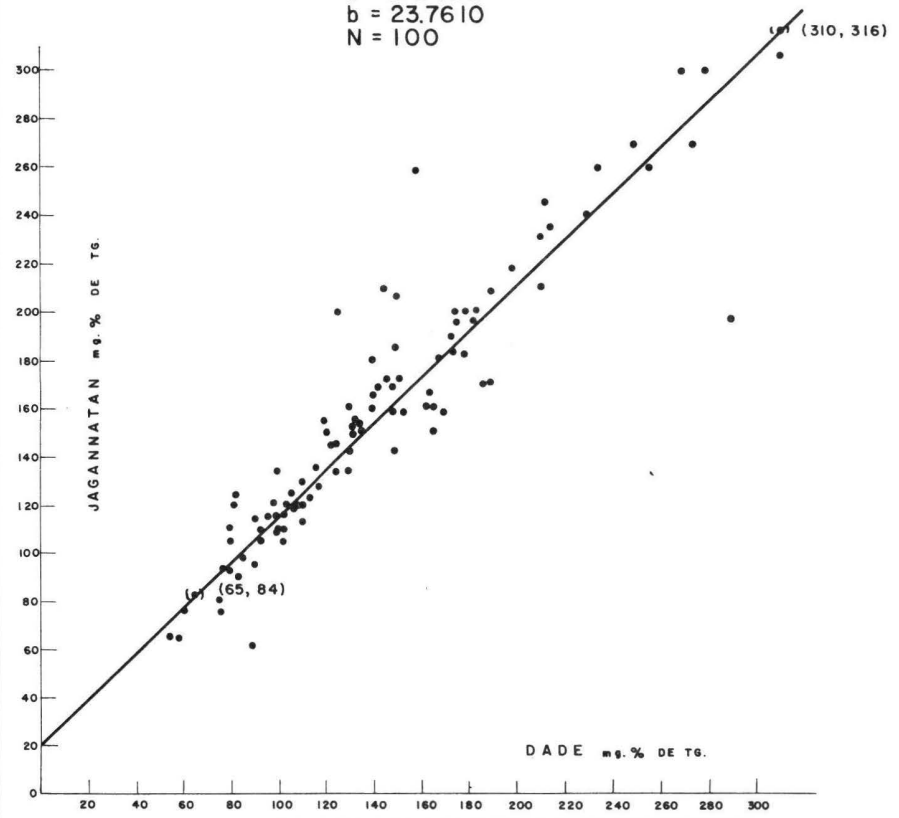


(GRAFICA Nº 11)

$$y = ax + b$$
$$y = 0.9433X + 23.7610$$

REGRESION LINEAL  
DADE - JAGANNATAN

R = 0.938  
a = 0.9433  
b = 23.7610  
N = 100



(GRAFICA N° 12)

## D I S C U S I O N

- I.- Al hacer la revisión sobre los resultados obtenidos por los 4 métodos observamos que en los métodos Ultravioleta y Gottfried, los valores son ligeramente más bajos ( 10-15% ) comparados con los métodos - DADE y Jagannathan, valores que en realidad no interfieren en la estimación clínica de un paciente. Sin embargo, podemos observar que en las muestras ( 16-17-24-27 ) del método DADE, existen valores más bajos que en los métodos de Ultravioleta y Gottfried, esto es probable debido a las dificultades técnicas a causa del número de bases que se lleven en los diferentes métodos.
  
- II.- La Estabilidad de la reacción y espectros de absorción de los 4 métodos, nos damos cuenta que según gráfica ( 1 ) Método Ultravioleta, la absorción máxima la tenemos a 344 y 366 nm y por lo cual se escogió la de 366 nm debido al aparato usado ( Coleman Junior II ) siendo la estabilidad de la reacción ( gráfica 2 ) estable por 25 minutos mínimo; en el método Gottfried y DADE, de acuerdo al espectro de absorción ( gráfica 3 ) a 425 nm es la mayor absorbancia de la reacción colorida de acuerdo con la estabilidad de la --

reacción ( gráfica 4 ) podemos efectuar la lectura a partir de los - 5' y el valor permanece durante varias horas.

En el método Jagannathan de acuerdo al espectro de absorción - ( gráfica 5 ) la máxima absorbancia se produce en la cual nosotros vimos a 570 nm, y la estabilidad de la reacción según ( gráfica 6 ) se inicia a los 10' de efectuada la reacción colorida permanciendo más allá de los 25'.

III.- Al efectuar la regresión lineal de los métodos comparados de acuerdo a los cálculos estadísticos utilizándose las gráficas ( 7,8,9,10,- 11,12 y 13 ).

	REGRESION LINEAL	(T) DE STUDENTS
Ultravioleta/Gottfried	R = 0.987	T1 = 0.579
Dade/Gottfried	R = 0.975	T2 = 0.250
Jagannathan/Gottfried	R = 0.933	T3 = 2.221
Dade/Ultravioleta	R = 0.974	T4 = 0.316
Jagannathan/Ultravioleta	R = 0.947	T5 = 1.654
Jagannathan/Dade	R = 0.938	T6 = 1.928

De acuerdo con esta la hipótesis es la siguiente:

Ho:  $M_1 = M_2$  y no hay diferencia esencial entre los grupos.

H<sub>1</sub>:  $M_1 \neq M_2$  y si hay diferencia esencial entre los grupos.

Con un ensayo bilateral al nivel de significación del 0.01 se eliminará la hipótesis  $H_0$ , si  $T$  se encuentra fuera del rango  $t_{0.995}$  a  $-t_{0.995}$ , y que para  $(N_1+N_2-2) = 100+100-2 = 198$  grados de libertad,  $-t_{0.995}$  a  $t_{0.995} = 258$  a  $258$  leído en tablas de acuerdo con los grados de libertad, así pues no se puede rechazar  $H_0$  ya que se encuentran todas las  $(t_1, t_2, t_3, t_4, t_5, t_6)$ , dentro del nivel de significación 0.01 ó sea 99% de confianza por lo que se deduce que no hay diferencia significativa entre la determinación de los grupos, y por los datos obtenidos estadísticamente de los métodos estudiados podemos utilizar cualquiera de ellos para la determinación de triglicéridos ya que no se observa diferencia significativa en ninguno de ellos.

IV.- Por último nos queda la comparación de los métodos en cuanto a costo, el método Ultravioleta fué determinado con equipo comercial de Boehringer Mannheim con un costo de \$1,099.00 por 100 determinaciones, costo aproximado de cada determinación \$11.00 de acuerdo al método.

El método de DADE se utilizó equipo comercial con un valor de \$1,000.00 por 100 determinaciones, costo por cada determinación de \$10.00

El método de Gottfried se prepararon los reactivos según el método

do y con un costo por cada determinación de \$ 3.00.

Para el método de Jagannathan, también fueron preparados los reactivos dando un costo por determinación de \$ 9.00.

De acuerdo a la metodología, nos podemos dar cuenta del tiempo aproximado que se toma para efectuar cada determinación.

En el método de:	Se emplearon:
1) Gottfried	30 minutos
2) DADE	55 minutos
3) Ultravioleta	60 minutos
4) Jagannathan	24 horas



## RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se tratan generalidades sobre lípidos haciendo hincapié sobre los triglicéridos por la importancia de las lipidemias.

Se describen el material y métodos empleados con detalle de:

- 1.- Método de Ultravioleta de Eggstein.
- 2.- Método de DADE de ( Roger y Howard ).
- 3.- Método de Gottfried y Rosenberg, y
- 4.- Método de Jagannathan.

Se reportan los resultados de cada uno de ellos.

Se reportan los cálculos estadísticos empleados donde encontramos:

$\bar{X}$  = Valor medio.

DS = Desviación estándar.

ES = Error estándar.

RL = Regresión lineal.

T = T de Students.

Discusión sobre los métodos.

Por lo anteriormente expuesto, y por los resultados observados en

la práctica, podemos pensar, que el método de Rosenberg y Gottfried es el más fácil de emplear en el laboratorio de análisis no especializado, como ayuda al clínico en el tratamiento y diagnóstico de las hiperlipidemias.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Carlson L.A. and Wastrom L.B.; Clin Chim Acta 4-197 ( 1959 ).
- 2.- Correlacion y Regresion, Introduccion a la Bioestadística; Hober, Harper; Editorial Universitaria de Buenos Aires, Pág. 176, 199 ( 1970 ).
- 3.- Dole, V.P. P.J. Clin Invest 35, 150 ( 1956 ).
- 4.- Dole V.P. and Munertz H., Microdetermination of long chain fatty acids in plasma an tissus, J. Lab. Clin med. 50 152 ( 1957 ).
- 5.- De la Rosa John Dr. Hiperlipoproteinemia medicina de Post Grado. - 1 - 30 - 35 ( 1973 ).
- 6.- Fredrickson D.S., Levy R.I. Leas R.S.: Fat transport in Lipoproteins - an integrad approach to mechanisms and lisorders. N. Engel J. -- Med. 276: 34 ( 1967 ).
- 7.- Fredrickson Donald S. Edwin L. Bierman, Eduardo Zorrilla, Hewan - A. Dewar. Simposium sobre Hiperlipidemias, Sociedad de Nutrición y Cardiología Febrero ( 1971 ).
- 8.- Gottfried Sidney P. and Bernard R. Inproved Manual Spectrometric - procedure for determination of Serum Triglicerides; Clin Chim 18: -- 1079 ( 1973 ).
- 9.- Galleti F. An. Inproved Colorimetric Micromethod the determination of Serum Glicerides, Clin Chin Acta 15: 184-186 ( 1967 ).
- 10.- Harper, Harold A. Manual de Química Fisiológica. Manual Moderno 229 ( 1965 ).
- 11.- Jagannathan S.N., The Determination of plasma triglicerides; Canadian Journal of Biochemistry 42 566-570-(1964).

- 12.- Levy A.L., Triglicerides by nanane Extraction and colorimetry. Manual Automated. Ann Clin Lab Sci 6 474 ( 1972 ).
- 13.- Mazur y Harrow, Bioquímica Básica, Nueva Editorial Interamericana. p. 305 ( 1973 ).
- 14.- Murray R. Spiepelbh. Teoría y Problemas de Estadística, Serie y - - Compendios Schaums. Pág. 192 - ( 1973 ) Cali, Col.
- 15.- Nueva Ayuda para el Paciente Ateros Clerótico; Searle de México.
- 16.- Tietz, N. W. Química Clínica Moderna, Primera Edición en Español, Editorial Interamericana, México ( 1972 ).
- 17.- Roger Max and Howard Ko, A Simplified Semiautomated Assay For - Plasma Triglicerides Analytical Biochemistry 29, 405 - 416 ( 1969 ).
- 18.- Tracht, Myron E. Dr. Lipidos Sericos Tribuna médica 2 C - 13 - - C - 16 Agosto ( 1973 ).
- 19.- Van Handel E. Suggested Modification of the Microdetermination of - Triglicerides; Clin Chim 7 249 ( 1967 ).
- 20.- Van Handel E. and Zilversmit D. B. Micromethod for Direct Deter - mination of Serum Triglicerides J. Lab. Clin Med. 50 152 ( 1957 ).