

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

**MODIFICACION AL METODO DE ZOLHNER Y KIRSCH,
PARA DETERMINACION DE LIPIDOS TOTALES.
OBTENCION DE VALORES NORMALES**

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

ENRIQUE SOLIS CANCINO

México, D. F.

1977



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

LAB Tesis 1977

VDS [REDACTED] 375

BCHA _____

RDC 374



QUIMICA

PRESIDENTE Guadalupe Vélez Pratt.

VOCAL Leticia Carrasco Rivera.

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE
SEGUN EL TEMA:

SECRETARIO Dea Coronado Perdomo.

1er. SUPLENTE Ma. Elena Bustamante C.

2do. SUPLENTE Esther Gutiérrez.

SITIO DONDE SE DESARROLLO
EL TEMA:

Demyle Consultoras Médicas.

NOMBRE COMPLETO Y FIRMA DEL SUSTENTANTE: Enrique Solís Cancino.

NOMBRE COMPLETO Y FIRMA DEL ASESOR DEL TEMA: Dea Coronado Perdomo.

A MIS PADRES

A Luz del Ca rmen, Quique y Cholita.

A mis familiares y amigos.

INDICE

	Pág.
INTRODUCCION.....	4
GENERALIDADES.....	6
MATERIAL Y METODOS.....	20
RESULTADOS.....	23
DISCUSION.....	59
RESUMEN.....	62
CONCLUSIONES.....	64
BIBLIOGRAFIA.....	66

INTRODUCCION

La cantidad de lípidos totales, depende de la cantidad de las grasas sanguíneas: colesterol total, fosfátidos y triglicéridos. En el aumento de los lípidos totales (hiperlipidemia), están elevadas una o más de estas fracciones.

Se han descrito diversos procesos para la determinación de lípidos totales en suero. De todos los métodos desarrollados se acepta generalmente, que los que se aproximan mas a la realidad son los métodos gravimétricos. No obstante, estos resultan excesivamente laboriosos y a nuestro juicio, no son adecuados para la rutina de laboratorio.

Para ayuda diagnóstica en el metabolismo lipídico, y por las dificultades que la metodología presenta, buscamos adaptar un método fácil, exacto y reproducible como objeto de este trabajo.

Con estas características, surge en 1962, el método de Zollner y Kirsh, al cual le hicimos diversas modificaciones en función de cambios de volumen y tiempo-temperatura. Asimismo determinamos valores normales de lípidos totales en suero, considerando que nuestra alimentación, raza, medio ambiente, etc., son diferentes a las de la población en la cual se determinaron los valores normales originalmente.

Así pues, esperamos que las modificaciones hechas a la técnica original, sean adecuadas para un estudio rápido en la cuantificación de los lípidos séricos totales.

GENERALIDADES

La determinación de los lípidos séricos, nos da información sobre la cantidad de colesterol determinable químicamente, de triglicéridos, y eventualmente de otras fracciones que en un momento dado circulan en el sistema vascular. Como paso preliminar de la determinación, se tiene la destrucción de los complejos lípidos-proteína existentes en estado original. Estos vehiculos sirven para el transporte de lípidos dentro del organismo, ya que la fase acuosa primaria no permite una verdadera solución en los espacios intra y extracelulares, ni en el espacio vascular.

Un sistema altamente diferenciado se encarga por una parte de --- reabsorber y repartir el material lipídico exógeno, y por otra parte de -- transportar grandes cantidades de substancias grasas dentro del organismo, sobre todo entre el tejido graso y el hígado.

Las diversas clases de vehiculos serán descritos uno tras otro, y con ello, las vías de los materiales lipídicos exógenos y endógenos. De todo ello se puede deducir las posibles alteraciones en el sistema de transporte, y se hacen comprensibles síntomas, síndromes y cuadros morbosos importantes para la clínica.

A. - VEHICULOS DEL TRANSPORTE LIPIDICO.

1. - Acidos grasos libres o no esterificados (AGL)

Esta fracción tiene en cuanto a su volumen, poco significado, con una participación del 2 al 3% en los lípidos totales, lo cual significa una concentración plasmática media de 10 a 20 %. Aproximadamente, cada 8 ácidos grasos están almacenados en forma laxa a una molécula de albúmi-

na. Metabólicamente, se trata de la fracción mas activa, importando la capacidad de transporte alrededor de 500 g. cada 24 horas. Tales cantidades se alcanzan ciertamente, tan solo en estado de hambre. Los mas importantes estímulos de la liberación de AGL (es decir, de la lipolisis del tejido graso), son: la adrenalina, el hambre, el ACTH, etc. Los hidratos de carbono, la insulina, o el ácido nicotínico, por ejemplo, bloquean la lipolisis.

Para la clasificación de la hiperlipidemias no consideradas clínicamente, tienen poco interés los AGL.

2. - Alfa-lipoproteínas .

Estos complejos lipoproteicos, así llamados teniendo en cuenta su migración electroforética, están constituidos en un 50 % por alfa globulina o A-proteína, y la otra mitad por fosfátidos y colesterol a su vez en relación 3:2. El lugar principal de formación es el hígado; sin embargo, existe un mecanismo humoral de control de origen renal, como muestra la falta de alfa-lipoproteínas tras nefrectomía total. Las alfa-lipoproteínas, parecen tener significado en el transporte lipídico en el espacio extracelular.

3. - Beta-lipoproteínas.

Estas partículas, también llamadas lipoproteínas de baja densidad por sus propiedades en ultracentrífuga, tienen forma elipsoidal. La fracción proteica es una beta-globulina también llamada B-proteína, y se diferencia de forma típica de la A-proteína, por sus aminoácidos N-terminales.

La fracción proteica constituye aproximadamente el 25 %; la de colesterol el 40 %; la de fosfátidos el 20%, y la de triglicéridos el 10 % como máximo. Las beta-lipoproteínas, son el vehículo más importante del colesterol sérico.

Hoy en día está demostrado que las beta-lipoproteínas, son sintetizadas fundamentalmente en el hígado, siendo sin embargo desconocidos los órganos encargados del control de esta función. También está demostrada su formación en las células epiteliales del intestino delgado.

4. - Pre-beta-lipoproteínas

Son designadas según su separación con ultracentrífugas, como lipoproteínas de muy baja densidad, y las concentraciones de esta fracción son muy pequeñas en condiciones fisiológicas. El contenido asciende aproximadamente, al 10 %. La proteína no es homogénea; junto a una parte mayor de B-proteína, existe también A-proteína; la demostración de una C-proteína propia de la fracción, no ha sido conseguida por ahora. El contenido en triglicéridos varía entre el 50 y 60 %; el colesterol constituye aproximadamente, el 12 %, y los fosfátidos, el 18 %. El tamaño de estas partículas varía entre 50 y 80 milimicras. Concentraciones elevadas llevan a enturbiamiento del suero.

Se forman en el hígado, y el aporte exclusivo de hidratos de carbono, produce una elevación de su concentración en el plasma a través de un aumento de la síntesis y/o una lenta eliminación.

5. - Quilomicrones

Estos protadores de lípidos son los mayores y fueron los primeros en ser conocidos; tienen diámetro aproximado de 200 a 500 milimicras y están formados, en un 85 %, por triglicéridos, mientras el contenido proteico, importe 0.5 a 2.5 %, y el resto se divide entre colesterol y fosfátidos. Es característica la pequeña proporción de colesterol esterificado. La formación se verifica en dependencia del aporte alimentario de grasas a la célula epitelial intestinal; los componentes proteicos son allí regulados. La fracción proteica se comporta como una B-proteína.

En condiciones fisiológicas y de ayuno absoluto, apenas son demostrables los quilomicrones. Gracias a su fuerte poder de refracción de la luz, pequeños aumentos llevan a enturbiamientos del suero susceptibles a ser medidos. Elevadas concentraciones, prestan al suero un aspecto cremoso o lechoso.

B. - TRANSPORTE DE LIPIDOS EXOGENOS.

En representación simplificada, se pueden diferenciar los siguientes pasos:

1. - Digestión.

La grasa de la alimentación es emulsionada en el duodeno-yeyuno, bajo la acción de lipasas pancreáticas y ácidos biliares. Los triglicéridos son divididos al mismo tiempo, hasta el estado de ácidos grasos libres, glicerol, mono y diglicéridos. Estos productos secundarios forman micelas con las sales biliares.

2. - Reabsorción.

La reabsorción de los productos secundarios se realiza en el duodeno y yeyuno, y en pequeña proporción en el ileon. Una pequeña parte de triglicéridos podrían ingresar en las células mucosas por pinocitosis. La lipasa intestinal, permite la continuación de la hidrólisis.

3. - Resíntesis.

Con la participación de alfa-glicerofosfato del metabolismo hidrocarbonado y de ácidos grasos libres del tejido adiposo, se sintetizan de nuevo en la célula intestinal los triglicéridos. En su camino a través del retículo endoplásmico, se forman por mecanismos no bien conocidos, -- quilomicrones con la incorporación de B-proteína, fosfátidos y principalmente, colesterol libre.

4. - Quilomicrones.

A través del espacio intracelular los quilomicrones llegan a los capilares linfáticos, y de allí son transportados por el conducto torácico, hasta la parte venosa de la circulación mayor.

5. - Eliminación o aclaramiento de los quilomicrones.

Se realiza en parte por el hígado, tras la desintegración de diversas moléculas de triglicéridos, aparecen las pequeñas partículas secundarias que vuelven a la circulación. Los quilomicrones se incorporan, en parte inalterados, a los adipocitos, en donde son hidrolizados, bajo la acción de la lipoproteinlipasa. Esta hidrólisis se verifica también, en peque

ña proporción, en el espacio intravascular bajo el efecto de esta enzima.

Algunos de estos mecanismos no están, hoy en día, completamente aclarados. Por ejemplo, no se conoce con exactitud como llegan los quilo micrones a las vías linfáticas y alcanzan intactos la célula adiposa. --- También es digno de mención el poder de discriminación de la célula de la mucosa para la longitud de cadena de los diversos ácidos grasos.

C. - TRANSPORTE DE LIPIDOS ENDOGENOS

En general, se diferencian dos vías principales de transporte:

a). - De las células adiposas al hígado, músculo y otros órganos. -

En esta dirección son acarreados exclusivamente ácidos grasos libres, -- que bajo el influjo de diversos estímulos lipolíticos, son liberados de los adipocitos. Según la situación energética, son oxidados directamente los- AGL en los diversos órganos, o bien en los excesos de aporte calórico, son conducidos al hígado, en donde tiene lugar la neoformación de triglicéridos y fosfátidos. Los triglecéridos recién sintetizados, bajo la acción de me-- canismos de regulación desconocidos por el momento, son o bien deposita-- dos en la célula hepática, o bien devueltos al sistema, tras la incorporación de beta o pre-beta-lipoproteínas.

b). - Del hígado a la célula adiposa y a otros órganos. La totalidad - de los vehiculos de transporte, con la excepción de los ácidos grasos libres y de los quilomicrones, llevan esta dirección y son incorporados principal-- mente en el tejido adiposo. En los que se refiere a cantidad, son fundamen-- talmente triglicéridos los transportados, en forma de pre-beta-partículas -

por esta vía. La concentración de estos triglicéridos asciende, sobre todo en la alimentación hidrocarbonada exclusiva.

c). - Finalmente, debemos mencionar el flujo lipídico en la circulación enterohepática: principalmente fosfátidos, y en menor cantidad colesterol, llegan al intestino delgado disueltos en la bilis; tras la reabsorción, vuelven a circular la mayoría de los mismos formando parte de los quilomicrones.

D. - FRACCIONES QUIMICAS

El clínico pide normalmente al laboratorio, la determinación de colesterol y triglicéridos, o también de otras fracciones químicas en el suero. La hiperlipidemia se define tomando como base las determinaciones químicas. El aumento puede referirse tanto a los lípidos totales como a diversas fracciones por separado.

La base de la definición de una hiperlipidemia se centra en la concentración de los diversos componentes químicos en condiciones fisiológicas. Dicha concentración es posible darla únicamente sobre la base de criterios estadísticos.

METODOS PARA LA DETERMINACION DE LIPIDOS.

Se han publicado diversos procedimientos para la determinación de los lípidos totales en suero; desgraciadamente, ninguno de estos procedimientos es absolutamente satisfactorio. Vamos a revisarlos brevemente a continuación:

Gravimétricos. - En este tipo de procedimientos, se extraen los lípidos, se desecan y se pesan luego. En una técnica de esta clase se ex--

traen en primer lugar los lípidos mediante la mezcla de Bloor (3 vol. de etanol mas 1 vol. de éter etílico) el extracto se deseca y se vuelve a extraer con éter de petróleo, y este último extracto se deseca y se pesa. La mezcla etanol-éter consigue disociar los lípidos de sus conjugados proteicos y los extrae, pero en esta extracción, se arrastran también cantidades significativas de otras substancias, tales urea, glucosa, glutatión, ácido úrico, creatinina y sales inorgánicas. La reextracción con éter de petróleo, elimina la mayor parte de los componentes no lipídicos, aunque este último solvente extrae también pequeñas cantidades de material no lipídico, por ejemplo urea y aminoácidos. Ese material no lipídico no es en sí, soluble en éter de petróleo, pero la presencia simultanea de lípidos en la mezcla altera esa situación. Otra técnica de extracción utilizada, es la que aplica el etanol-éter y luego extracción del residuo desecado con cloroformo y luego con éter de petróleo. También se ha utilizado una extracción inicial con etanol-acetona, seguida de extracción con éter de petróleo. En la técnica de Sperry y Brand, la primera extracción se hace con metanol-cloroformo, y ese extracto se purifica, separando el material no lipídico por difusión con agua. Si se desecan los extractos lipídicos en contacto con el aire, y sobre todo, si la desecación se lleva a cabo a temperaturas elevadas, los lípidos son parcialmente oxidados. Esto puede tener importancia si se van a determinar en los extractos desecados, el colesterol o los fosfolípidos, pero carece de importancia si el residuo se va a pesar, solo para la determinación de lípidos totales. Puede evitarse si se desea, la oxidación llevandose a cabo la desecación bajo CO_2 ó N_2 .

Otra técnica propuesta comprende la extracción con etanol-éter, - después se procede a la hidrólisis alcalina, neutralización, seguida por - extracción con éter de petróleo, desecación y pesada. Este método determina los ácidos grasos totales mas el colesterol, pero no incluye la porción glicerol de la molécula.

En las técnicas anteriormente mencionadas, se disocian los lípidos de sus complejos proteicos, y se extraen con una mezcla de solvente soluble en agua y otro no soluble en ella. Este extracto contiene sustancias no lipídicas que se eliminan por lavado con agua, o por reextracción con un - solvente no miscible en ella.

Nefelométricas. - Este tipo de técnicas fueron tal vez las primeras que se preconizaron para la determinación de los lípidos totales, y consisten en la extracción con etanol-éter, seguida por saponificación y adición - de agua, o por acidificación. En ambos casos se produce un enturbiamiento, el cual teóricamente es proporcional a la concentración de lípidos. --- Desgraciadamente, este tipo de técnicas están afectadas por errores sumamente importantes resultantes de variables no controladas, y del hecho de que los diferentes lípidos que integran la mezcla existente en los extractos dan distintos enturbiamientos; por todas estas razones, estos métodos prácticamente no se utilizan. Naturalmente, el enturbiamiento se leía, en estos procedimientos, por nefelometría.

Turbidimétricas. - En el año de 1953, se volvieron a usar las determinaciones nefelométricas, empleando esta vez un procedimiento en el cual se extraen los lípidos con etanol-éter, se deseca el extracto y se disuelven los lípidos del mismo en dioxano; se añade ácido sulfúrico, y se determina -

el enturbiamiento resultante por turbidimetría.

Gasométricas . - Se puede determinar por gasometría el carbono de los lípidos totales existentes en un extracto purificado de los mismos.

Volumétricas . - Se trata de una aplicación de la técnica de Babcock para la determinación de los lípidos séricos. Se añade ácidos, álcali o detergente en cantidades suficientes para separar los lípidos de sus conjugados proteicos. Por centrifugación se consigue que los lípidos se situen en el estrechamiento calibrado de un tubo especialmente utilizado para este fin, y -- del volumen ocupado por esos lípidos en el tubo, se deduce directamente su concentración.

Técnica de Swahn . - En 1953, Swahn introdujo un método consistente en la aplicación de 20 microlitros de suero a un papel filtro, el cual se desecaba, y se teñía luego con negro sudán; luego se lavaba y se eluía el colorante, el cual se determinaba cuantitativamente por fotometría. Los resultados de este procedimiento se estandarizaron con un método gravimétrico y, según su autor, mostraban una excelente correlación con él. Esta técnica tiene en principio dos ventajas, que son la escasa cantidad de muestra necesaria y la relativa simplicidad de la misma, que la hacen muy atractiva. Sin embargo se ha asegurado que el método es inexacto, a causa de que los diversos lípidos se tiñen con diversas intensidades.

Fotométricos . - En 1928, Milroy publicó una técnica en la cual se extrañan los lípidos, hidrolizándolos luego; una vez hidrolizados se extrañan los ácidos grasos con éter de petróleo, se desecaba el extracto y se medía - cuantitativamente, los ácidos grasos existentes en el mismo a partir de la -

formación de una sal coloreada con la base azul nilo.

Acidimétricas: - Estas técnicas determinan los lípidos totales en términos de los ácidos grasos totales derivados de los triglicéridos, fosfolípidos, ésteres de colesterol y ácidos grasos no esterificados. Se extraen los lípidos y se saponifican por adición de álcali por adición de álcali, separándose los ácidos grasos los cuales se disuelven en alcohol, y se titulan con un álcali estandarizado, utilizándose como indicador azul de timol. Los resultados pueden expresarse en forma de milimoles de ácidos grasos, o bien pueden transformarse en miligramos de ácidos grasos por litro.

Oxidimétricas. - En este tipo de procedimientos se determinan los lípidos, una vez extraídos, por su poder de reducción del dicromato. Los componentes lipídicos oxidados, son los ácidos grasos y el colesterol, variando algo la cantidad de dicromato reducido por miligramos de lípidos, según la clase de este.

Sulfosfosvoinillina. - Este método, es el mas usado actualmente. - Su fundamento será detallado en el próximo capítulo.

La determinación de los lípidos totales, se presta especialmente como reacción exploratoria y es la que da la pista sobre la existencia de trastornos del metabolismo graso. Con lípidos totales aumentados, es deseable para un diagnóstico más exacto, un exámen adicional del nivel de colesterol y triglicéridos en el suero.

Los aumentos ligeros de colesterol o triglicéridos en el suero no tienen que ocasionar forzosamente aumento de lípidos totales.

Revisaremos a continuación brevemente. las principales hiperlipidemias.

HIPERLIPIDEMIAS SINTOMÁTICAS (SECUNDARIAS)

En la tolerancia disminuida a la glucosa - El trastorno del metabolismo graso en diabetes mellitus, antecede generalmente al trastorno del metabolismo de los hidratos de carbono. El aumento de los lípidos en el estado metabólico de la diabetes, es ocasionado por el aumento de triglicéridos; a menudo está también aumentado el nivel de colesterol en suero. - Con una terapéutica óptima en la diabetes suelen volverlos lípidos sanguíneos al nivel normal.

En la adiposidad. - Los adiposos muestran a menudo, un aumento de los lípidos totales en sangre; sobretodo están elevados los triglicéridos, además los individuos obesos, suelen tener una tolerancia a la glucosa muy disminuida.

En las manifestaciones de arterioesclerosis. - Los trastornos del metabolismo graso y de los hidratos de carbono, favorecen la arterioesclerosis y sus enfermedades resultantes como el infarto al miocardio. Así, - se pueden hallar en las manifestaciones de la arterioesclerosis un porcentaje de estados diabéticos del metabolismo y trastornos del metabolismo lipídico. Por ello, la determinación de las grasas sanguíneas ayuda reconociendo y tratando a los que pueden estar en peligro, o prever el infarto cardíaco y otras enfermedades arterioescleróticas.

En otros tipos de enfermedades . - Los lípidos totales, están también

aumentados en síndromes nefróticos, cirrosis hepatobiliar, y a menudo en la hipotireosis pancreática, alcoholismo crónico, y en enfermedades de al ma cenamiento de glucógeno (Von Gierke).

HIPERLIPIDEMIAS ESENCIALES (PRIMARIAS)

Los lípidos totales muestra incluso en las hiperlipidemias esenciales familiares, valores elevados; así, por ejemplo, en la hipertrigliceridemia - inducida por los hidratos de carbono (endógenas), o calóricas (grasas e hidrau tos de carbono).

MATERIAL Y METODOS

Material biológico. El material biológico utilizado en este estudio, fueron los sueros de 240 personas clínicamente sanas, obtenidos en ayuno - de 12 horas, distribuidos de la siguiente forma:

- a) 30 sueros de personas, con edades comprendidas entre 1 y 15 -- años del sexo masculino.
- b) 30 sueros de personas, con edades comprendidas entre 1 y 15 -- años del sexo femenino.
- c) 30 sueros de personas, con edades comprendidas entre 16 y 30 - años del sexo masculino.
- d) 30 sueros de personas, con edades comprendidas entre 16 y 30 - años del sexo femenino.
- e) 30 sueros de personas, con edades comprendidas entre 31 y 60 - años del sexo masculino.
- f) 30 sueros de personas, con edades comprendidas entre 31 y 60 - años del sexo femenino.
- g) 30 sueros de personas, con edades comprendidas de 61 años en adelante del sexo masculino.
- h) 30 sueros de personas, con edades comprendidas de 61 años en adelante del sexo femenino.

En estos sueros se determinaron lípidos totales de acuerdo a la modificación hecha al método de Zollner y Kirsch.

Para las modificaciones efectuadas, se trataron patrón y control de acuerdo al método original y modificaciones para obtener confiabilidad de -

ellas.

I. METODO ORIGINAL

LIPIDOS TOTALES Zollner y Kirsh

A. Fundamento. Los lípidos del suero al degradarse con ácido sulfúrico concentrado a 100 grados centígrados, forman con la vainillina (u otro aldehído aromático), y en ácido ortofosfórico, un producto de condensación de color rosa. La formación del color, depende de la proporción de grasas no-saturadas en los lípidos analizados. La composición de ácidos grasos séricos, es sin embargo lo suficientemente constante para proporcionar resultados fiables.

B. Reactivos:

1. Reactivo de color: 4 partes de ácido fosfórico 11.2M más una parte de solución de vainillina al 0.6%.
2. Patrón comercial conteniendo 1,000 mg. /100 ml.
3. Control: Monitrol I.
4. Acido Sulfúrico (95-97 %).

C. Espectrofotómetro Coleman Jr II.

RESULTADOS

PROCEDIMIENTO ORIGINAL

	Análisis	Patrón	Blanco
Suero:	0.05 ml.	---	---
Patrón:	---	0.05 ml.	---
Acido sulfúrico:	2.00 ml.	2.00 ml.	---

Se mezcla bien y cubierto, se calienta durante 10 minutos en agua hirviente; se deja enfriar 5 minutos en agua fría. De esta mezcla reactiva poner con pipeta en tubo de ensayo limpio:

	Análisis	Patrón	Blanco
Mezcla reactiva:	0.1 ml.	0.1 ml.	---
Acido sulfúrico:	---	---	0.1 ml.
Reactivo de color:	2.0 ml.	2.0 ml.	2.0 ml.

Se mezcla y pasados unos 40 o 50 minutos, se comparan las extinciones del análisis y del patrón con el blanco.

Extinción máxima: 540 nm.

Cálculos:

$$\text{Contenido total de lípidos} = \frac{E_a \times 1000}{E_s} \text{ mg./100 ml.}$$

MODIFICACION No. 1

	Análisis	Patrón	Blanco
Suero:	0.1 ml.	---	---
Patrón:	---	0.1 ml.	---
Acido sulfúrico:	4.0 ml.	4.0 ml.	---

Se mezcla bien y cubierto, se calienta durante 10 minutos en agua hirviente; se deja enfriar 5 minutos en agua fría. De esta mezcla reactiva, poner con pipeta en tubo de ensayo limpio:

	Análisis	Patrón	Blanco
Mezcla reactiva:	0.1 ml.	0.1 ml.	---
Acido sulfúrico:	---	---	0.1 ml.
Reactivo de color:	2.0 ml.	2.0 ml.	2.0 ml.

Se mezclan y pasados unos 40 o 50 minutos, se comparan las extinciones del análisis y del patrón con el blanco.

El ácido sulfúrico empleado y los cálculos, son iguales que los de la técnica original así como también para las siguientes modificaciones.

MODIFICACION No. 2

	Análisis	Patrón	Blanco
Suero:	0.01 ml.	---	---
Patrón:	---	0.01 ml.	---
Acido sulfúrico:	0.4 ml.	0.4 ml.	---

Se mezcla bien y cubierto; se calienta durante 10 minutos en --
 agua hirviente, se deja enfriar 5 minutos en agua fría. De esta mez-
 cla reactiva, se pone con pipeta en tubo de ensayo limpio:

	Análisis	Patrón	Blanco
Mezcla reactiva:	0.1 ml.	0.1 ml.	---
Acido sulfúrico:	---	---	0.1 ml.
Reactivo de color:	2.0 ml.	2.0 ml.	2.0 ml.

Se mezcla y pasados unos 40 o 50 minutos, se comparan las --
 extinciones del análisis y del patrón con el blanco.

MODIFICACION No. 3

	Análisis	Patrón	Blanco
Suero:	0.05 ml.	---	---
Patrón:	---	0.05 ml.	---
Acido sulfúrico:	2.00 ml.	2.0 ml.	---

Se mezcla bien y cubierto, se calienta durante 10 minutos en agua hirviente, se deja enfriar 5 minutos en agua fría. De esta mezcla reactiva, poner con pipeta en tubo de ensayo limpio:

	Análisis	Patrón	Blanco
Mezcla reactiva:	0.1 ml.	0.1 ml.	---
Acido sulfúrico:	---	---	0.1 ml.
Reactivo de color:	2.0 ml.	2.0 ml.	2.0 ml.

Se mezclan, poner a baño maría a 37 grados centígrados por quince minutos. Inmediatamente después hacer las lecturas.

MODIFICACION No. 4

	Análisis	Patrón	Blanco
Suero:	0.1 ml.	---	---
Patrón:	---	0.1 ml.	---
Acido sulfúrico:	4.0 ml.	4.0 ml.	---

Se mezcla bien y cubierto; se calienta 10 minutos en agua hirviente, se deja enfriar 5 minutos en agua fría. De esta mezcla reactiva, poner con pipeta en tubo de ensayo limpio:

	Análisis	Patrón	Blanco
Mezcla reactiva:	0.1 ml.	0.1 ml.	---
Acido sulfúrico	---	---	0.1 ml.
Reactivo de color:	2.0 ml.	2.0 ml.	2.0 ml.

Se mezcla, poner a baño maría a 37 grados centígrados quince minutos. Inmediatamente después hacer la lectura.

MODIFICACION No. 5

	Análisis	Patrón	Blanco
Suero:	0.01 ml.	---	---
Patrón:	---	0.01 ml.	---
Acido sulfúrico:	0.4 ml.	0.4 ml.	---

Se mezcla bien y cubierto, se calienta durante 10 minutos en agua hirviente, se deja enfriar 5 minutos en agua fría. De esta mezcla reactiva, se pone con pipeta en tubo de ensayo limpio:

	Análisis	Patrón	Blanco
Mezcla reactiva:	0.1 ml.	0.1 ml.	---
Acido sulfúrico:	---	---	0.1 ml.
Reactivo de color:	2.0 ml.	2.0 ml.	2.0 ml.

Se mezcla, poner a baño maría a 37 grados centígrados quince minutos. Inmediatamente después hacer la lectura.

EL METODO EMPLEADO EN NUESTRAS DETERMINACIONES
ES EL SIGUIENTE

	Análisis	Patrón	Blanco
Suero:	0.1 ml.	---	---
Patrón:	---	0.1 ml.	---
Acido sulfúrico (95-97%):	4.0 ml.	4.0 ml.	---

Se mezcla bien y cubierto, se calienta durante 10 minutos en agua hirviente, se deja enfriar 5 minutos en agua fría. De esta mezcla reactiva, poner con pipeta en tubo de ensayo limpio:

	Análisis	Patrón	Blanco
Mezcla reactiva:	0.1 ml.	0.1 ml.	---
Acido sulfúrico (95-97%):	---	---	0.1 ml.
Reactivo de color:	2.0 ml.	2.0 ml.	2.0 ml.

Se mezcla, poner a baño maría a 37 grados centígrados durante quince minutos. Inmediatamente después hacer la lectura.

Extinción máxima: 540 nm.

Cálculos:

$$\text{Contenido total de lípidos} = \frac{E_a \times 1000}{E_s} \text{ mg. /100 ml.}$$

en donde:

E_a = Extinción del análisis.

E_s = Extinción del patrón.

Los espectros de absorción tanto para el método original como en las modificaciones efectuadas, presentan máximos comprendidos entre -

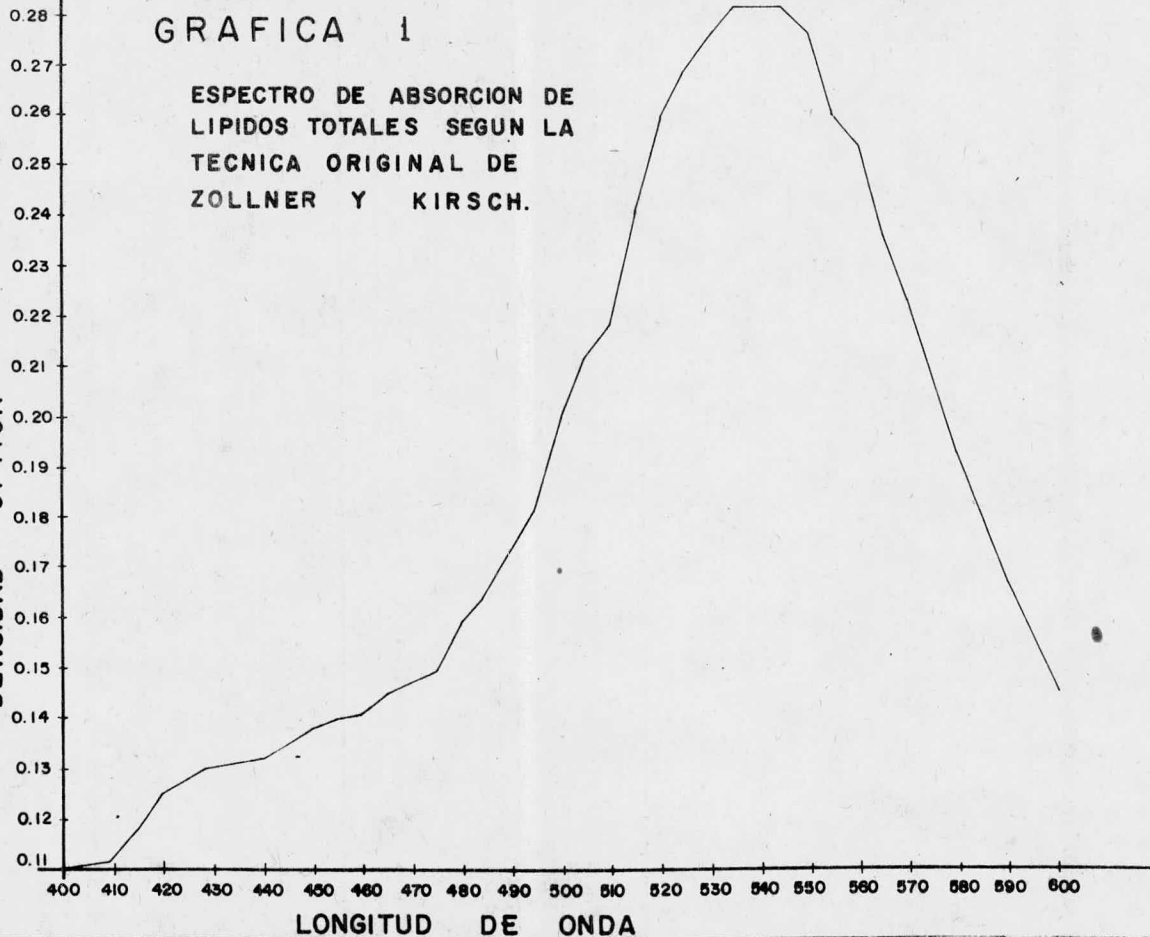
535 y 545 nm., como lo demuestran las gráficas: 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

La estabilidad de la coloración se llevó a cabo en la técnica original y en las modificaciones, obteniéndose un tiempo ideal de lectura de 15 minutos, como se muestra en las gráficas: 7, 8, 9, 10, 11 y 12.

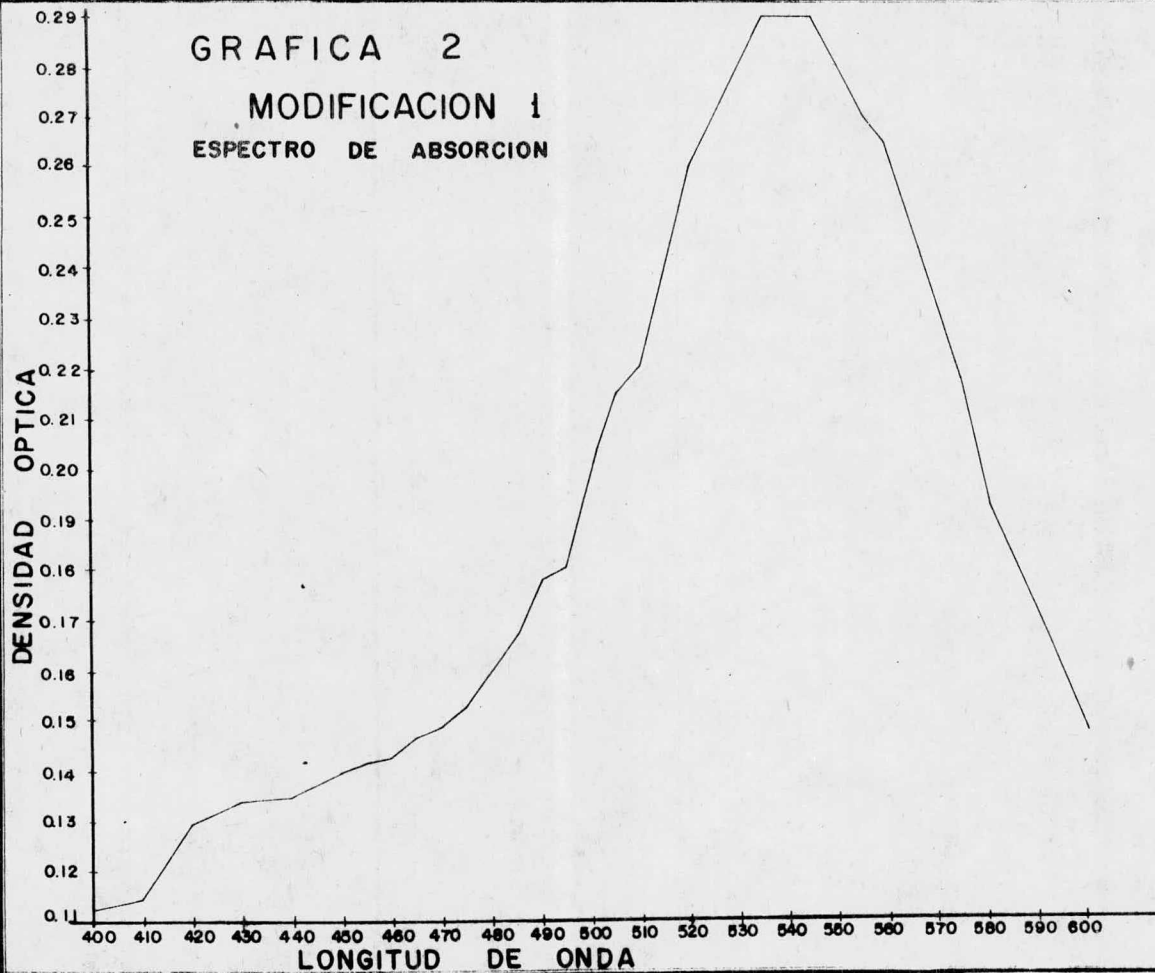
GRAFICA 1

ESPECTRO DE ABSORCION DE
LIPIDOS TOTALES SEGUN LA
TECNICA ORIGINAL DE
ZOLLNER Y KIRSCH.

DENSIDAD OPTICA

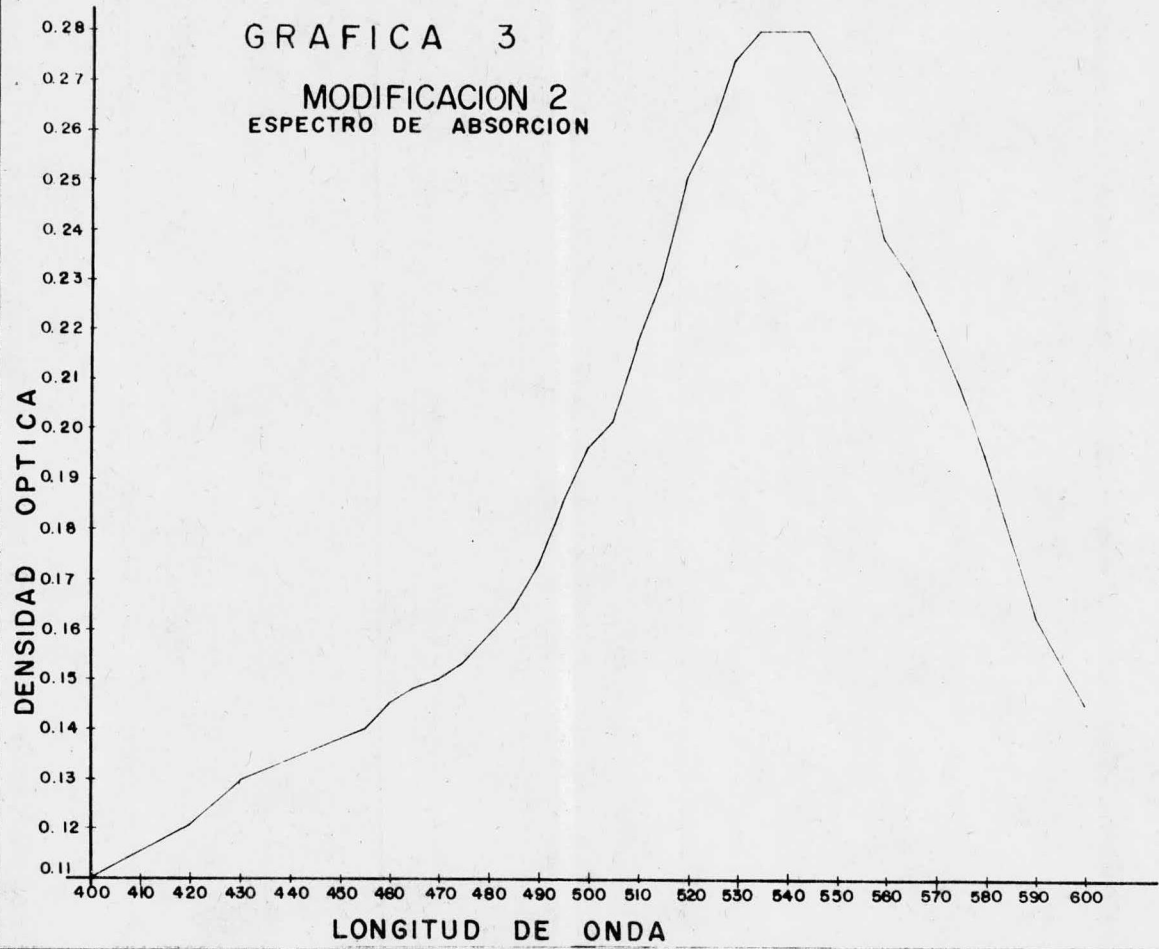


GRAFICA 2
MODIFICACION 1
ESPECTRO DE ABSORCION



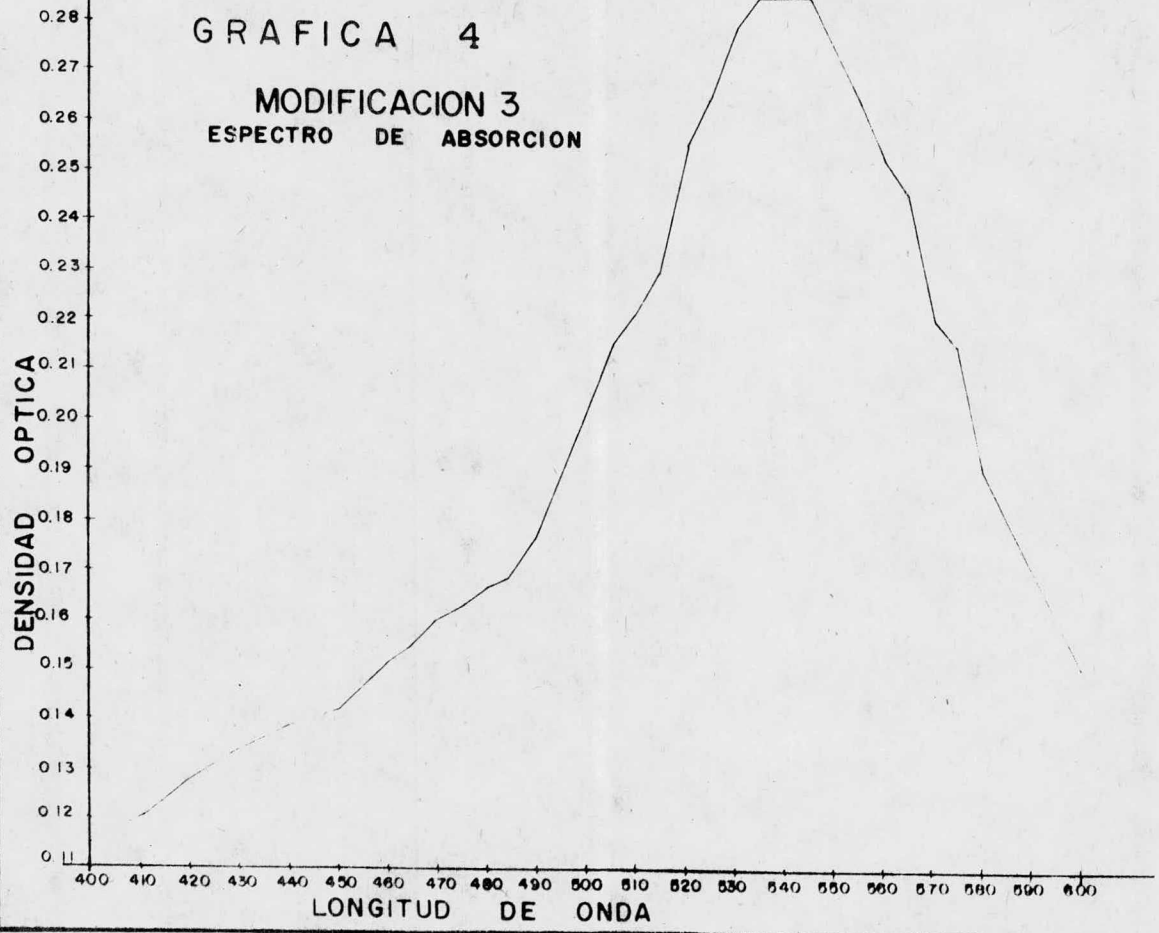
GRAFICA 3

MODIFICACION 2 ESPECTRO DE ABSORCION

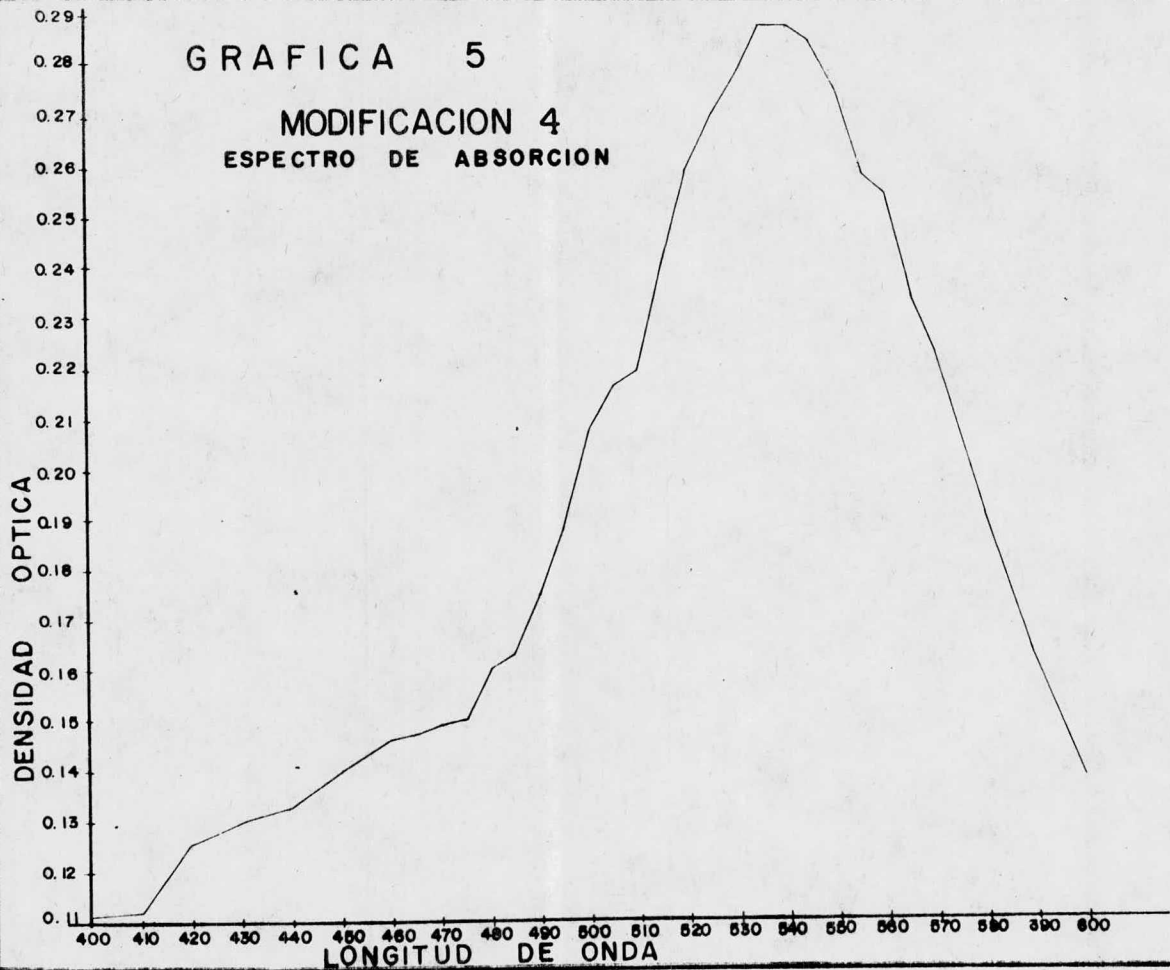


GRAFICA 4

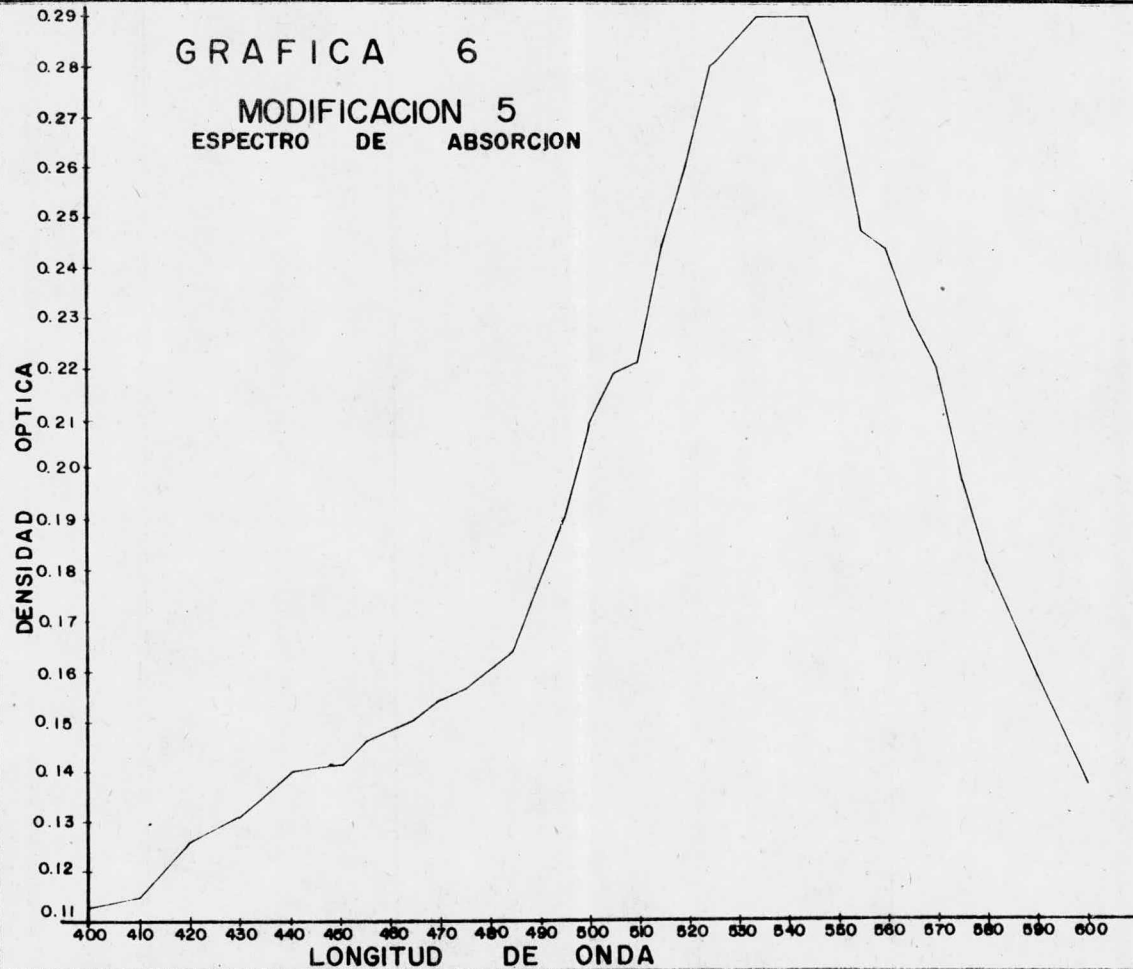
MODIFICACION 3 ESPECTRO DE ABSORCION



GRAFICA 5
MODIFICACION 4
ESPECTRO DE ABSORCION

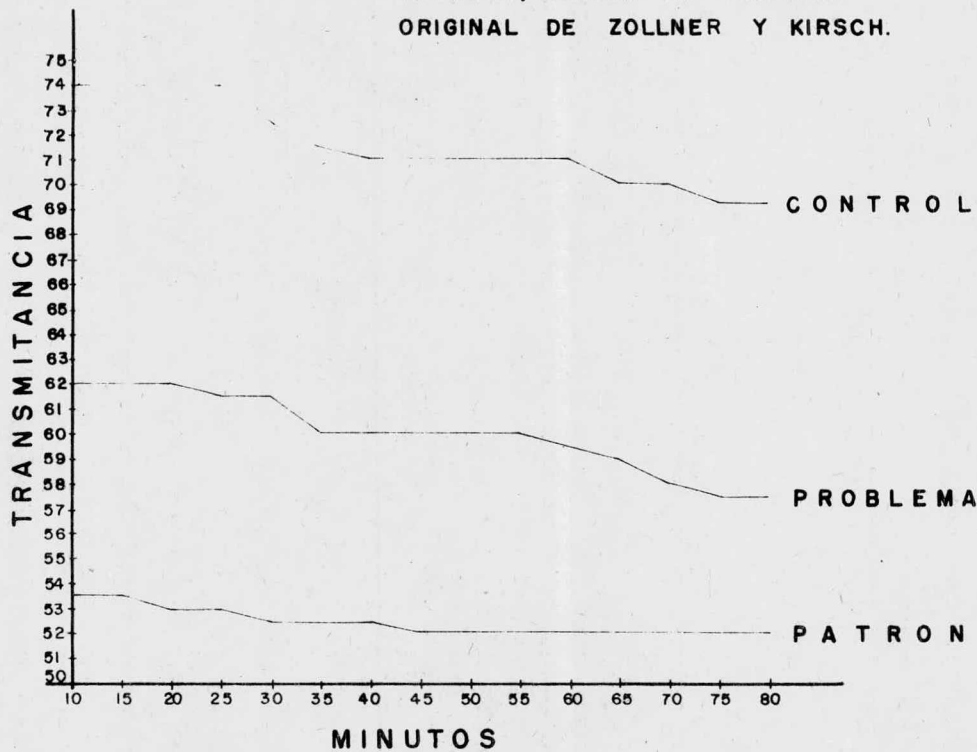


GRAFICA 6
MODIFICACION 5
ESPECTRO DE ABSORCION



GRAFICA 7

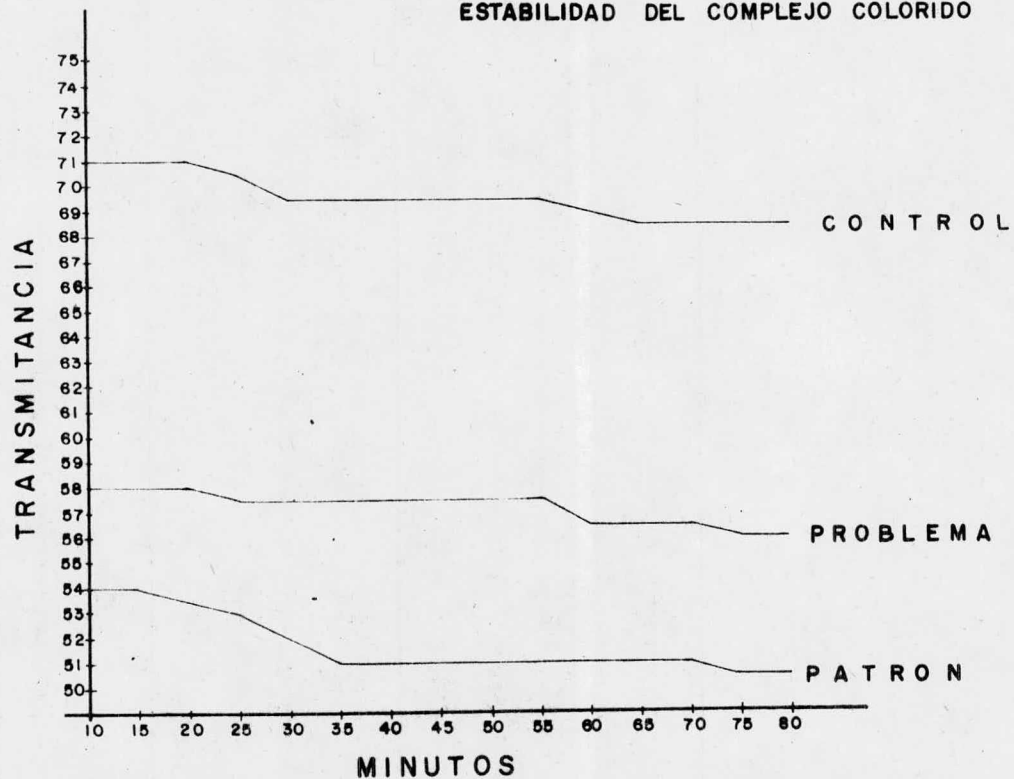
ESTABILIDAD DEL COMPLEJO COLORIDO EN
LA DETERMINACION DE LIPIDOS
TOTALES, SEGUN LA TECNICA
ORIGINAL DE ZOLLNER Y KIRSCH.



GRAFICA 8

MODIFICACION 1

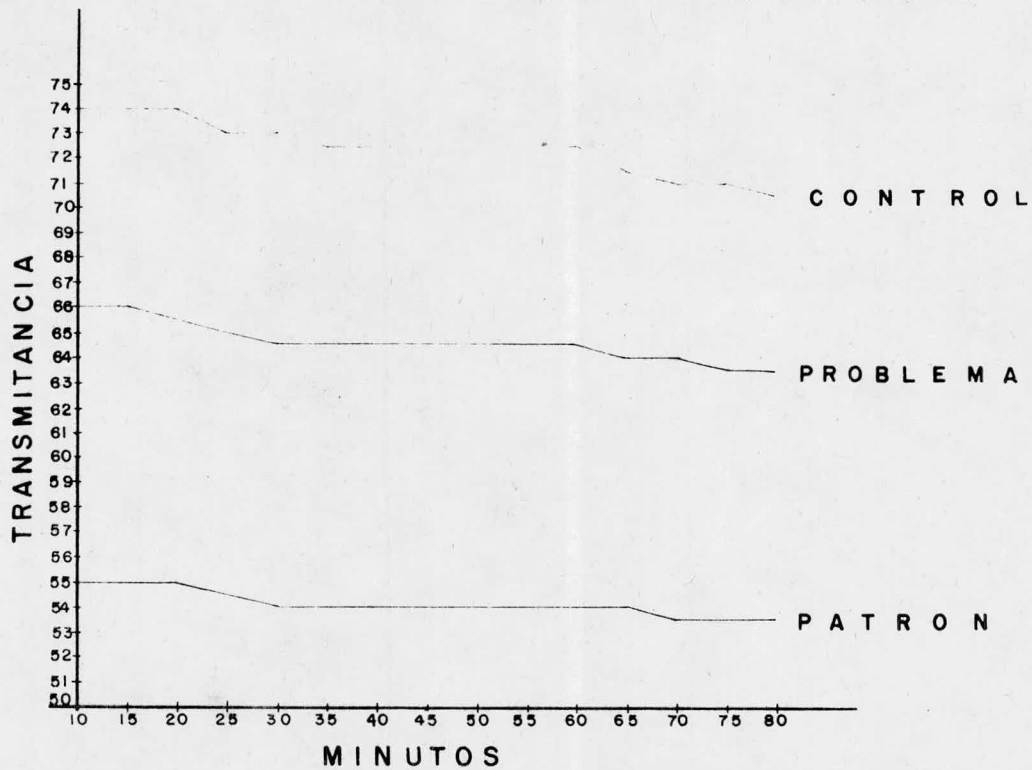
ESTABILIDAD DEL COMPLEJO COLORIDO



GRAFICA 9

MODIFICACION 2

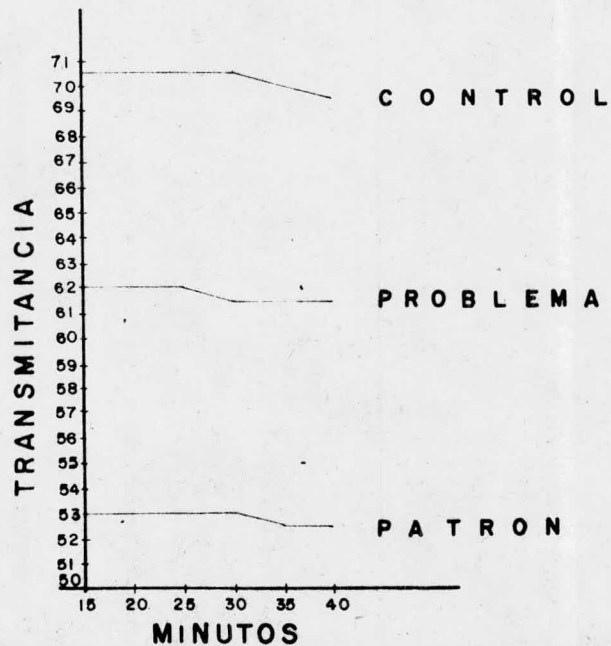
ESTABILIDAD DEL COMPLEJO COLORIDO



GRAFICA 10

MODIFICACION 3

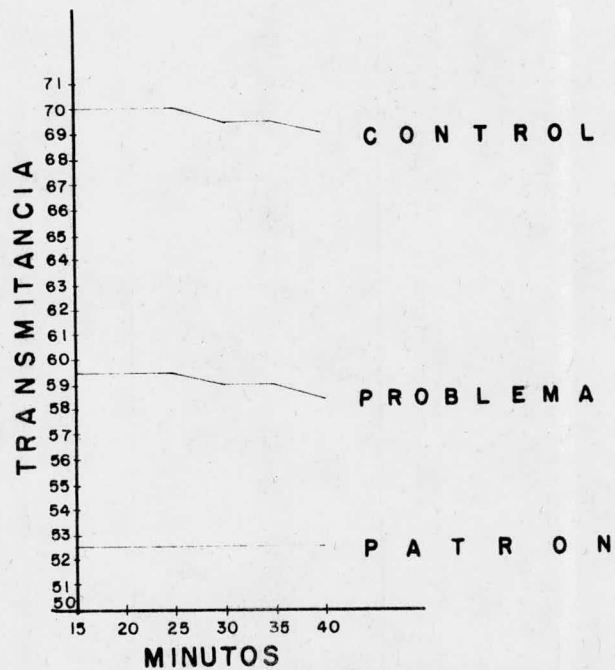
ESTABILIDAD DEL COMPLEJO COLORIDO



GRAFICA 11

MODIFICACION 4

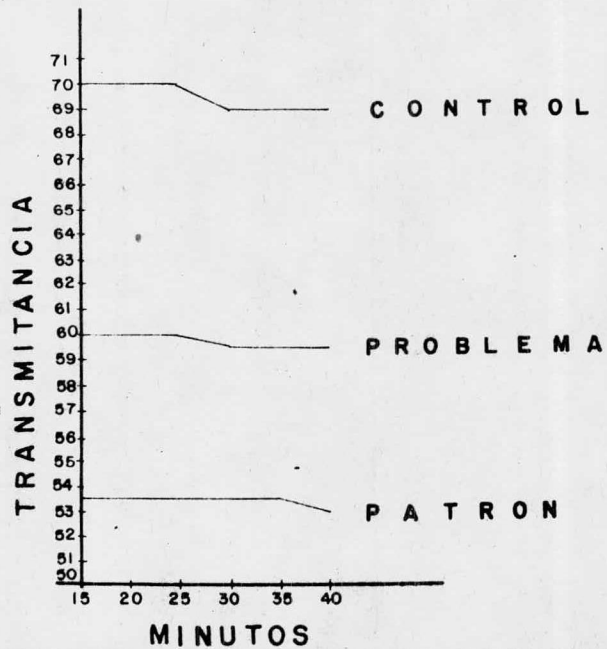
ESTABILIDAD DEL COMPLEJO COLORIDO



GRAFICA 12

MODIFICACION 5

ESTABILIDAD DEL COMPLEJO COLORIDO



DETERMINACION DE DESVIACIONES ESTANDAR Y COEFICIENTES DE VARIACION PARA LA TECNICA ORIGINAL Y DIVERSAS MODIFICACIONES

Cuadro No. 1.

TECNICA ORIGINAL

Número	Concentración control
1	501 mg. /100 ml.
2	508 "
3	560 "
4	575 "
5	563 "
6	542 "
7	528 "
8	508 "
9	508 "
10	523 "
11	538 "
12	572 "
13	573 "
14	564 "
15	501 "
16	568 "
17	529 "
18	530 "
19	530 "
20	501 "

DESVIACION ESTANDAR: 26.87 mg.

COEFICIENTE DE VARIACION: 5.01 %.

Cuadro No. 2.

MODIFICACION 1.

Número	Concentración control
1	548 mg. /100 ml.
2	562 "
3	523 "
4	522 "
5	555 "
6	527 "
7	491 "
8	496 "
9	571 "
10	500 "
11	540 "
12	538 "
13	505 "
14	528 "
15	528 "
16	546 "
17	547 "
18	572 "
19	524 "
20	522 "

DESVIACION ESTANDAR: 23.46 mg.
COEFICIENTE DE VARIACION: 4.4 %.

Cuadro No. 3.

MODIFICACION 2.

Número	Concentración control
1	526 mg. /100 ml.
2	532 "
3	564 "
4	582 "
5	545 "
6	540 "
7	503 "
8	580 "
9	564 "
10	552 "
11	510 "
12	515 "
13	545 "
14	572 "
15	575 "
16	566 "
17	567 "
18	531 "
19	562 "
20	528 "

DESVIACION ESTANDAR: 24.02 mg.

COEFICIENTE DE VARIACION: 4.39 %.

Cuadro No. 4.

MODIFICACION 3.

Número	Concentración control
1	540 mg. /100 ml.
2	560 "
3	565 "
4	571 "
5	535 "
6	524 "
7	521 "
8	520 "
9	512 "
10	542 "
11	576 "
12	582 "
13	523 "
14	523 "
15	510 "
16	515 "
17	542 "
18	573 "
19	568 "
20	516 "

DESVIACION ESTANDAR: 24.52 mg.

COEFICIENTE DE VARIACION: 4.54 mg.

Cuadro No. 5.

MODIFICACION 4.

Número	Concentración control
1	498 mg. /100 ml.
2	536 "
3	508 "
4	526 "
5	563 "
6	560 "
7	570 "
8	514 "
9	543 "
10	527 "
11	575 "
12	566 "
13	573 "
14	526 "
15	532 "
16	540 "
17	531 "
18	561 "
19	530 "
20	520 "

DESVIACION ESTANDAR: 22.91 mg.

COEFICIENTE DE VARIACION: 4.25 %.

Cuadro No. 6.

MODIFICACION 5.

Número	Concentración control
1	496 mg. /100 ml.
2	528 "
3	537 "
4	556 "
5	556 "
6	500 "
7	558 "
8	501 "
9	541 "
10	540 "
11	526 "
12	538 "
13	570 "
14	568 "
15	580 "
16	550 "
17	559 "
18	501 "
19	493 "
20	540 "

DESVIACION ESTANDAR: 26.7 mg.

COEFICIENTE DE VARIACION: 4.9 %.

RESULTADOS DE LA DETERMINACION DE VALORES NORMALES DE
LÍPIDOS TOTALES.

EDAD: 1 a 15 años.

SEXO: Masculino.

Número	Concentracion de lípidos
1	458 mg. /100 ml.
2	472 "
3	485 "
4	491 "
5	497 "
6	497 "
7	528 "
8	528 "
9	531 "
10	535 "
11	545 "
12	545 "
13	545 "
14	568 "
15	573 "
16	574 "
17	602 "
18	606 "
19	636 "
20	646 "
21	681 "
22	691 "
23	691 "
24	707 "
25	709 "
26	714 "
27	718 "
28	785 "
29	801 "
30	803 "

Valores normales: De 400 a 810 mg. /100 ml.

EDAD: 1 a 15 años.

SEXO: Femenino.

Número	Concentración de lípidos
1	462 mg. /100 ml.
2	462 "
3	476 "
4	485 "
5	493 "
6	508 "
7	530 "
8	530 "
9	565 "
10	565 "
11	565 "
12	565 "
13	568 "
14	571 "
15	573 "
16	579 "
17	582 "
18	596 "
19	612 "
20	632 "
21	679 "
22	691 "
23	701 "
24	709 "
25	744 "
26	780 "
27	780 "
28	801 "
29	817 "
30	830 "

Valores normales: De 392 a 838 mg. /100 ml.

EDAD: 16 a 30 años.

SEXO: Masculino.

Número	Concentración de lípidos
1	428 mg. /100 ml.
2	436 "
3	436 "
4	470 "
5	475 "
6	481 "
7	486 "
8	499 "
9	508 "
10	512 "
11	526 "
12	538 "
13	547 "
14	547 "
15	581 "
16	590 "
17	590 "
18	597 "
19	607 "
20	612 "
21	615 "
22	635 "
23	672 "
24	689 "
25	702 "
26	785 "
27	801 "
28	815 "
29	821 "
30	830 "

Valores normales: De 350 a 838 mg. /100 ml.

EDAD: 16 a 30 años.

SEXO: Femenino.

Número	Concentración de lípidos
1	418 mg. /100 ml.
2	435 "
3	435 "
4	436 "
5	439 "
6	451 "
7	482 "
8	488 "
9	497 "
10	499 "
11	499 "
12	512 "
13	528 "
14	537 "
15	546 "
16	578 "
17	596 "
18	596 "
19	598 "
20	621 "
21	633 "
22	645 "
23	649 "
24	679 "
25	697 "
26	699 "
27	705 "
28	728 "
29	745 "
30	791 "

Calores normales: De 357 a 786 mg. /100 ml.

EDAD: 31 a 60 años.

SEXO: Masculino.

Número	Concentración de lípidos
1	468 mg./100 ml.
2	476 "
3	479 "
4	483 "
5	500 "
6	504 "
7	508 "
8	520 "
9	525 "
10	560 "
11	561 "
12	569 "
13	573 "
14	583 "
15	595 "
16	603 "
17	604 "
18	612 "
19	623 "
20	626 "
21	670 "
22	681 "
23	681 "
24	681 "
25	702 "
26	746 "
27	752 "
28	789 "
29	795 "
30	825 "

Valores normales: De 403 a 815 mg./100 ml.

EDAD: 31 a 60 años.

SEXO: Femenino.

Número	Concentración de lípidos
1	444 mg. /100 ml.
2	464 "
3	472 "
4	483 "
5	490 "
6	490 "
7	490 "
8	504 "
9	508 "
10	523 "
11	523 "
12	545 "
13	550 "
14	570 "
15	571 "
16	576 "
17	589 "
18	597 "
19	601 "
20	626 "
21	638 "
22	648 "
23	652 "
24	691 "
25	698 "
26	721 "
27	753 "
28	758 "
29	800 "
30	803 "

Valores normales: De 385 a 801 mg. /100 ml.

EDAD: 61 años ó mas.

SEXO: Masculino.

Número	Concentración de lípidos
1	468 mg. /100 ml.
2	472 "
3	482 "
4	490 "
5	493 "
6	496 "
7	508 "
8	527 "
9	529 "
10	538 "
11	547 "
12	550 "
13	582 "
14	596 "
15	608 "
16	609 "
17	614 "
18	618 "
19	629 "
20	642 "
21	686 "
22	701 "
23	712 "
24	718 "
25	740 "
26	745 "
27	751 "
28	786 "
29	795 "
30	808 "

Valores normales: De 400 a 827 mg. /100 ml.

EDAD: 61 años ó mas.

SEXO: Femenino.

Número	Concentración de lípidos
1	438 mg. /100 ml.
2	446 "
3	451 "
4	451 "
5	451 "
6	461 "
7	469 "
8	478 "
9	482 "
10	500 "
11	500 "
12	518 "
13	526 "
14	534 "
15	536 "
16	540 "
17	560 "
18	581 "
19	592 "
20	603 "
21	606 "
22	609 "
23	626 "
24	666 "
25	689 "
26	700 "
27	741 "
28	769 "
29	789 "
30	792 "

Valores normales: De 351 a 788 mg. /100 ml.

EDAD: Cualquier edad. SEXO: Masculino.

Valores normales: De 390 a 822 mg. /100 ml.

EDAD: Cualquier edad. SEXO: Femenino.

Valores normales: De 371 a 803 mg. /100 ml.

EDAD: Cualquier edad. SEXO: Masculino y femenino.

Valores normales: De 380 a 812 mg. /100 ml.

DISCUSSION

El propósito de nuestro estudio, fué la modificación al método original de Zollner y Kirsh, para la determinación de lípidos totales en suero; debido a que, en este, el período empleado para su determinación es largo; y en ocasiones, la premura del tiempo en un exámen es determinante para el buen manejo de un paciente, así pues, con esta idea nos avocamos a variar tanto volúmenes de muestra empleada, tiempo, estabilidad de reacción y temperatura.

Como se puede apreciar en la gráfica No. 1, se presenta el espectro de absorción de la técnica original el cual fue de 535 a 545 nm; este espectro es similar al de todas las modificaciones efectuadas según gráficas: 2, 3, 4, 5 y 6.

En las modificaciones efectuadas en cuanto a variaciones en volúmen de muestras (la técnica original es un micrométodo), en ocasiones el problema de la obtención de las mismas para el químico analista resulta difícil, por lo cual usamos volúmenes tanto de patrón como de suero problema, menores que el recomendado originalmente.

La primera modificación en la cual duplicamos los volúmenes, se hizo pensando en que no siempre se dispone de material certificado para microanálisis; en los resultados no observamos discrepancias con el método original.

Como mencionamos anteriormente, el factor tiempo es importante para un diagnóstico rápido, por lo que pensamos acelerar la reacción a mayor temperatura, es decir, si esta se verifica entre 40 y 50 minutos a temperatura ambiente, un aumento a 37 grados centígrados, nos produjo un de-

sarrollo de color en 15 minutos, observándose según las gráficas 10, 11, 12, que este tiempo es suficiente y que todavía persiste la estabilidad de la reacción por 15 minutos mas, que nos parece un tiempo adecuado para hacer las lecturas.

Estos estudios fueron realizados, utilizando patrones de referencia del equipo comercial para lípidos totales, así como patrones de referencia comerciales de suero liofilizado, con cantidades de concentración conocida, por lo tanto, conforme a esto adoptamos el método como se expresa en la modificación No. 4 de nuestro estudio.

Despues de observa, que el método modificado fue reproducible como podemos observar en los resultados obtenidos según cuadros: 1, 2, 3, 4, 5 y 6, procedimos a estudiar una población de 240 personas para así obtener los valores de referencia de la modificación al método en el cual obtuvimos datos que concuerdan estadísticamente con los datos en la técnica original, que son: De 400 a 1,000 mg./100 ml.

RESUMEN

En nuestro estudio se mencionan:

1. - Generalidades breves sobre distintas fracciones de lípidos, - transporte y resíntesis; se hace también una revisión sobre la metodología empleada para la cuantificación de lípidos séricos totales.
2. - Se describe el método original de Zollner y Kirsh, así como - las cinco modificaciones hechas al mismo; y el material biológico empleado de 240 personas.
3. - Se informan por medio de gráficas los espectros de absorción de la técnica original y las diversas modificaciones como pueden verse - en las gráficas 1 a 6; asimismo se grafica la estabilidad de la reacción - original y de cada una de las modificaciones; esto puede advertirse en las gráficas 7 a 12.
4. - Los valores de referencia obtenidos de la población estudiada, se presentan por separado y en forma global.
5. - Se presenta una breve discusión sobre los resultados obtenidos.

CONCLUSIONES

Por los datos obtenidos en el presente trabajo, de acuerdo a la modificación propuesta por nosotros a la técnica original de Zollner y Kirsh, pensamos que si es un método de fácil realización por su confiabilidad para ser adaptado a un laboratorio clínico, al mismo tiempo podemos aceptar como valores de referencia para lípidos totales, los obtenidos en este estudio.

BIBLIOGRAFIA

1. - Conn, E. E., and Stumpf, K.P.
Outlines of Biochemistry.
2a. Ed.
Edt. John Wiley and Sons.
New York (1966).
2. - Corominas Villardel, A.
Los Lípidos Laboratorio y Clínica.
Ed. Toray.
Barcelona (1973)
3. - Davidsohn, I., Henry, J.B.
Diagnóstico Clínico por el laboratorio.
5a. Ed.
Edit. Salvat.
Barcelona (1972)
4. - Gradwohl's.
Clinical laboratory methods and diagnosis.
Ed. Mosby.
Saint Louis (1970)
5. - Hartman, G., an Wyss F.
Hiperlipidemias. Aspectos fisiopatológicos, clínicos
y terapéuticos.
Editorial Científico Médica.
México, D. F. (1972)
6. - Henry, Richard J.
Química clínica. Bases y Principios.
Edit. JIMS.
Barcelona (1969)
7. - Katterman, R.
Presencia, determinación y dignificado diagnóstico de los
lípidos sanguíneos.
Editado por Farmacéuticos Lakeside, S. A.
México (1972)
8. - Mahler, R.H. and Cordes H.E.
Biological Chemistry.
Edit. Harper International.
New Yorks (1968)

9. - Ravel, Richard.
Clinical laboratory medicine.
2a. Ed.
Ed. Year book medical publishers, Inc.
Chicago (1974)
10. - Tietz, Norbert W.
Química Clínica Moderna.
Ed. Interamericana.
México, D. F. (1972)
11. - Est. Todd, Mason, Van Bruggen.
Bioquímica Médica.
4a. Ed.
Edit. Interamericana.
México (1969)
12. - White, A., Handler, P., Smith, L. E., and Stetten, D.
Principios de Bioquímica.
2a. Ed.
Edit. Mc. Graw-Hill Book Co.
Nueva York (1964)
13. - Zollner, N. Und K. Kirsh: ges. exp. Med.
135, 545 (1962).