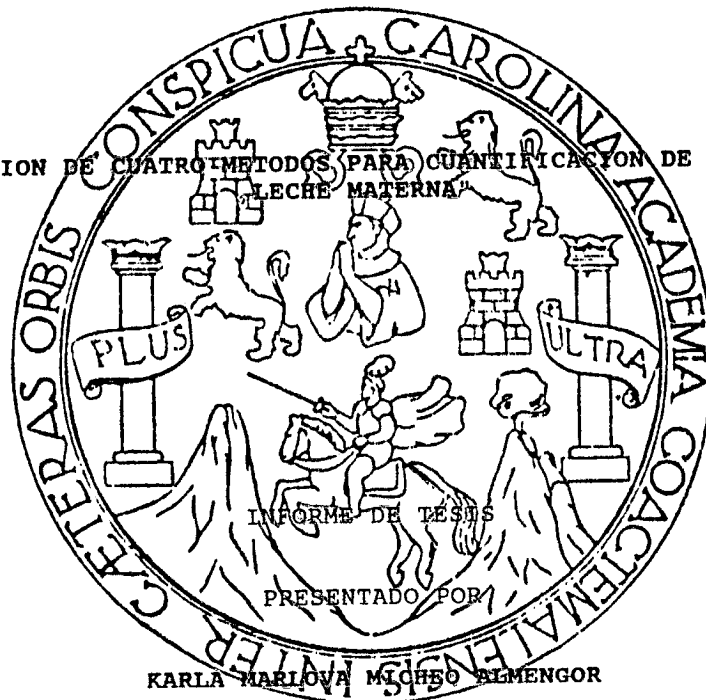


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

"COMPARACION DE CUATRO METODOS PARA CUANTIFICACION DE LIPIDOS EN  
LECHE MATERNA"



PARA OPTAR AL TITULO DE  
QUIMICA FARMACEUTICA

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central

Guatemala, abril de 1,996.

D2.  
C6  
71 (179)

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE  
CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA  
DE LA  
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

DECANO	Lic. Jorge Rodolfo Perez Folgar
SECRETARIA	Licda. Eleonora Gaitan Izaguirre
VOCAL I	Lic. Miguel Angel Herrera Gálvez
VOCAL II	Lic. Gerardo Leonel Arroyo Catalán
VOCAL III	Lic. Miguel Orlando Garza Sagastume
VOCAL IV	Br. Jorge Luis Galindo Arévalo
VOCAL V	Br. Edgar Antonio García del Pozo

## DEDICATORIA

A DIOS, luz de mi vida.

A MIS PADRES, Carlos Antonio Micheo Arroyave y Berta Miriam Almengor de Micheo, por haberme enseñado el camino a seguir, por su amor, comprensión, ejemplo y apoyo incondicional.

A MIS HERMANOS, Carlos Bladimir y Hugo Moisés, por su amor fraternal.

A MIS CUÑADAS, Lilian González y Raquel Siguenza.

A MI ABUELITA, Mariana Carlota García Salas.

A MIS TIOS

A MIS SOBRINOS

A MIS PRIMOS

A Carlos Mancilla Ovando con todo mi amor

A MIS COMPAÑEROS DE PROMOCION EN ESPECIAL A MIS AMIGOS, Thelma Haydeé López, Ana Elisa Pacheco, Silvia Tello, Claudia Arriola, Juan Manuel Fuentes, Astrid Asencio, José Eduardo Ochoa, Wendy Cano, Julio Eduardo Pérez, Axel De León con mucho cariño.

## AGRADECIMIENTOS

A Dr. Omar Dary, por su asesoría y sus enseñanzas

A Licda. Carolina Martínez por su asesoría, apoyo y fortaleza en todo momento

A Licda. Dora Inés Mazariegos por su asesoría en el diseño estadístico y su apoyo incondicional

A Ing. Hugo Moisés Micheo, por su ayuda incondicional en la estructuración, presentación e impresión de los resultados.

A TODO EL PERSONAL DEL LABORATORIO ESPECIALIZADO DE QUIMICA Y BIOQUIMICA DEL INCAP que de una u otra forma hizo posible la realización de este trabajo de investigación.

AL INSTITUTO DE NUTRICION DE CENTRO AMERICA Y PANAMA (INCAP) por haber financiado este trabajo de tesis.

## INDICE

1.	RESUMEN . . . . .	1
2.	INTRODUCCION . . . . .	2
3.	ANTECEDENTES . . . . .	3
	3.1 Generalidades . . . . .	3
	3.2 Composición de la leche materna . . . . .	4
	3.3 Lípidos . . . . .	5
	3.3.1 Factores que afectan el contenido total de lípidos: . . . . .	6
	3.3.2 Clases de lípidos: . . . . .	7
	3.4 Técnicas de muestreo para obtención de leche materna: . . . . .	8
	3.5 Metodologías para la determinación de lípidos: . . . . .	9
	3.5.1 Método de Folch modificado . . . . .	10
	3.5.2 Método Babcock modificado . . . . .	10
	3.5.3 Método enzimático . . . . .	11
	3.5.4 Método Crematocrito . . . . .	11
	3.5.5 Validación y caracterización de métodos analíticos . . . . .	12
4.	JUSTIFICACION . . . . .	14
5.	OBJETIVOS . . . . .	16
6.	HIPOTESIS . . . . .	17
7.	MATERIALES Y METODOS . . . . .	18
	7.1 Universo de trabajo . . . . .	18
	7.2 Recursos . . . . .	18
	7.3 Procedimiento . . . . .	20
	7.4 Diseño experimental . . . . .	23
	7.4.1 Muestreo . . . . .	23
	7.4.2 Análisis Estadístico . . . . .	24
	7.5 Validación del mejor método alternativo . . . . .	24
8.	RESULTADOS . . . . .	27
9.	DISCUSION DE RESULTADOS . . . . .	38
10.	CONCLUSIONES . . . . .	40
11.	RECOMENDACIONES . . . . .	41
12.	REFERENCIAS . . . . .	42
13.	ANEXOS . . . . .	46
	13.1 Composición de la leche materna madura . . . . .	49
	13.2 Métodos . . . . .	50
	13.2.1 Método de Folch modificado . . . . .	50
	13.2.2 Método de Babcock modificado . . . . .	50
	13.2.3 Método Enzimático . . . . .	50
	13.2.4 Método crematocrito . . . . .	50
	13.3 Fórmulas Estadísticas . . . . .	51
	13.4 Validación y caracterización de métodos analíticos . . . . .	52
	13.4.1 Respuesta del blanco . . . . .	52
	13.4.2 Recuperación . . . . .	52
	13.4.3 Error Analítico . . . . .	53
	13.4.4 Ecuación de la línea Recta . . . . .	53

## 1. RESUMEN

La leche materna por su composición tan completa en sus diferentes etapas está adaptada a las necesidades fisiológicas del niño lactante. La principal fuente de energía entre los componentes de la leche son los lípidos, ya que proporcionan entre un 50 - 60 % de la misma.

Para la determinación de lípidos en leche materna, almacenada en congelación, el método de referencia es el de Folch Modificado por ser confiable y exacto; sin embargo, éste es largo ya que no se puede trabajar más de cuatro muestras en duplicado por día, además utiliza solventes tóxicos tales como el cloruro de metileno, metanol absoluto y su costo es elevado, por lo que no se puede trabajar un número grande de muestras.

El presente trabajo tuvo como objetivo elegir un método alternativo para la cuantificación de lípidos en leche materna. Se compararon cuatro métodos, Babcock modificado, enzimático, y crematocrito contra el de Folch. El método que proporcionó resultados comparables con el de Folch modificado fue el enzimático. El método enzimático se caracterizó con detalle para poder ser utilizado en investigaciones posteriores con leche materna.

Los métodos de Babcock modificado y el crematocrito resultaron ser inespecíficos, sobreestimando por lo general el contenido de grasa en leche, por lo que se descartaron como métodos alternativos.

Al final, se recomienda la utilización del método enzimático ya que sus resultados son comparables con los de Folch. Además tiene las ventajas de que no requiere solventes orgánicos y permite analizar mayor número de muestras.

## 2. INTRODUCCION

Durante los últimos años, la lactancia materna tiene mayor importancia debido a que se evidencia su protección inmunológica y su papel alimentario insustituible para el neonato e infante. La leche materna contiene compuestos biológicamente activos (células, enzimas, factores de crecimiento, inmunoglobulinas y otros) que son de gran beneficio para el desarrollo normal del neonato, constituyéndose en la mejor fuente de nutrientes para el lactante (1).

La composición de la leche incluye macronutrientes, entre los que pueden mencionarse las proteínas, los carbohidratos como la lactosa, y la porción lipídica. Esta última constituye la mayor fuente de energía (50-60%) para el lactante (Anexo 1) (1,2).

El propósito de este trabajo de investigación fue identificar y caracterizar un método sencillo, rápido, eficaz, válido y económico que permita determinar con precisión el porcentaje de lípidos en la leche materna. Se compararon cuatro métodos: Enzimático, Babcock modificado, y Crematocrito contra el de Folch modificado.

Se utilizó el método de Folch como el de referencia ya que éste se recomienda por su confiabilidad y exactitud; sin embargo, éste tiene el inconveniente de ser largo y no permite trabajar un número grande de muestras. Además, utiliza solventes tóxicos. Por lo tanto, fue necesario buscar un método alternativo que requiera menos tiempo para su realización, y sea aplicable a un número mayor de muestras, y que además posea similar exactitud y confiabilidad que el método de Folch.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 Generalidades

La leche materna constituye la mejor fuente de nutrientes y el alimento natural preferido para el ser humano durante los primeros meses de vida. La leche favorece el crecimiento y desarrollo óptimos del niño. La lactancia exclusiva es suficiente para satisfacer las necesidades nutricionales del lactante durante los primeros seis meses de vida. La leche materna, debido a su composición proteínica, factores inmunológicos y su buena tolerancia, es recomendable para la alimentación de niños prematuros (3-8).

Por otro lado, la relación que existe entre madre e hijo, cuando se da la lactancia exclusiva, ayuda a establecer lazos afectivos con el niño, lo que incrementa la estabilidad emocional del mismo (9,10).

La lactancia natural, para el niño a término, sano y normal, no presenta ninguna desventaja, siempre que el suministro de leche materna sea la necesaria y la dieta de la madre contenga las suficientes proteínas y vitaminas. En raras ocasiones, la leche puede contener alérgenos a los que el niño se sensibilice, en tales casos, se debe descubrir el alérgeno y retirarlo de la dieta materna (11).

La leche humana posee la composición adecuada para el organismo al que está destinada y es, a la vez, el alimento más higiénico, ya que pasa directamente del pecho materno a la boca del niño. Además siempre está disponible a la temperatura adecuada. El niño que se alimenta con leche materna tiene más probabilidades de sobrevivir en un entorno socioeconómico desfavorable o en malas condiciones sanitarias (12).

La leche materna contiene anticuerpos antibacterianos y antivíricos, con concentraciones relativamente altas de IgA secretora, lo que impide la adherencia de los microorganismos a la mucosa intestinal del niño lactante. Los anticuerpos de la leche humana pueden inhibir el crecimiento de los virus de las paperas y la gripe (12).



Los anticuerpos ingeridos con el calostro humano pueden conferir inmunidad local al tubo digestivo contra los microorganismos que penetran por esa vía. Los macrófagos que suele llevar el calostro y la leche humana pueden sintetizar el complemento, la lisozima y la lactoferrina (proteína láctea portadora del hierro que normalmente está saturada de hierro en una tercera parte) que inhibe el crecimiento de Escherichia coli en el intestino. También sintetizan la lipasa estimulada por las sales biliares que destruye Giardia lamblia y Entamoeba histolytica (11, 12).

### 3.2 Composición de la leche materna

La composición de la leche varía según el estadio de la lactancia. Estos cambios son tan pronunciados que las leches se han clasificado en tres tipos:

- Calostro: es la primer leche secretada por la madre y dura aproximadamente del primero al quinto día después del parto;
- Leche transicional: es el segundo tipo de leche que se produce más o menos desde el sexto día hasta el décimoquinto día después del parto; y
- Leche madura: es la que le sigue a la transicional y ocurre aproximadamente desde el décimoquinto día hasta el destete (13).

El calostro contiene mayor porcentaje de proteínas, calcio y otros minerales, y menos de carbohidratos y grasas que en estadios posteriores de la lactancia. En el calostro, las concentraciones de tiamina (10 µg/L) y vitamina B6 son bajas, mientras que los niveles de riboflavina, folatos y niacina son más altos que en los tipos de leche más madura (11,14).

El aporte de proteínas de la leche materna al niño es de 1.0-1.5%. Las proteínas que se encuentran en la leche materna se clasifican como caseínas y proteínas séricas. Las caseínas son fosfoproteínas y están únicamente en la leche. Las proteínas séricas son la alfa-lactoglobulina y la lactalbúmina (proteína que inhibe la multiplicación de bacterias siderofílicas, mediante la competencia con estos microorganismos por el hierro). La leche humana contiene alrededor del 60% de proteínas séricas, principalmente alfa-lactoglobulina y lactalbúmina y un 40% de caseína. Otras proteínas son IgA secretora y otras

inmunoglobulinas, Beta-lactoglobulina, lisozima y otras enzimas, hormonas y factores del crecimiento (14-16).

El principal carbohidrato en la leche materna es la lactosa, un disacárido compuesto de una molécula de galactosa unida por un enlace beta glucosídico a la glucosa (14-16).

También existen otros carbohidratos, entre los que se encuentran oligosacáridos, glicopéptidos, y los factores Bifidus. Algunos de éstos, a pesar de sus concentraciones bajas, tienen actividades protectoras como los azúcares que contienen nitrógeno en su estructura que promueven el crecimiento de Lactobacillus. Esta bacteria es dominante en el tracto intestinal bajo, protegiendo contra la colonización de bacterias patógenas mediante la secreción de compuestos orgánicos inhibitorios como el ácido acético (14).

En la leche también se encuentran minerales, entre los cuales están macronutrientes (calcio, fósforo, magnesio, potasio, sodio, cloruro y sulfuro) y elementos traza (hierro, cobre, cinc, manganeso, selenio, fluor, yodo, cromo, cobalto) (14).

El contenido de yodo y vitaminas depende de la dieta diaria de la madre, ya que si el consumo es bajo los niveles también serán bajos y viceversa. La vitamina A se encuentra principalmente en forma de ésteres de retinol (96%). Alrededor del 83% del contenido total de vitamina E es alfa-tocoferol, pero también están presentes pequeñas cantidades de beta, gamma y sigma-tocoferoles (14).

Los niveles de vitamina C en la leche son de ocho a diez veces mayor que las concentraciones de la misma en el plasma. Si la ingesta diaria de vitamina C de la madre es igual o excede a 100 mg, los niveles de ésta en la leche serán de 50 a 60 mg/L (14).

### 3.3 Lípidos

Parte de la grasa de la leche proviene de los lípidos de la sangre. Una cantidad de los ácidos grasos de los alimentos pasan directamente a la leche y modifican en parte su sabor y su composición. Las grasas de depósito de la madre pasan también a la leche durante el ayuno; sin embargo, la glándula mamaria

tiende a proporcionar especificidad a la grasa de la leche. La mama forma ácidos grasos a partir del acetato (15).

Al aumentar la ingesta de grasa por encima de un gramo por kilogramo de peso al día, su concentración en la leche no aumenta; pero si se disminuye la ingestión, se produce un descenso en la concentración de grasa en la leche (16).

La leche materna forma una emulsión perfecta, lo que asegura que un volumen de leche dado al niño tendrá la misma cantidad de nutrientes en todo su contenido. Los lípidos se encuentran dispersos como glóbulos emulsificados compuestos en su mayoría de triacilgliceroles, colesterilésteres y otros lípidos. Las sustancias bipolares como las proteínas, fosfolípidos y colesterol estabilizan la emulsión (17-21).

La lipasa y la temperatura pueden afectar la estabilidad de los glóbulos de grasa y por lo tanto la emulsión perfecta. La lipasa está presente en cantidades suficientes para hidrolizar toda la grasa en la leche, por lo que destruye la capa lipídica. En la leche materna almacenada a  $-70^{\circ}\text{C}$  no se produce ningún tipo de lipólisis. Se ha comprobado que la lipólisis ocurre cuando la leche es almacenada a temperaturas mayores de  $-20^{\circ}\text{C}$ , y que a  $+4^{\circ}\text{C}$  por cuatro días se incrementa la peroxidación lipídica (17,19,21).

La grasa de la leche tiene componentes específicos que son esenciales para el desarrollo normal del cerebro (mielinación), función retinal y protección contra infecciones del lactante (22,23).

### 3.3.1 Factores que afectan el contenido total de lípidos:

El contenido de grasa o fracción lipídica de la leche materna es muy variable, ya que en el calostro su concentración es de 2.9%, en la leche transicional de 3.6% y en la leche madura de 3.8%. El contenido total de grasa en una muestra de leche madura puede variar entre individuos de 2 a 10 gramos por decilitro (17,20,24-27).

Los niveles adiposos de la madre afectan el contenido lipídico de la leche, ya que entre mayores sean éstos, mayor cantidad de grasa aparecerá su leche. La leche de una madre primeriza tiene un

25% más de grasa que la leche de una madre múltipara (entre cuatro o más partos) (13,28).

### 3.3.2 Clases de lípidos:

En la leche materna se encuentran principalmente los siguientes lípidos: triacilgliceroles, los cuales representan la mayor proporción (98%), seguidos por los fosfolípidos (1.0-1.3%) y en menor concentración el colesterol (0.3%-0.4%) y trazas de otros lípidos (5,17,26,29,30).

#### 3.3.2.1 Triacilgliceroles y otros acilgliceroles

Los triacilgliceroles son insolubles en agua y son transportados en el cuerpo en forma de emulsiones, lipoproteínas y como ácidos grasos libres. Son solubles en solventes no polares, como hexano, dietiléter y cloroformo; mezclas de estos solventes con metanol o etanol se utilizan para extraer lípidos de sus fuentes.

La estructura de los triacilgliceroles es importante porque es uno de los factores claves que controla la absorción intestinal de los lípidos de la leche. Los triacilgliceroles de la leche son hidrolizados por las lipasas bucal, gástrica y pancreática. En la leche materna, la lipasa estimulada por las sales biliares es muy activa en el intestino del niño lactante.

En ésta porción de lípidos se encuentran los ácidos grasos insaturados de cadena larga (13,18,26,29-31).

Las trazas de los diacilgliceroles, monoacilgliceroles y ácidos grasos libres, que son productos de la lipólisis, son lípidos bipolares, que aparecen en la leche humana. Estos lípidos pueden provenir de pequeñas cantidades que permanecen desde la biosíntesis o, principalmente, de la acción de las enzimas lipolíticas (lipasas) que hidrolizan los triacilgliceroles a ácidos grasos libres y monoacilgliceroles (13,17,18,26,29,31).

Algunos de los ácidos grasos libres y monoacilgliceroles formados durante la lipólisis de las grasas en el estómago y en el intestino delgado son altamente microbicidas, constituyendo uno de los mecanismos de defensa más importantes para el niño. El efecto microbicida es un potente mecanismo de defensa en niños lactantes, particularmente ayuda a controlar la diarrea causada por Giardia lamblia y otros microorganismos (26,28,29).

### 3.3.2.2 Fosfolípidos

Los fosfolípidos son sustancias bipolares, por lo que una de sus funciones es ser emulsificantes y estabilizadores de los glóbulos de grasa en la leche. Además, éstos son una fuente de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. Estos lípidos constituyen otro mecanismo de defensa de la leche materna, esto explica en parte porque en los niños amamantados la incidencia y severidad de la diarrea es menor que en los no amamantados. Entre los fosfolípidos que se encuentran en la leche materna están: Esfingomielina (38.9 %), Fosfatidilcolina (27.5 %), Fosfatidiletanolamina (19.9 %), Fosfatidilserina (8.4 %), Fosfatidilinositol (5.3 %), Gangliósidos (11 %), y trazas de Lisofosfatidilcolina, Fosfatidiletanolamina, Ceramidas y Cerebrósidos (13,28-30).

### 3.3.2.3 Esteroles

Dentro del grupo de los esteroles el que se encuentra en mayor porcentaje es el colesterol. Aproximadamente el 15% de éste está en forma de éster. También se ha encontrado demosterol. El colesterol es un precursor de las hormonas sexuales, ácidos biliares y vitamina D-3 (13,29,30).

### 3.4 Técnicas de muestreo para obtención de leche materna:

Existen dos tipos principales de técnicas para recolectar la leche:  
Extracción y Goteo

- Extracción: ésta técnica puede ser de tipo mecánico o manual. Si es del tipo mecánico, se realiza con la ayuda de una bomba manual o eléctrica para succionar el contenido total de leche de uno o ambos pechos. Si es del tipo manual, se consigue con dos movimientos, en primer lugar, se comprime con las manos toda la glándula, empezando por la base y continuando hasta la aréola. Al presionar firmemente durante toda la maniobra, se impulsa la leche hacia los conductos galactóforos. Con el segundo movimiento se vacían los senos: se sujeta la mama con una mano y con el índice y el pulgar de la otra mano se comprime repetidamente el tejido situado por detrás de la aréola (11,27).
- Goteo: éste consiste en la colección de leche que gotea del pecho opuesto al que el niño utiliza durante el tiempo que está mamando. (1,27).

De acuerdo a la técnica utilizada, la composición de la leche varía.

La leche materna que se colecta con el método de goteo tiene menos contenido de grasa que con el de extracción, ya que no se ejerce ninguna fuerza externa que permita extraer involuntariamente el total de leche y, por lo tanto, de grasa acumulada en el pecho de la madre. El método por extracción manual no siempre rinde muestras reproducibles. La extracción mecánica utiliza una bomba eléctrica, facilita la medición del volumen de leche y se obtienen muestras representativas (1,32-34).

Para determinar mejor el contenido de grasa de leches almacenadas es recomendable la homogenización de éstas por un tratamiento ultrasónico. Dicho procedimiento es rápido y eficiente, además es recomendable congelar las muestras a temperaturas menores o iguales a  $-20^{\circ}\text{C}$  para evitar la degradación de la grasa (35).

### 3.5 Metodologías para la determinación de lípidos:

Existen varias técnicas para la determinación de lípidos en leche materna. Entre ellas están: Folch modificado (se extraen grasas totales mediante la adición de cloruro de metileno, un solvente tóxico), Lípidos totales (hace uso de solventes corrosivos como el ácido fosfórico concentrado para extraer la grasa), crematocrito (la grasa se separa de los componentes hidrosolubles de la

leche mediante centrifugación, la porción lipídica se determina con un vernier), Roese-Gottlieb (éste método con respecto al de Folch modificado, extrae muy poca cantidad de fosfolípidos), Babcock (éste separa la grasa de la leche por el calor que genera la adición de ácido sulfúrico), Babcock modificado (utiliza el mismo principio que el de Babcock con la diferencia que aquí ya no se hace uso de ácido sulfúrico sino que a la leche se le agrega una solución de TritónX-100, que al igual que el ácido sulfúrico cambia las tensiones superficiales de los líquidos de la leche separando las grasas de la misma), enzimático (determina la cantidad de NADH formado del glicerol proveniente de los triacilglicerolos, con lo que se estima la concentración de triacilglicerolos presentes) (13,17,30,36).

A continuación se describen los métodos que se compararan en éste estudio. Las ecuaciones necesarias para hacer los cálculos se presentan en los anexos.

### 3.5.1 Método de Folch modificado<sup>1</sup>

Este método determina grasas totales extraídas con cloruro de metileno. Es un método bastante específico y confiable, ya que permite eliminar componentes que podrían interferir con la determinación de las grasas.

La técnica consiste en agregar cloruro de metileno, metanol y cloruro de sodio a la leche. Se forman tres capas bien definidas. La capa metanólica (fracción de metanol + compuestos polares), que se encuentra en la parte superior, la capa blanca que es la capa proteínica y se encuentra en la fase intermedia, y la capa lipídica en el fondo del tubo en el cloruro de metileno.

Al extracto obtenido (porción lipídica), se le añade sulfato de sodio anhidro en polvo, para absorber cualquier partícula de agua que se haya transferido a la capa de cloruro de metileno. Se evapora el cloruro de metileno, con el fin de dejar en seco la porción lipídica. La determinación se hace por peso.

---

<sup>1</sup> Teraawa Y. Within-day variability in lipid concentrations of human milk. Nutr Department. UC Davis. Unpublished document.

### 3.5.2 Método Babcock modificado<sup>2</sup>

Este método determina grasas totales y se basa en el poder que tiene la combinación del Tritón X-100 y el hexametáfosfato de sodio en bajar la tensión superficial de los líquidos. La separación de la grasa es por medios físicos ayudada por el calentamiento de la muestra en baño de agua.

### 3.5.3 Método enzimático<sup>3</sup>

En este método, los triacilgliceroles se hidrolizan a glicerol y ácidos grasos por el efecto de saponificación alcalina. Luego, los ácidos grasos se precipitan utilizando una solución de sulfato de magnesio, dejando al glicerol en solución. El glicerol libre se fosforila por medio de la gliceroquinasa (EC 2.7.1.30). Finalmente, el glicerol-fosfato se oxida a gliceraldehído-3-fosfato, con la reducción acoplada de NAD<sup>+</sup> a NADH, mediante la reacción catalizada por la glicerol-fosfato deshidrogenasa (EC 1.1.1.8).

La cantidad de NADH formado, es equivalente a la cantidad de glicerol presente y ésta es proporcional a la cantidad de los triacilgliceroles. Las lecturas se realizan a 340 nm, que es la longitud de onda en donde se observa la máxima absorptividad del NADH.

### 3.5.4 Método Crematocrito

Este método de tamizaje. Este micrométodo se utiliza para la determinación de grasas totales y contenido energético de la leche materna, y se basa en la centrifugación de la leche en una centrífuga de hematocrito, la grasa es separada de los demás componentes por diferencia de densidades quedando la grasa en la parte superior. A veces se observa una capa traslúcida de color amarillo con aspecto de aceite. El porcentaje de crema o crematocrito se lee en un tubo capilar de hematocrito (17,20).

---

<sup>2</sup> Método RB para la determinación del contenido de grasa en la crema. LUCAM. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social de Guatemala. Documento Técnico.

<sup>3</sup> Handelman G. Determination of triglyceride in milk: Alkaline hydrolysis followed by enzymatic measurement of glycerol. UC Berkeley. 1993. Unpublished Document.



### 3.5.5 Validación y caracterización de métodos analíticos <sup>4</sup>

Validación de un método analítico puede entenderse como los procesos mediante los cuales se establece, por medio de estudios de laboratorio, satisfacen los requerimientos de la aplicación analítica deseada.

Parámetros analíticos que se utilizan en un ensayo de validación:

#### (a) Respuesta del blanco

Este ensayo utiliza varias alícuotas de una misma matriz que no contenga el analito de interés, por lo que la respuesta debe ser significativamente igual a cero (Ver anexo 4).

#### (b) Precisión

La precisión indica que tan bien se comporta el método bajo condiciones diferentes de uso repetido. Es decir la variación de resultados de una misma muestra. Tiene dos componentes: la variación aleatoria entre réplicas en un mismo ensayo o corrida, llamada la variación intraensayo; y la variación que ocurre entre ensayos independientes, llamada variación entre ensayos. Para evaluar la precisión, se necesita usar muestras control. Un control es una muestra con una concentración conocida del analito.

Un método sensible, válido y reproducible es aquel que posee un error analítico (Ver anexo 4) inferior al 5%, aunque en ocasiones uno que tiene un error analítico del 10% puede ser aceptable.

#### (c) Sensibilidad

Es la mínima concentración del analito discriminable en el rango de trabajo.

#### (d) Rango analítico lineal

La Federación Internacional de Química Clínica define el rango analítico como "el rango de concentración u otra cantidad del analito en el espécimen sobre el cual el método es aplicable sin modificación". Es importante establecer los límites máximo y mínimos de cuantificación, y el límite de detección.

El límite máximo de cuantificación es aquella concentración a partir de la cual la respuesta se desvía del comportamiento esperado según la curva de calibración. El límite mínimo de cuantificación es la concentración más baja en

donde la respuesta tiene una variación similar a los puntos intermedios de la curva.

(e) Recuperación

Es la razón de la cantidad recuperada a la cantidad agregada del analito de interés y se expresa como porcentaje (ver anexo 4).

(f) Adición de estándares

El método de adición de estándares se usa para evaluar si la matriz tiene alguna clase de interferencia no específica en el análisis. El principio del método es agregar a una misma matriz cantidades diferentes del analito y luego determinarlo. En este ensayo también se puede evaluar la recuperación.

(g) Exactitud

Con éste término se define la cercanía como el método establece la concentración real del analito.

---

\* Los conceptos aquí expuestos fueron resumidos de un documento sobre caracterización y validación de metodologías analíticas de química y bioquímica. Mazariegos D. y Dary O., 1995.

#### 4. JUSTIFICACION

La leche materna es el alimento natural apropiado para el niño, ya que está adaptada a las necesidades fisiológicas del mismo. La leche posee varios macronutrientes, dentro de los cuales se encuentran los lípidos, que bajo condiciones normales son la fuente de energía más importante (50 - 60%). Además, ésta porción contiene ácidos grasos y vitaminas liposolubles esenciales para el crecimiento y desarrollo normal del niño (2,11).

Por las razones mencionadas anteriormente, la determinación de lípidos en la leche materna es rutinaria e indispensable en la investigación nutricional. De acuerdo a estudios realizados anteriormente, el método de Folch modificado es el de elección para la cuantificación de lípidos, ya que sus resultados son reproducibles, confiables y exactos. Sin embargo, este método requiere mucho tiempo para su realización, no se puede trabajar con un gran número de muestras, y los solventes que utiliza son muy tóxicos (20,37,38).

Un método que se utiliza para estimar con facilidad el contenido de lípidos de la leche es el crematocrito, que según Ferris y Jensen 1984 es un método que correlaciona bien con el método de Folch modificado cuando se usa en leche fresca. Sin embargo, este método tiene las desventajas de que no proporciona datos confiables al analizar leches que han estado congeladas, ya que la lipasa de la leche hidroliza los lípidos de la misma destruyendo la capa de crema y esto dificulta su lectura, produciendo resultados erróneos (17,20).

Debido a que en la mayoría de estudios que evalúan contenido de grasa en leche se hacen en muestras que se almacenan en congelación, el método utilizado debe ser confiable, exacto, rápido, económico para muestras almacenadas en esta forma.

Con base en la información expuesta anteriormente, la búsqueda de un método para la determinación de lípidos en leche humana, que sea rápido, exacto y simple, está plenamente justificado. En este estudio se analizaron dos métodos alternativos para reemplazar al método de Folch modificado, éstos fueron el de Babcock modificado, y el enzimático. Además, aunque no se había contemplado en

el protocolo se aprovechó para hacer determinaciones utilizando el método del crematocrito. Entre los métodos mencionados se caracterizó con detalle el enzimático, ya que sus resultados fueron más comparables a los de Folch.

## 5. OBJETIVOS

- 5.1 Comparar los métodos de Babcock modificado, y el enzimático contra el método de Folch modificado como patrón de referencia, para la determinación del contenido de lípidos en leche materna.
  
- 5.2 Validar el método alternativo al de Folch modificado que reproduzca mejor sus resultados.
  
- 5.3 Comparar contra Folch modificado el método Crematocrito y así comprobar que éste no es confiable en la determinación de lípidos en leche materna almacenada en congelación.

## 6. HIPOTESIS

Los métodos de Babcock modificado, Crematocrito y el enzimático son comparables en cuanto validez, sensibilidad y reproducibilidad al método de Folch modificado.

## 7. MATERIALES Y METODOS

## 7.1 Universo de trabajo

Métodos de Folch modificado, Babcock modificado, Crematocrito, Enzimático, y alícuotas de leche materna cuyo contenido lipídico cubren el intervalo de concentraciones esperadas en poblaciones humanas.

## 7.2 Recursos

7.2.1 Humanos

- Autora: Br. Karla Marlova Micheo Almengor
- Asesora: Licda. Ana Carolina Martínez Castellanos
- Asesor: Dr. Omar Dary

7.2.2 Institucionales

- Laboratorio Especializado de Química y Bioquímica del Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP).

7.2.3 Físicos

## 7.2.3.1 Materiales

## 7.2.3.1.1 Materiales de laboratorio

- Bulbos de hule
- Espátula
- Frascos de plástico y vidrio para almacenamiento de reactivos
- Guantes desechables
- Masking-tape
- Papel aluminio
- Papel filtro (MSI, 10.0 micron, 90 mm, 10/PK)
- Papel parafinado
- Parafilm
- Pinzas
- Pipetas manuales de 10, 100, 1000 uL
- Platillos de aluminio para pesar (VWR Scientific)

- Puntas para pipetas
- Tapones de teflón
- Toalla de papel

#### 7.2.3.1.2 Cristalería

- Balones aforados de 500 mL, 1000 mL
- Beakers de 25 mL, 100 mL, y 250 mL
- Botellas de Babcock para leche de 18 g
- Celdas para espectrofotómetro de 1.0 mL
- Embudos
- Gradillas para tubos de ensayo
- Pipetas serológicas graduadas
- Tubos de ensayo
- Tubos de vidrio con tapón de rosca
- Varilla de vidrio
- Viales de vidrio de 8 mL con tapón de rosca

#### 7.2.3.1.3 Equipo

- Agitador magnético
- Agitador Vórtex (Gente 2; modelo G-560)
- Balanza analítica (Sartorius)
- Baño de agua a 35-37°C (THELCO; modelo 83)
- Bloque de calentamiento (Pierce)
- Campana de extracción
- Centrífuga (Internacional Centrifuge; modelo PR-2)
- Centrífuga Babcock (Garver Electrífuga; modelo 55)
- Congelador a -20°C
- Cronómetro
- Espectrofotómetro (Varian modelo 635)
- Pipeteador automático para pipetas graduadas (Drummond)
- Refrigeradora (Atlas)
- Sonicador (Heat systems Co.)



- Termómetro (ASTM - 7C)

#### 7.2.3.1.4 Reactivos

- Agua destilada
- Etanol absoluto (MERCK; p.a; 983.2500)
- KOH (MERCK; p.a; 5033.1000)
- MgSO<sub>4</sub> (MERCK; p.a; Art. 5886)
- Kit comercial de triglicéridos (SIGMA; Procedimiento No.320-UV)
- Tritón X-100 (SIGMA; T-6878)
- Metanol absoluto (BAKER ANALYZED; GR; 9070-03)
- Cloruro de Metileno (BAKER ANALYZED; GR; 9315-03)
- NaCl (MERCK; p.a, 6404.1000)
- Sulfato de Sodio anhidro (Seeize-Hannover; p.a; 31481)
- Acetona (EM; Cas 67-641)

### 7.3 Procedimiento

#### 7.3.1 Método de Folch modificado

- Pesar, rotular y anotar la tara de los platos de aluminio (manejar los platos de aluminio con guantes desechables o pinzas, para evitar depósitos de grasa provenientes de las manos del operador).
- Colocar la muestra de leche a temperatura ambiente luego ponerla en baño de agua a 37°C por 15 minutos y meter la muestra en un baño de ultrasonido para homogenizar perfectamente.
- Mezclar la muestra de leche, pipetear 1 mL, pesar y depositar en un tubo de ensayo de vidrio con tapón de rosca.
- Trabajar en una campana de extracción y usar guantes dobles (guantes desechables y guantes gruesos de goma), añadir 3 mL de metanol absoluto (MeOH) y 6 mL de Cloruro de metileno (MeCl) a cada tubo. Mezclar con vórtex perfectamente y luego añadir 6 mL de Cloruro de Sodio-0.7%, mezclar nuevamente.
- Centrifugar las muestras a 3000 rpm por 10 minutos.

- Transferir la capa del fondo con una pipeta pasteur de punta larga de vidrio (fracción de MeCl + lípidos) de cada tubo a un segundo tubo con tapón de rosca (usar la misma pipeta para cada muestra durante todo el ensayo, para así minimizar la adhesión de la grasa dentro de la pipeta, secándola bien entre cada uno).
- Repetir la extracción con 1.5 mL de MeOH y 6 mL de MeCl. Centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos.
- Con una pipeta Pasteur de punta larga, transferir la capa del fondo de cada muestra los tubos con tapón de rosca en la que se colocó la primera fracción. Obtener la mayor cantidad posible de la capa del fondo cuidadosamente sin agitar la fase proteínica, la que se localiza entre la capa de cloruro de metileno y la fase acuosa.
- Añadir de 3 a 5 gramos de sulfato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) en polvo a los tubos con la porción lipídica.
- Centrifugar a 3000 rpm por 5 minutos. Decantar a través de un filtro de teflón (10  $\mu\text{m}$ ) recibiendo la solución, sobre un plato de aluminio previamente tarado.
- Añadir 5 mL de MeCl a cada tubo que contenía la porción lipídica. Mezclar y luego centrifugar a 3000 rpm por 5 minutos. Decantar a través del mismo filtro de teflón y recibir la solución en el mismo plato de aluminio.
- Dejar que el MeCl se evapore (dentro de una campana con extractor) en los platos de aluminio por un día (24 horas).
- Al transcurrir 24 horas, pesar los platos de aluminio que contienen la porción lipídica (manejarlos con guantes desechables).
- La concentración de grasa se calcula por diferencia de peso de los platos de aluminio después y antes de recibirse la fracción lipídica (Ver anexo 2).

**NOTA:**

- Para revisar los filtros, éstos deben lavarse con agua caliente destilada abundante y dejarlos en alcohol.

### 7.3.2 Método de Babcock modificado para cuantificación de lípidos

- Descongelar la muestra de leche a temperatura ambiente, luego ponerla en baño de agua a 37°C por 15 minutos.
- Colocar la muestra en un baño de ultrasonido para homogenizarlas perfectamente, agitar y pesar 8.8 mL de leche materna e inmediatamente después, colocar en una botella Babcock de 9 g para leche dejándola caer libremente por la pared.
- Agregar 8.8 mL de solución emulsificante de Triton X-100, agitar cuidadosamente para no dar lugar a la formación de espuma; poner en baño de agua en ebullición durante 10 minutos, agitar con cuidado ocasionalmente.
- Agregar una solución 1:1 de metanol/agua destilada hasta el cuello de la botella y centrifugar por 5 minutos. La centrífuga debe de estar previamente calentada a 38°C.
- Agregar una solución 1:1 de metanol/agua hasta la marca superior de la columna graduada de la botella de Babcock.
- Centrifugar de 5 a 10 minutos. Observar la separación de las fases.
- Leer inmediatamente con ayuda de un compás. Para obtener lecturas constantes poner la botella en baño de agua durante 5 minutos a 40°C y efectuar tres lecturas con un compás (Ver anexo 2).

### 7.3.3 Método Enzimático

- Descongelar las alícuotas a temperatura ambiente y luego ponerlas en baño de agua a 37°C por 15 minutos.
- Colocar la muestra en un baño de ultrasonido para homogenizar perfectamente. Agitar.
- Añadir en un vial de 8 mL, 0.25 g de leche, agregar 5.0 mL de etanol absoluto y 0.25 mL de KOH al 30%. Tapar con tapones de teflón cada tubo, mezclar e incubar a 90°C por 30 minutos.
- Dejar enfriar. Transferir 1.0 mL de la solución anterior a un segundo vial, y añadir 5.0 mL de  $MgSO_4$  0.15 M, agitar perfectamente y luego

centrifugar 3500 rpm por 2 minutos.

- Transferir 0.15 mL del sobrenadante a un tubo de 7 X 1 cm o celda espectrofotométrica. Agregar 0.75 mL del reactivo para determinar Triglicéridos (Sigma), mezclar bien. Leer la absorbancia inicial a 340 nm

-Añadir 0.2 mL de glicerolquinasa y mezclar. Esperar alrededor de 10 minutos y leer nuevamente la absorbancia a 340 nm (absorbancia final).

- Calcular el contenido de lípidos en la leche utilizando el coeficiente de absorptividad del NADH ( $\epsilon = 6.22 \times 10^3 \text{ cm.mol/L}$ ), el peso molecular promedio de los ácidos grasos, y la diferencia de absorbancias después y antes de añadir la glicerolquinasa (Ver anexo 2).

#### 7.3.4 Método Crematocrito

- Descongelar a temperatura ambiente las muestras de leche y luego ponerlas en baño de agua a 37°C por 15 minutos.

- Colocar la muestra en un baño de ultrasonido para homogenizar perfectamente. Agitar.

- Llenar manualmente con leche los capilares. Hacer duplicados para cada muestra.

- Tapar un extremo del capilar con plasticina.

- Centrifugar por 15 minutos en una microcentrífuga.

- Leer inmediatamente con ayuda de un vernier y calcular la concentración de lípidos (Ver anexo 2).

### 7.4 **Diseño experimental**

#### 7.4.1 Muestreo

Las muestras de leche se seleccionaron mediante el método de expresión mecánica y se almacenaron a -20°C. Cada muestra se dividió en tres alícuotas, una para cada método, en tubos plásticos resistentes al congelamiento.

Para la identificación de las muestras con los valores deseados, se determinó el contenido de grasa por el método de Folch en 46 muestras. De estas muestras, se seleccionaron 35 muestras con resultados de grasa en 4 intervalos

que cubrían todo el rango de grasa. Estos bloques fueron 1.4 - 2.2, 2.3 - 3.0, 3.1 - 3.8, 3.9 - > g/ 100g. Estadísticamente, el número de muestras necesarias para este estudio fue de 27 (Anexo 3).

El análisis de muestras procedió al azar en cada método ensayado. Los resultados de las determinaciones se agruparon en los bloques correspondientes hasta terminados los análisis.

#### 7.4.2 Análisis Estadístico

Los resultados se analizaron utilizando diseño de bloques completos para cuatro tratamientos, en donde los tratamientos fueron los métodos a comparar. Los bloques fueron los rangos de concentración de grasa en leche, realizándose ocho réplicas por bloque a excepción del último bloque que se realizaron once réplicas.

Se trabajaron por conveniencia todas las muestras por cada tratamiento hasta terminar. Se aleatorizó el orden de procesamiento de las muestras en cada método. En los cuatro métodos, se repitió el análisis de aquellas muestras con las que el valor de cada réplica se apartó del promedio en más de dos veces el coeficiente de variación del método. Estos coeficientes fueron 3.51% para el de Folch modificado, 3.50% para el enzimático, 4.24% para el de Babcock modificado, y 3.25% para el crematocrito. Estos límites fueron las variaciones intrínsecas determinados para cada uno de los métodos mencionados con base en el análisis de una misma muestra de leche.

Los datos se analizaron por correlación lineal por pares de todas las posibles combinaciones de los cuatro métodos. Por medio de "t" de Student se estableció si existían diferencias significativas de la pendiente diferente a uno. Además, se hizo análisis de concordancia de los resultados de los cuatro métodos, y también por "t" de Student se determinó si existían diferencias significativas del sesgo diferente a cero (39).

#### 7.5 Validación del mejor método alternativo

Las propiedades analíticas del mejor método alternativo fueron determinadas. Los parámetros analizados fueron:

(a) Respuesta del blanco

Se corrieron 10 alícuotas de solución salina con el propósito de tener una matriz sin lípidos. La respuesta debía ser significativamente igual a cero. Después de la corrida de las alícuotas, la respuesta no fue cero por lo que se obtuvo una respuesta media y su desviación estándar (Ver anexo 4).

(b) Precisión

Para este ensayo, se utilizaron alícuotas de leche materna con todo su contenido natural de lípidos. Se evaluó lo siguiente:

- Variación intraensayo: Se seleccionaron alícuotas de leche materna a 3 niveles de concentración que abarcaron el rango de trabajo y se analizaron 10 veces. La variación se reportó en términos del coeficiente de variación.

- Variación entre ensayos: Se tomaron las mismas tres alícuotas de leche materna utilizadas para evaluar la variación intraensayo y se analizaron en triplicado en 10 corridas diferentes. La variación se reportó en términos del coeficiente de variación.

(c) Sensibilidad

Para estimar la sensibilidad, se utilizaron los límites de confianza al 95% de tres alícuotas de leche materna con concentraciones de grasa baja, mediana y alta. El intervalo de confianza al 95% de cada punto determinó la concentración mínima diferenciable en estos tres niveles. Esta concentración diferenciable determina también el número de cifras significativas con las que se informa la concentración estimada de grasa en las muestras.

(d) Rango analítico lineal

Una vez establecido que existía una relación proporcional entre la concentración de triglicéridos y la respuesta medible, los datos se ajustaron a una ecuación. Para determinar la ecuación, ésta se calculó usando una muestra de leche con concentración basal baja de grasa, y a la cual se agregaron diferentes niveles de triglicéridos (Ver anexo 4).

Además se elaboró una gráfica en la cual se identificó lo siguiente: el límite máximo de cuantificación (límite superior de concentración; aquélla a partir de la cual la respuesta se desvía del comportamiento esperado, límite

RECIBIDO EN EL INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA Y CENSOS  
MEXICO, D.F. A LAS 10:00 HORAS DEL DIA 15 DE ABRIL DE 1984

mínimo de cuantificación (ésta es la concentración más baja en donde la respuesta tiene una variación similar a los puntos intermedios de la curva); y el límite de detección teórico: ésto es la concentración estimada cuya respuesta es el valor de la respuesta del blanco más tres veces su desviación estándar.

(e) Recuperación

Se determinó por la técnica de adición de estándares. Para ello, se seleccionó y analizó una leche con concentración baja en grasa. Esta se dividió en varias alícuotas y a cada una de ellas se le agregó estándar de triglicéridos para obtener diferentes niveles de las mismas. Se determinó el porcentaje de recuperación para cada fracción (Ver anexo 4).

## 8. RESULTADOS

Antes del análisis de las muestras de leche, se estandarizaron los métodos y se estableció el coeficiente de variación máximo para los duplicados, para ello, una misma muestra de leche se analizó 20 veces con cada uno de los métodos. Los coeficientes de variación encontrados fueron 3.51% para el método de Folch modificado, 3.50% para el enzimático, 4.24% para el de Babcock modificado, y 8.2% para el crematocrito. Por lo tanto, se repitieron todas aquellas muestras de leche cuyos valores para cada réplica se apartaron más de dos coeficientes de variación de su promedio.

En el método de Folch se determinó la cantidad de residuo de grasas totales que quedaba en el filtro para asegurar que no dejaba exceso de lípidos al filtrarse encontrándose 0.13%.

Los resultados de los contenidos de grasa de las muestras de leche estimados con cada uno de los métodos aparecen en la Tabla 1.



Tabla 1

BLOQUE	TRATAMIENTOS				
	# de muestra	Folch mg/100g	Enz mg/100g	Bah(mod) mg/100g	Cremat mg/100g
RANGO A (1.3-2.2 mg/ 100g)	16	1.4	1.4	3.0	2.2
	15	1.5	1.5	0.9	2.4
	21	1.6	1.4	3.1	2.7
	9	1.8	1.7	1.2	3.9
	22	2.0	1.5	2.2	2.6
	14	2.2	2.3	2.4	4.5
	30	2.2	2.2	2.8	3.4
	32	2.2	2.9	1.8	6.4
	RANGO B (2.3- 3.0 mg/ 100g)	27	2.3	2.5	1.1
26		2.4	2.6	4.0	3.7
33		2.4	2.5	3.6	4.1
12		2.6	2.7	3.1	4.4
28		2.7	2.6	6.0	5.3
13		2.7	2.7	2.8	4.3
11		3.0	3.0	3.7	4.5
5		3.0	3.0	2.8	5.0
RANGO C (3.1- 3.8 mg/ 100g)	7	3.1	3.2	3.1	4.8
	3	3.2	3.2	3.2	8.3
	1	3.3	3.5	3.6	3.6
	45	3.5	3.5	3.7	3.1
	10	3.6	3.8	4.3	8.3
	46	3.6	3.6	4.4	4.2
	42	3.7	3.7	4.0	7.8
	4	3.8	3.6	4.1	8.8
RANGO D (3.9- > mg/ 100g)	24	4.3	4.4	3.6	8.0
	6	4.7	4.7	4.6	8.0
	41	4.8	4.8	6.3	9.2
	43	4.9	4.7	7.6	8.6
	44	5.1	5.1	9.3	9.3
	25	5.2	5.3	1.0	4.5
	38	5.4	5.4	10.4	10.2
	39	5.5	5.5	10.2	10.0
	36	5.8	5.7	11.3	7.3
	40	5.9	5.8	10.8	9.8
	37	6.8	6.8	11.2	11.0

Para determinar la similitud entre métodos se realizaron análisis de correlación, y análisis de concordancia entre parejas de los métodos.

Para comparar estadísticamente los métodos se utilizó una  $t_{95\%}$  (95%, 35 - 2 = 33 grados de libertad) = 2.036 y un intervalo de confianza al 95% ( $\alpha/2 = 0.025$ ).

### 8.1 Folch modificado vrs. Babcock modificado

Al comparar los métodos de Folch y Babcock modificado se observó que el coeficiente de regresión (R) fue de 0.81 (Tabla 2 y Gráfica 1). Estos resultados muestran que el método Babcock no tiene correlación con respecto al método de Folch. La pendiente no es igual a uno ya que su valor está fuera de la región de aceptación ( $p < 0.05$ ) (Tabla 8). El análisis de concordancia (Tabla 9 y Gráfica 7) afirmó esta conclusión.

### 8.2 Folch modificado vrs. Crematocrito

En la tabla 3 y Gráfica 2 se compara el método Folch modificado contra el de crematocrito. Se observa que la respuesta es semejante a la obtenida con el método de Babcock modificado, obteniéndose un  $R = 0.82$  en el análisis de correlación. La pendiente no es igual a uno ( $p < 0.05$ ) (Tabla 8). Para el análisis de concordancia (Tabla 9 y Gráfica 8) se observó que el  $IC_{95\%}$  para el sesgo no incluye al cero. Por lo que al igual que el caso anterior se rechazó la hipótesis nula. Puede decirse entonces que el crematocrito tampoco se compara con el método de Folch.

### 8.3 Folch modificado vrs. Enzimático

La comparación del método de Folch contra el Enzimático dió un valor R de 0.99, lo que denota una excelente correlación, y la cual fue consistente para todos los rangos (Tabla 4 y Gráfica 3). Se concluye por lo tanto que el método de Folch y el enzimático proporcionan resultados comparables. La pendiente es igual a uno ( $p < 0.05$ ) (Tabla 8). En la tabla 9 y Gráfica 9 se presenta el análisis de concordancia de estos dos métodos. El intervalo de confianza al 95%

**Tablas Análisis de correlación lineal**  
**Tabla 2 Folch modificado contra Babcock modificado**

Rango (mg/ 100g)	Ecuación de la recta	R
1.4 - 2.2	$Y = (0.03 \pm 0.96)X + (2.13 \pm 0.87)$	0.00
2.3 - 3.0	$Y = (1.05 \pm 2.14)X + (0.60 \pm 1.44)$	0.19
3.1 - 3.8	$Y = (1.68 \pm 0.43)X + (-2.09 \pm 0.29)$	0.19
3.9 - >	$Y = (3.56 \pm 1.28)X + (-11.10 \pm 2.73)$	0.68
Total	$Y = (1.74 \pm 0.22)X + (-1.48 \pm 1.82)$	0.81

Donde la ecuación para la regresión es  $Y = bx + a$  donde  $a =$ intercepto,  $b =$  pendiente,  $Y =$  concentración de grasa por el método Babcock modificado y  $x =$  concentración del método de Folch modificado dada en mg/ 100g.

**Tabla 3 Folch modificado contra Crematocrito**

Rango (mg/ 100g)	Ecuación de la recta	R
1.4 - 2.2	$Y = (2.98 \pm 1.17)X + (1.99 \pm 1.06)$	0.72
2.3 - 3.0	$Y = (0.55 \pm 0.83)X + (3.10 \pm 0.56)$	0.26
3.1 - 3.8	$Y = (3.58 \pm 3.67)X + (6.41 \pm 2.42)$	0.37
3.9 - >	$Y = (1.05 \pm 0.81)X + (3.09 \pm 1.73)$	0.40
Total	$Y = (1.51 \pm 0.18)X + (0.69 \pm 1.52)$	0.82

Donde la ecuación para la regresión es  $Y = bx + a$  donde  $a =$ intercepto,  $b =$  pendiente,  $Y =$  concentración de grasa por el método Crematocrito y  $x =$  concentración del método de Folch modificado dada en mg/ 100g.

**Tabla 4 Folch modificado contra Enzimático**

Rango (mg/ 100g)	Ecuación de la recta	R
1.4 - 2.2	$Y = (1.36 \pm 0.36)X + (0.66 \pm 0.33)$	0.84
2.3 - 3.0	$Y = (0.78 \pm 0.09)X + (0.62 \pm 0.06)$	0.96
3.1 - 3.8	$Y = (0.74 \pm 0.22)X + (0.90 \pm 0.15)$	0.81
3.9 - >	$Y = (1.00 \pm 0.04)X + (-0.04 \pm 0.08)$	0.99
Total	$Y = (0.99 \pm 0.02)X + (0.04 \pm 0.18)$	0.99

Donde la ecuación para la regresión es  $Y = bx + a$  donde  $a =$ intercepto,  $b =$  pendiente,  $Y =$  concentración de grasa por el método Enzimático y  $x =$  concentración del método de Folch modificado dada en mg/ 100g.

**Tabla 5 Enzimático contra Babcock modificado**

Rango (mg/ 100g)	Ecuación de la recta	R
1.4 - 2.2	$Y = (0.15 \pm 0.59)X + (2.45 \pm 0.81)$	0.93
2.3 - 3.0	$Y = (0.16 \pm 2.17)X + (2.95 \pm 1.47)$	0.14
3.1 - 3.8	$Y = (1.99 \pm 0.35)X + (3.17 \pm 0.21)$	0.20
3.9 - >	$Y = (3.35 \pm 1.32)X + (9.89 \pm 2.84)$	0.40
Total	$Y = (1.71 \pm 0.23)X + (-1.39 \pm 1.89)$	0.83

Donde la ecuación para la regresión es  $Y = bx + a$  donde  $a =$ intercepto,  $b =$  pendiente,  $Y =$  concentración de grasa por el método Babcock modificado y  $x =$  concentración del método Enzimático dada en mg/ 100g.

Tabla 6 Enzimático contra Crematocrito

Rango (mg/ 100g)	Ecuación de la recta	R
1.4 - 2.2	$Y = (2.38 \pm 0.38)X + (-0.88 \pm 0.55)$	0.93
2.3 - 3.0	$Y = (0.40 \pm 1.04)X + (3.47 \pm 0.57)$	0.14
3.1 - 3.8	$Y = (2.02 \pm 4.22)X + (-0.97 \pm 2.56)$	0.20
3.9 - >	$Y = (1.04 \pm 0.81)X + (3.20 \pm 1.73)$	0.40
Total	$Y = (1.53 \pm 0.18)X + (0.63 \pm 1.49)$	0.83

Donde la ecuación para la regresión es  $Y = bx + a$  donde  $a =$ intercepto,  $b =$  pendiente,  $Y =$  concentración de grasa por el método Crematocrito y  $x =$  concentración del método Enzimático dada en mg/ 100g.

Tabla 7 Babcock modificado contra Crematocrito

Rango (mg/ 100g)	Ecuación de la recta	R
1.4 - 2.2	$Y = (0.39 \pm 0.70)X + (4.36 \pm 1.49)$	0.22
2.3 - 3.0	$Y = (0.02 \pm 0.16)X + (4.47 \pm 0.58)$	0.00
3.1 - 3.8	$Y = (0.95 \pm 1.95)X + (2.52 \pm 2.56)$	0.20
3.9 - >	$Y = (0.38 \pm 0.11)X + (5.72 \pm 1.24)$	0.75
Total	$Y = (0.64 \pm 0.10)X + (3.04 \pm 1.79)$	0.75

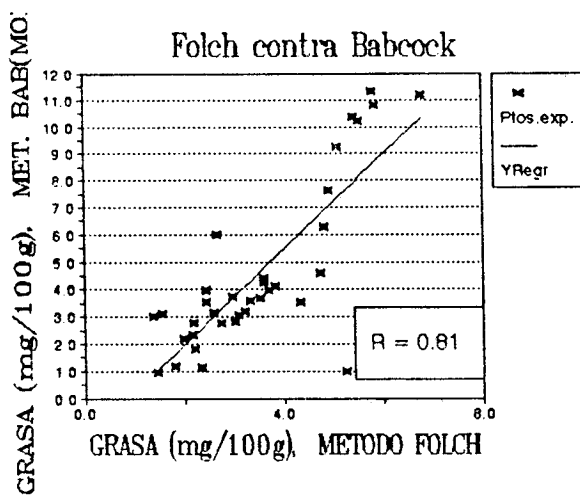
Donde la ecuación para la regresión es  $Y = bx + a$  donde  $a =$ intercepto,  $b =$  pendiente,  $Y =$  concentración de grasa por el método crematocrito y  $x =$  concentración del método Babcock dada en mg/ 100g.

Tabla 8 Análisis de correlación lineal utilizando prueba de hipótesis para la pendiente

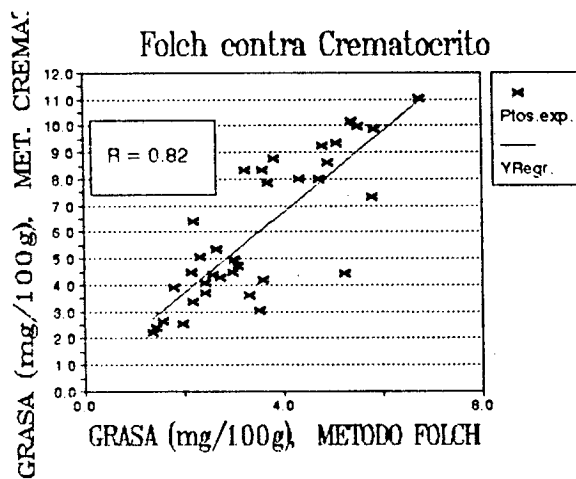
Comparación de métodos	$t_{\text{experimental}}$	Hipótesis nula ( $H_0$ )
Folch vrs Babcock.	4.162	Se rechaza
Folch vrs Cremat.	3.113	Se rechaza
Folch vrs Enz.	-0.613	Se acepta
Enz. vrs Babcock	-3.910	Se rechaza
Enz. vrs Crematocrito	3.289	Se rechaza
Bab. vrs Cremat.	-3.910	Se rechaza

Para todas las comparaciones por parejas de los métodos, la  $t$  crítica (95%,  $35 - 2 = 33$  grados de libertad) = 2.036; donde  $H_0: b = 1$ ;  $H_a: b \neq 1$ ; donde  $b =$  pendiente.

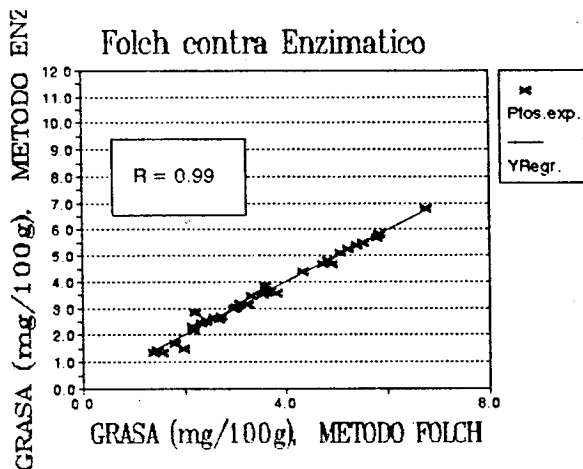
## Gráfica 1



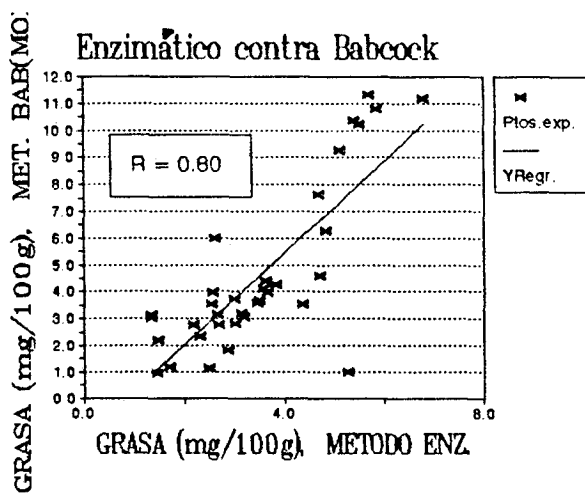
## Gráfica 2



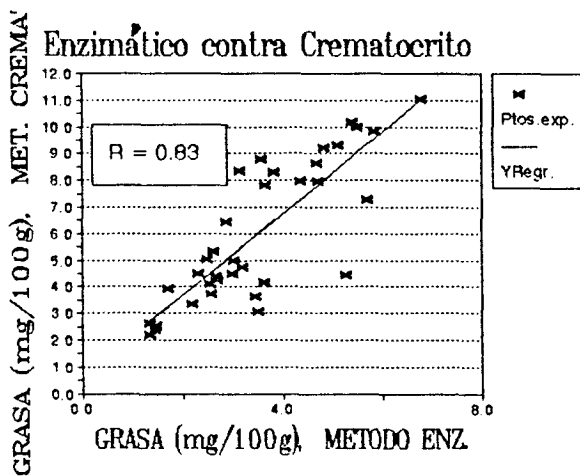
## Gráfica 3



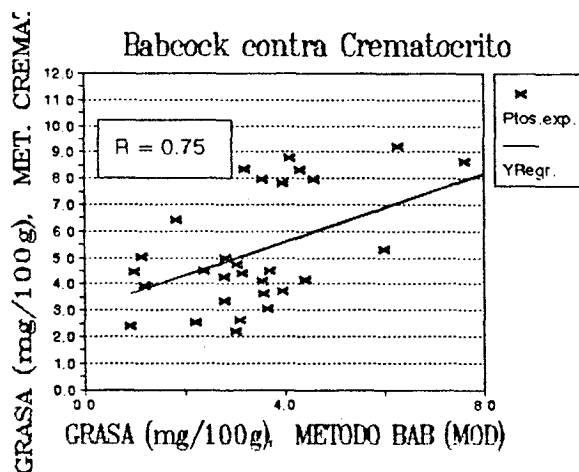
Gráfica 4



Gráfica 5

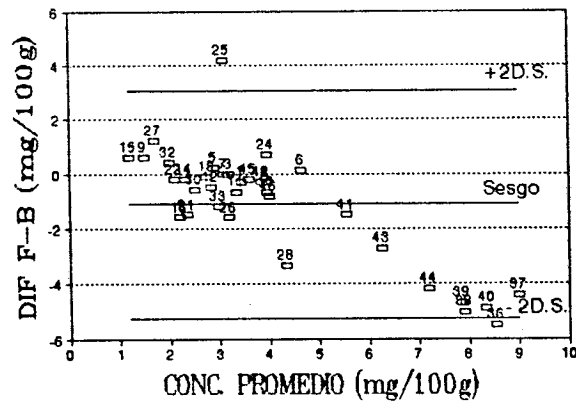


Gráfica 6



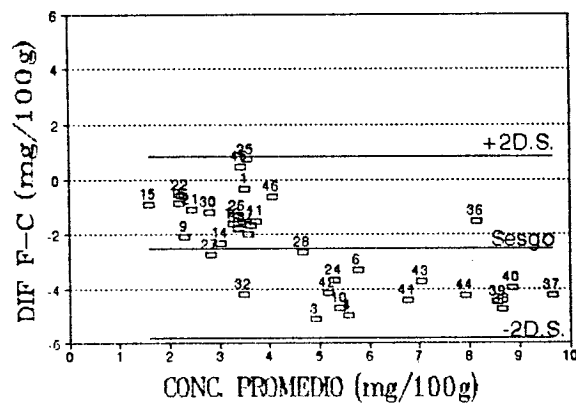
Gráfica 7

Folch contra Babcock



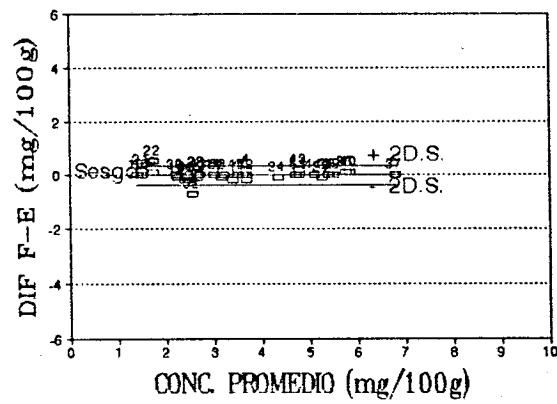
Gráfica 8

Folch contra Crematocrito



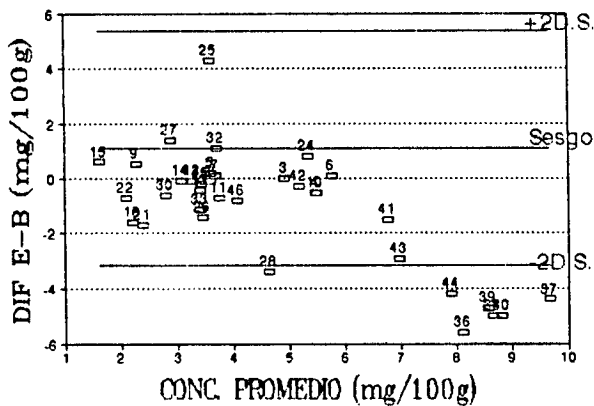
Gráfica 9

Folch contra Enzimático



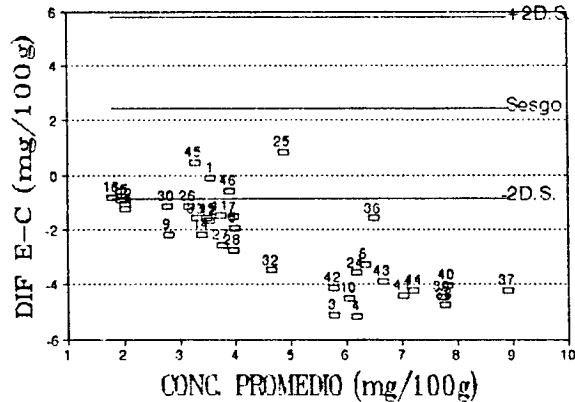
Gráfica 10

Enzimático contra Babcock



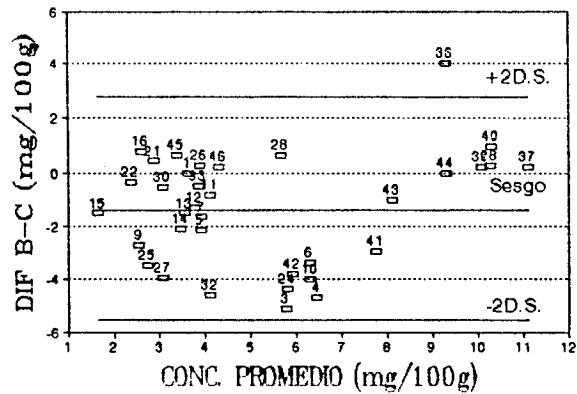
Gráfica 11

Enzimático contra Crematocrito



Gráfica 12

Babcock contra Crematocrito





**Tabla 9** Análisis de concordancia utilizando prueba de hipótesis para el sesgo

Diferencia entre métodos	Sesgo	D.S.	L.C. 95%	I.C. 95%	t <sub>experimental</sub>	Hipotesis nula (H <sub>0</sub> )
Folch - Bab	-1.114	2.081	0.716	-1.830_-0.398	* -3.168	Se rechaza
Folch - Cremat	-2.484	1.668	0.574	-3.058_-1.910	* -8.807	Se rechaza
Folch - Erz	-0.017	0.181	0.062	** -0.079_0.045	** -0.561	Se acepta
Erz - Bab	1.097	2.135	0.735	0.362_-1.832	* 3.041	Se rechaza
Erz - Cremat	2.466	1.659	0.571	1.895_-3.037	* 8.793	Se rechaza
Bab - Cremat	-1.369	2.083	0.717	-2.086_-0.652	* -3.888	Se rechaza

Para todas las comparaciones por parejas de los métodos, t crítica (95%, 35 - 2 = 33 grados de libertad) = 2.036, donde H<sub>0</sub>: sesgo = 0, H<sub>1</sub>: sesgo ≠ 0  
 \* Tuvieron sesgo estadísticamente significativo (p < 0.05).  
 \*\* Fue la única comparación cuyo IC <sub>95%</sub> sí incluyó al cero y se confirma al observar la t<sub>experimental</sub> por caer dentro de la región de aceptación por lo que se concluyó que el método espectrofotométrico no tiene sesgo estadísticamente significativo.

En conclusión sólo el método Enzimático correlacionó con el de Folch modificado (el de referencia), por lo que se procedió a validarlo.

### 8.5 Validación del método Enzimático

Se observó que el reactivo de Triglicéridos (trifosfato de adenosina, fosfoenolpiruvato, NADH, piruvato quinasa, lactato deshidrogenasa, estabilizadores y buffers) tenía un tiempo de vida útil de tres días, por lo que debió descartarse al cuarto día o cuando en el espectrofotómetro las lecturas fueron  $\leq 0.800$ .

La respuesta de blanco del método fue de 0.0108 mg/ 100g  $\pm$  0.0001mg /100g con un coeficiente de variación de 0.85% y un intervalo de confianza al 95% de [0.010- 0.0109].

Los resultados de la precisión se presentan en la tabla 10. En general se puede decir que el método tiene una precisión intraensayo de 0.55%, interensayo de 6.4% y un error analítico de 3.21%.

Tabla 10 Precisión

Precisión			
Análisis intraensayo			
	Conc. baja	Conc. mediana	Conc. alta
X (mg/dL)	2.14	3.24	6.50
D.S	0.1297	0.01792	0.1028
CV (%)	6.06	0.55	1.58
Análisis interensayo			
	Conc. baja	Conc. mediana	Conc. alta
X (mg/dL)	2.16	3.06	5.72
D.S	0.043	0.257	0.402
C.V (%)	2.01	6.4	7.02

Con los datos anteriores, se calculó que la sensibilidad del método (IC 95% intraensayo, por lo que el límite de cuantificación  $\approx 0.2$  mg/ 100 g) debe localizarse entre 0.2 - 1.4 mg/ 100g.

Para establecer el rango analítico lineal, se realizaron dos comparaciones. En la primera se agregó 750  $\mu$ L de reactivo de triglicéridos, obteniéndose un resultado lineal, hasta 6.2 mg/100g ( $R = 0.873$ ) y la segunda fue agregando el doble de reactivo de triglicéridos, 1500  $\mu$ L, incrementándose el rango analítico hasta 8.4 mg/ 100g ( $R = 0.989$ ) (Tabla 11 y Gráfica 13). Este rango es suficiente para determinar grasa en leche humana, ya que casi todas las muestras presentan valores abajo del límite máximo de cuantificación, y el cual es 22 veces mayor que el promedio (3.8 mg/100g).

La recuperación del método se realizó por la técnica de adición de estándares. La recuperación obtenida dentro del rango lineal, utilizando 1500  $\mu$ L, fue de  $95.1\% \pm 5.96$  y un coeficiente de variación de 6.27% (Tabla 11).

El límite máximo de cuantificación es de 8.40 mg/ 100g.

El límite mínimo de cuantificación posiblemente es menor a 1.4 mg/ 100g; pero éste no se pudo comprobar ya que no se contaba con matrices sin grasas totales para la determinación de concentraciones de lípidos más bajas.

El límite de detección que fue de 0.01 mg/ 100g.

Tabla 11 Recuperación y Rango Analítico Lineal

1				2		
750 µl del reactivo de TG				1500 µl del reactivo TG		
Conc. Agregada (mg/100g)	Conc. Teórica más basal	Conc. Experimental (mg/100 g)	Recuperación (%)	Conc. Teórica más basal	Conc. Experimental (mg/100g)	Recuperación (%)
0.5	2.7	2.7	100.0	2.6	2.6	100.4
1.0	3.2	3.2	91.0	3.1	3.1	99.7
2.0	4.2	4.1	95.0	4.1	4.1	99.5
3.0	5.2	5.3	100.3	5.1	5.1	100.2
4.0	6.2	6.2	99.8	6.1	6.1	100.2
5.0	7.2	6.8	91.2	7.1	7.2	99.6
6.0	8.2	6.8	75.7	8.1	7.9	97.0
6.5	8.7	6.7	68.2	8.6	8.4	97.8
7.5	9.7	6.7	59.9	9.6	9.2	95.7
8.0	10.2	6.8	56.8	10.1	9.4	92.9
8.5	10.7	6.8	53.2	10.6	9.6	90.0
9.0	11.2	6.8	50.6	11.1	10.0	89.5
9.5	11.7	6.8	48.0	11.6	10.0	85.8
10.0	12.2	6.8	45.7	12.1	10.0	82.4
X (%) 73.9				X (%) 95.1		
D.S 21.57				D.S 5.96		
C.V(%) 29.19				C.V (%) 6.27		

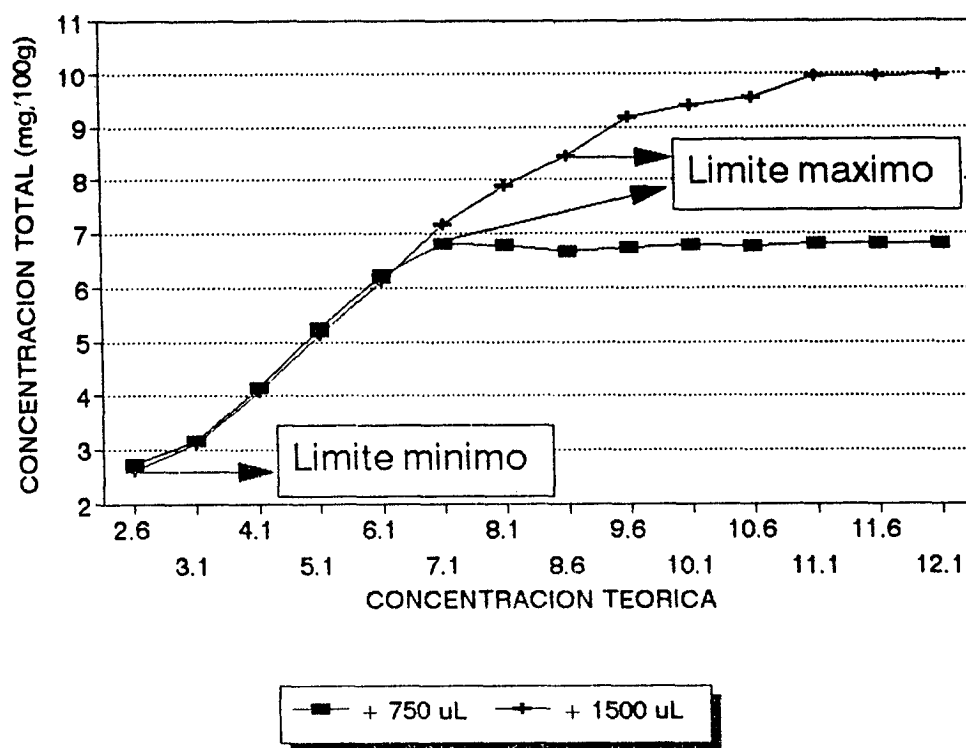
La ecuación de la regresión para el ensayo de recuperación para 750 µl es  $Y = (-6.2864 \pm 0.676342)X + (110.10005 \pm 7.84017)$ ;  $R = 0.94$  y para 1500 µl es  $Y = (-1.59974 \pm 0.270932)X + 104.2514 \pm 3.1406454$ ;  $R = 0.86$  y para el ensayo del rango analítico lineal para 750 µl es  $Y = (0.3983 \pm 0.06432)X + (2.705662 \pm 0.745)$ ;  $R = 0.872$  y para 1500 µl es  $Y = (0.817444 \pm 0.035577)X + (0.900531 \pm 0.412408)$ ;  $R = 0.999$ , donde la ecuación es  $Y = bx + a$ , donde  $a$  es intercepto y  $b$  pendiente.

1: La concentración recuperada se encontró utilizando leche con concentración basal de 2.24 mg/dL.

2: La concentración recuperada se encontró utilizando leche con concentración basal de 2.11 mg/dL.

Grafica 13

Rango analítico lineal



## 9. DISCUSION DE RESULTADOS

Debido a la diferencia de densidades entre las muestras de leche, se prefirió pesar el volumen utilizado en cada método para eliminar el error que se comete al medir únicamente volúmenes, obteniéndose así resultados más exactos.

Al realizar el análisis de correlación lineal y concordancia en parejas de los métodos se observó lo siguiente:

### 9.1 Folch modificado vrs. Babcock modificado y Crematocrito

Los métodos de Babcock modificado y Crematocrito no correlacionaron ni concordaron con el de Folch. La comparación de los dos métodos, mostró que la pendiente no es igual a uno y que tanto Babcock modificado como el Crematocrito sobreestiman el valor de grasa en las muestras. Por lo tanto, ambos métodos son inespecíficos y tienen sesgo significativo con respecto a Folch. Esto probablemente se deba a que estos métodos se basan en elementos que flotan en la superficie de la leche, los que no necesariamente son sólo los lípidos. La degradación enzimática de los triacilglicérols que puede ocurrir durante congelación a temperaturas cercanas a cero hace estos métodos aún menos confiables.

### 9.2 Folch modificado vrs. Enzimático

Se obtuvo con esta comparación de métodos una correlación lineal con una pendiente igual a uno. Esto quiere decir que el método enzimático reproduce los resultados de Folch. Al hacer el análisis de concordancia se observó que el intervalo de confianza al 95% sí incluyó al cero, lo que significa que son métodos comparables.

La concordancia entre ambos métodos, aunque se fundamentan en principios diferentes es atribuible a que el 98% de los lípidos en la leche determinan lípidos totales, mientras que el enzimático sólo los triacilglicérols.

### 9.3 Otras comparaciones

Al comparar los métodos Enzimático versus Babcock modificado, Babcock modificado contra Crematocrito y Enzimático contra Crematocrito ninguna de estas comparaciones presentaron correlación esto pudo deberse a que los dos métodos Babcock y crematocrito son métodos inespecíficos. Por lo que se puede decir que

los métodos Babcock y crematocrito no son confiables para determinar con precisión y exactitud los niveles de grasa en leche humana.

#### 9.4 Validación del método Enzimático

La segunda parte del estudio consistió en validar el método Enzimático ya que fue el que correlacionó con el método de Folch.

En la validación del método Enzimático se trabajaron varios aspectos:

La respuesta de blanco fue cercana a cero, como se muestra en los resultados, lo cual indicó que el espectrofotómetro no detecta ninguna sustancia interferente en las lecturas de las leches, ésto es únicamente en la matriz debido a que el ensayo no se realizó agregando posibles interferentes.

La precisión del método es buena ya que se obtuvo valores menores o cercanos al 5% para la precisión intraensayo como para la precisión interensayo.

Para determinar el rango analítico y el porcentaje de recuperación del método se hizo añadiendo estándares con concentraciones conocidas a una muestra de leche con contenido bajo de grasa. Se observó que cuando se trabajó con 750  $\mu\text{L}$  del reactivo de triglicéridos, la concentración máxima que se podía cuantificar era de 6.2 mg/ 100g; ésto pudo deberse a que no había suficiente cantidad de las sustancias necesarias para reaccionar con la enzima gliceroquinasa, por lo que se pensó que si se agregaba más reactivo se aumentaría el rango analítico. En efecto, así sucedió, al agregarse el doble de la cantidad de reactivo (1500  $\mu\text{L}$ ), el rango analítico lineal aumentó hasta una concentración de 8.4 mg/ 100g.

El límite de detección fue de 0.01 mg/ 100g, con ésto se muestra indirectamente la efectividad del método.

Por los resultados obtenidos se puede decir que el método enzimático es sensible, válido y reproducible. Además posee las ventajas adicionales de ser bastante simple y no utiliza reactivos tóxicos o corrosivos.

## 10. CONCLUSIONES

- 10.1 El método enzimático para la determinación de lípidos, proporciona resultados comparables con el método de Folch cuando se utiliza con muestras de leche humana.
- 10.2 El método enzimático es un método económico, confiable, válido, sensible, preciso y reproducible para determinar lípidos en leche humana. Además, no requiere el uso de solventes tóxicos, lo que reduce el volumen de desechos orgánicos y riesgos para la salud del analista y la población en general.
- 10.3 El método de Babcock modificado y el Crematocrito no correlacionan con el método de Folch modificado; ambos tienen sesgo significativo y sobreestiman el valor de grasa en las muestras de leche.
- 10.4 Se confirma que el método de crematocrito no es confiable para determinar lípidos en muestras de leche almacenada en congelación.
- 10.5 El reactivo de triglicéridos tiene una vida útil de tres días cuando el valor de su absorbancia es mayor o igual a 0.800 nm por lo cual ya no se debe de utilizar.
- 10.6 El método enzimático tiene una sensibilidad de 0.01 mg/ 100g, una variación intraensayo de 2.73%, una variación interensayo de 5.14%, un error analítico total de 3.21%, límite de máximo de cuantificación de 8.4 mg/ 100g cuando se utiliza 1500  $\mu$ L de reactivo de triglicéridos y un porcentaje de recuperación de 95.1%.

## 11. RECOMENDACIONES

- 11.1 Almacenar las muestras de leche a  $-20^{\circ}\text{C}$  o menos, así como también evitar descongelamientos innecesarios para evitar la lipólisis de las grasas.
- 11.2 Se recomienda utilizar el método enzimático para la determinación de lípidos en leche materna como un sustituto más sencillo y seguro que el de Folch.
- 11.3 Descartar el reactivo de triglicéridos al cuarto día de haber sido preparado o cuando las lecturas de las leches sean menor a 0.800 nm.
- 11.4 Aunque en la literatura, según Ferris y Jensen 1984, el crematocrito se puede utilizar en muestras de leche fresca; se recomienda evaluar este método, ya que según el fundamento del mismo no es específico, lo que puede dar resultados erróneos.
- 11.5 Validar la utilidad del método para la determinación de grasa en leche de vaca y de otros animales, ya que de repetirse el caso encontrado con leche humana sería un buen aporte para la industria láctea.



## 12. REFERENCIAS

1. Hamosh M, et al. Handling and storage of human milk specimens for research. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1984; 3 (2):284-289.
2. Boersma E, et al. Vitamin E, lipid fractions and fatty acid composition of colostrum, transitional milk and mature milk: An international comparative study. *Am J Clin Nutr* 1991; 53:1197-1204.
3. Cronenwett L, et al. Single Daily Bottle use in the early weeks postpartum and breast-feeding outcomes. *Pediatrics* 1992; 90(5):760-766.
4. Hunkeler B, et al. Incidence and duration of breast-feeding of ill newborns. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1994; 18 (1):37-40.
5. Jensen G, Jensen R. Specialty lipids for infant nutrition. II. Concerns, New Developments and future applications. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1992; 15(4):382-391.
6. Kallio T, et al. Exclusive Breast-Feeding and Weaning: Effect on serum cholesterol and lipoprotein concentrations in infants during the first year of life. *Pediatr* 1992; 1:663-666.
7. Modanlou H, et al. Growth, biochemical status and mineral metabolism in very-low-birth-weight infants receiving fortified preterm human milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1986; 5 (5):762-767.
8. Silverberg M, Fredric D. *Textbook of Pediatric gastroenterology*, 2nd. ed. USA: Merrell, 1988. 511 p (pp 108-116).
9. Heldenberg D, Tenenbaum G, Weizer S. Breast-Feeding Habits among Jewish and Arab Mothers in Hadera Couty, Israel. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1993; 17(1):86-91.
10. Temborry M, et al. Influence of breast-feeding on the infant's intellectual development. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1994; 18(1): 32-36.
11. Waldo N. *Tratado de Pediatría*, Vol I, 13a. ed. Argentina, Buenos Aires: Editorial Interamericana, Mc Graw Hill, 1989. 1767 p (pp 130-133).
12. Meneguello J. *Pediatría*, Tomo I, 2a. ed. Argentina: Editorial Inter-médica, 1978. 1821 p (pp 166, 169, 210, 233).

13. Jensen RG. *The Lipids of Human Milk*. Florida, Boca Raton: CRC Press, 1989. (pp 20, 30-32, 44-59, 65-67, 73, 75, 77, 81).
14. Subcommittee on Nutrition During Lactation. *Nutrition During Lactation*. Washington D.C.: National Academy Press, 1991. 309 p (pp 113-141).
15. Houssay B. *Fisiología Humana*. 3a. ed. Argentina: Editorial El Ateneo, 1963. 1441 p (pp 896, 899).
16. LaCerva V. *Lactancia Materna*. México, D.F.: Editorial El Manual Moderno, 1983. 177 p (pp 24-26).
17. Ferris A, Jensen R. Lipids in Human Milk: A review: 1 sampling, determination and content. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1984; 3(1): 108-121.
18. Jensen R, Hagerty M, Mahon K. Lipids of Human Milk and Infant formulas: A review. *Am J Clin Nutr* 1978; 31:990-1016.
19. Lavine M, Clark R. Changing Patterns of free fatty acids in breast milk during storage. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1987; 6(5):769-774.
20. Lucas A, et al. Crematocrit: Simple clinical technique for estimating fat concentration and energy value of human milk. *Br Med J* 1978; 1:1018-1020.
21. Zoeren-Grobben D, et al. Lipid peroxidation in human milk and infant formula: Effect of storage, tube feeding and exposure to phototherapy. *Acta Pediatr* 1983; 82:645-649.
22. Spear M, et al. Milks and blood fatty acid composition during two lactations in the same woman. *Am J Clin Nutr* 1992; 56:65-70.
23. Tyson J, et al. Adaptation of feeding to a low fat yield in breast milk. *Pediatr* 1992; 89(2):215-219.
24. Dill CW, et al. Lipolytic Activity during storage of human milk: Accumulation of free fatty acids. *J Food Protec* 1994; 47(9):690-693.
25. Jackson D, et al. Circadian variation in fat concentration of breast-milk in a rural northern Thai population. *Br J Nutr* 1988; 59:349-363.
26. Jensen R, Jensen G. Special Lipids for Infant Nutrition. I. Milks and Formulas. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1992; 15(3):232-245.

27. Picciano M. What Constitutes a representative human milk sample? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1984; 3(2):280-283.
28. Jensen R, Ferris A, Lammi-Keefe C. Lipids in human milk and infant formulas. *Annu Rev Nutr* 1992; 12:417-441.
29. Jensen R, et al. Lipids of bovine and human milks: A comparison. *J Dairy Sci* 1990; 73(2):223-239.
30. Lammi-Keefe C, Jensen R. Lipids in human milk: A review. 2: Composition and fat-soluble vitamins. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1984; 3(2):172-190.
31. Hernell O, et al. Does the bile salt-stimulated lipase of human milk have a role in the use of the milk long-chain polyunsaturate fatty acids? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1993; 16:426-431.
32. Bitman J. Lipid composition of prepartum human mammary secretion and postpartum milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1986; 5:608-615.
33. Garza C, Butte N. Energy concentration of human milk estimated from 24-h pools and various abbreviated sampling schemes. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1986; 5(6):943-948.
34. Tyson J. Simple method for determining the caloric and fat content of human milk. *Pediatr* 1980; 66(4):626-628.
35. Martínez F, et al. Ultrasonic homogenization of expressed human milk to prevent fat loss during tube feeding. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1987; 6(4):593-597.
36. Polberger S, Lonnerdal B. Simple and rapid macronutrient analysis of human milk for individualized fortification: Basis for improved nutritional management of very-low-birth-weight infants? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1993; 17(3):283-290.
37. Hundrieser K, et al. A comparison of methods for determination of total lipids in human milk. *Nutr Research* 1984; 4:21-26.
38. Nommsen L, et al. Determinants of energy, protein, lipid and lactose concentrations in human milk during the first 12 months of lactation: The darling study. *Am J Clin Nutr* 1991; 53:457-465.

39. Martin J, Altman D. Statistical Methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986; 4: 307 - 310.
40. Ott L. *An Introduction to statistical methods and data analysis*, 3th. ed. Boston: Merrell Dow Research Institute, PWS-Kent Publishing Company, 1988. 835 p ( A-26 ).

13. ANEXOS

ANEXO 1

Composición de la leche materna madura

COMPONENTE	CONCENTRACION
Agua	88 g/100g
Proteínas:	(g/100 g)
Caseína	0.9
Lactalbúmina	0.4
Lactoglobulina	0.2
Grasas	3.8 g/100 g
% ácidos grasos insaturados	8.0
Lactosa	7.0 g/100 g
Aminoácidos:	(mg/100 mL)
Histidina	22
Leucina	68
Isoleucina	100
Lisina	73
Metionina	25
Fenilalanina	48
Treonina	50
Triptófano	18
Valina	70
Arginina	45
Alanina	35
Acido aspártico	116
Cistina	22
Acido glutámico	230
Prolina	80
Serina	69
Tirosina	61
Vitaminas	(UI, mg, µg/L)
Vitamina A	570 µg
Tiamina	160 µg
Riboflavina	350 µg
Niacina	1470 µg
Piridoxina	100 µg
Pantotenato	2 mg
Folacina	52 µg
Vitamina B12	0.3 µg
Vitamina C	43 mg
Vitamina D	22 UI
Vitamina E	2 mg
Vitamina K	15 mg

(12).

## ANEXO 2

### Métodos

#### 2.1 Método de Folch modificado

$$[\text{grasa}] (\text{mg}/100\text{g}) = \frac{(\text{Peso}_{\text{final}} - \text{Peso}_{\text{inicial}}) \times 100}{\text{Peso de leche pipeteada}}$$

#### 2.2 Método de Babcock modificado para cuantificación de lípidos.

$$[\text{grasa}] (\text{mg}/100\text{g}) = \frac{\text{lectura directa} \times 0.219}{\text{Peso de 8 mL de leche}} \times 100$$

**NOTA:** 0.219 es la constante obtenida midiendo la cantidad de leche en los 8 cm del cuello de la botella de Babcock que resultó ser 1.75 cc por lo que se dividió 1.75 cc/ 8 cc obteniendo así el resultado. La lectura con el compás o vernier debe efectuarse del menisco inferior al superior.

#### 2.3 Método Enzimático

$$\text{TG} (\text{mg}/100\text{g}) = \frac{\text{Abs} \times 2.71}{\text{peso de 250 \mu L de leche}} \times 100$$

#### 2.4 Método crematocrito

$$[\text{grasa}] (\%) = \frac{\text{Porción grasa en el capilar}}{\text{total de leche en el capilar}} \times 100$$

ANEXO 3

Fórmulas estadísticas

-Cálculo de tamaño de muestra para comparar métodos:

$$n_1 = \frac{2NC^2 \times \text{Varianza}^2}{\Delta^2}$$

Donde:

NC = 3.662 (En base a los niveles de significancia  $\alpha=0.05$  y  $\beta=0.10$ ) (40).  
Varianza = Delta

Donde:

$$n_1 = 2 NC^2$$

Por lo que:

$$n_1 = 2 (3.66)^2 = 27 \text{ muestras por método}$$

Hipótesis a probar:

Ho: M1 = M2 = M3



#### Anexo 4

#### Validación y caracterización de métodos analíticos

##### 4.1 Respuesta del blanco:

$$\bar{y} = \frac{\sum xy_i}{n}$$

$$D.S. = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n-1}}$$

El límite de confianza al 95% (L.C. <sub>95%</sub>) es:

$$L.C._{95\%} = \frac{t_{95\%} \theta}{\sqrt{n}}$$

en donde  $t_{95\%}$  es el valor de la distribución t de Student, con  $n-1$  grados de libertad, para dos colas  $\alpha=0.025$ ); la desviación estándar; y  $n$  el número de réplicas.

El intervalo de confianza para la respuesta es un intervalo centrado en la respuesta media:

$$I.C._{95\%} = [\overline{Resp.} - LC_{95\%}; \overline{Resp.} + LC_{95\%}]$$

##### 4.2 Recuperación:

$$RECUPERACION = \frac{Conc. obtenida}{Conc. esperada} * 100 = \frac{Cant. obtenida}{Cant. basal + Cant. añadida} * 100$$

4.3 Error Analítico:

$$\Sigma_s = \frac{1}{2} \sqrt{CV_{Inters} + CV_{Intere}}$$

4.4 Ecuación de la línea Recta:

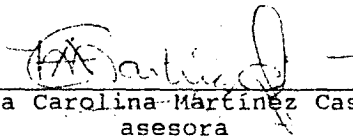
$$y = a + \lambda x$$

$$a = \bar{y} - \lambda \bar{x}$$

$$b = \frac{N \Sigma x_1 y_1 - \Sigma x_1 \Sigma y_1}{N \Sigma x_1^2 - (\Sigma x_1)^2}$$



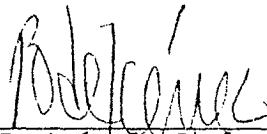
Karla Marlova Micheo Almengor  
autora



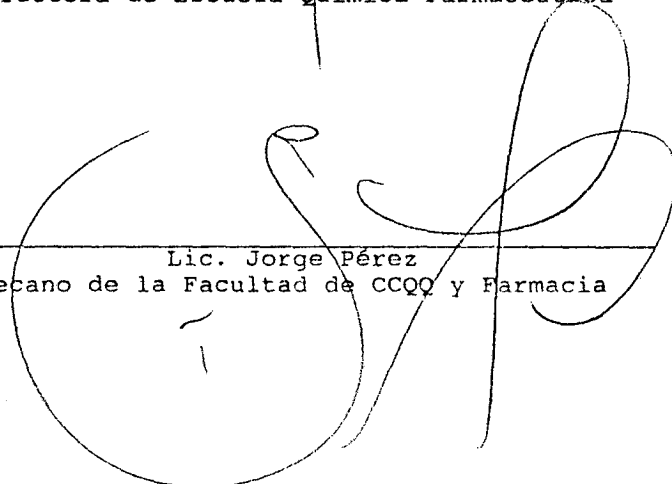
Licda. Ana Carolina Martínez Castellanos  
asesora



Dr. Omar Dary Mansilla  
asesor



Licda. Beatriz de Jiménez  
Directora de Escuela Química Farmaceutica



Lic. Jorge Pérez  
Decano de la Facultad de CCQQ y Farmacia