

Tesis de Posgrado

Valoración de lípidos en la heces

Petazze, María Luisa Ana

1943

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Química de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Petazze, María Luisa Ana. (1943). Valoración de lípidos en la heces. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0351_Petazze.pdf

Cita tipo Chicago:

Petazze, María Luisa Ana. "Valoración de lípidos en la heces". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1943.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0351_Petazze.pdf

Buenos Aires, Diciembre 12/1943

Excellencia en la fecho. Excmo.

El Espiritu



Buenos Aires, Diciembre 12/1943

Pase a la Comisión examinadora Grupo 24, la presente tesis de la exalumna Maria E. A. Petagge a los efectos del Art. 349 del Decreto.

[Handwritten signature]

RAFAEL VALLA
INTERVENTOR DELEGADO

Tesis: 351

[Handwritten signature]
PEDRO CARLOS ARBERICH
SECRETARIO

Buenos Aires, Diciembre 22/1943

Los miembros de la Comisión examinadora respectiva que firman, han considerado la presente tesis y la han aceptada.

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.

VALORACION DE LIPIDOS EN LAS HECES.

Tesis

para optar al título de Doctora en Química

MARIA LUISA ANA PETAZZE.

1943.

Dejo expresa constancia de mi profundo reconocimiento al Prof.Dr.Pedro Escudero, Director General del Instituto Nacional de la Nutrición, por todas las facilidades que me ha concedido para la realización del presente trabajo, efectuado en el Laboratorio de Química Biológica de dicha institución.

Agradezco también sinceramente al Prof.Dr.Ventura Morera las atenciones que me dispensara.

En forma muy especial, agradezco al Jefe del Laboratorio Dr.Gregorio Waisman, quien me sugiriera el tema, dándome en todo momento ayuda y aliento; brindándome su experiencia y conocimientos para la feliz terminación de este estudio.-

La autora.

Capítulo I

INTRODUCCION

El hombre ingiere diariamente con los alimentos, ya sean de origen vegetal o animal, una cierta proporción de lípidos, formados por grasas neutras, ácidos grasos libres y sustancias de constitución variada, solubles en los mismos disolventes.

La composición media de las grasas vegetales, líquidas a temperatura ambiente es de : 97 % de triglicéridos, 1-3 % de sustancias insaponificables y hasta 0,3 % de ácidos grasos libres. En las grasas animales la composición es muy variable y depende en gran parte de su origen, siendo en todas ellas más elevada la cantidad de sustancias insaponificables, que en el caso particular del aceite de hígado de tiburón puede variar entre 10 y 90 %.

Hasta el presente se han determinado 42 ácidos grasos distintos en los lípidos naturales, pero los que se encuentran comunmente son: palmítico, esteárico y mirístico, entre los saturados y oleico y erúxico, entre los no saturados.

Digestion y absorción de las grasas.

Durante el proceso de la digestión estas sustancias son atacadas por una enzima especial, la lipasa, que se encuentra en todos los órganos del tubo digestivo. La saliva contiene una lipasa capaz de hidrolizar únicamente la tributirina de la leche, produciendo ácido butírico; su acción podría explicar el olor a este ácido de los vómitos de los lactantes, inmediatamente después de la ingestión de leche. En el estómago también se encuentra en pequeña cantidad y, según Laqueur y Davidson (31) al estado de profermento, siendo destruida por los ácidos diluidos. La acidez estomacal le impide actuar sobre las grasas, a menos que estén presentes sustancias de carácter básico que disminuyan la acidez hasta un valor que no inhiba su acción. Sólo puede descomponer grasas que se presenten finamente emulsionadas como las de la leche o las de la yema de huevo; de ahí la importancia que tiene durante la lactancia. En condiciones normales es posible que su papel sea el de iniciar

la formación de ácidos grasos que actuarían como agentes emulsionantes en el intestino delgado; pero pueden actuar en el mismo sentido los ácidos grasos libres contenidos en las grasas naturales, o formados a expensas de los triglicéridos por acción del calor al someter los alimentos a la cocción.

La verdadera digestión de los lípidos se efectúa en el intestino delgado; como lo estableció Pflüger en 1900. Las grasas neutras emulsionadas sufren la hidrólisis por acción de la lipasa pancreática y se transforman en ácidos grasos y glicerina; los ácidos grasos libres así obtenidos, junto a los preexistentes, se combinan con las sales alcalinas del jugo pancreático formando jabones y, tanto la glicerina como los jabones sódicos, por su solubilidad en agua, son capaces de atravesar el epitelio de la mucosa intestinal, siendo en esta forma absorbidos.

Las mediciones del pH del contenido intestinal realizadas por Verzár y Kostyal (33) en 1926, y Robinson en 1935, dan valores comprendidos entre 6,2 y 8,0. Según estudios efectuados por Jarisch en 1922 (33), los jabones sódicos: estearato, oleato y palmitato, son estables solamente por encima de pH 9. De modo que la absorción de los lípidos no puede realizarse por medio de los jabones, ya que en el contenido intestinal los ácidos grasos se encuentran libres. El papel de los jabones sería únicamente el de agente emulsionante.

Es un hecho conocido la necesidad de bilis para que se realice la absorción de las grasas; pero su acción principal no es, como se creía, la de emulsionar dichas grasas o activar la acción de la lipasa, si nó, como lo demostró Verzár, (33) la de disolver los ácidos grasos formando con los ácidos biliares combinaciones complejas, solubles en agua, fácilmente difusibles y estables en el intervalo del pH intestinal. Estos complejos, después de atravesar la pared epitelial, se descomponen; los ácidos grasos resintetizan las grasas neutras, y los ácidos biliares quedan en libertad, volviendo al intestino, donde pueden combinarse con otras porciones de ácidos grasos.

En la mucosa intestinal tiene lugar la resíntesis de las grasas neu-

tras, con intervención de dos factores: la hormona de la corteza adrenal y el ácido fosfórico, que formarían un compuesto fosforilado intermedio. Sinclair (6) en 1929, demostró que en la mucosa intestinal se forma lecitina, sustancia que sería un producto intermedio en la resíntesis de las grasas. Según trabajos del mismo autor, sólo el 60 % de las grasas ingeridas aparecen en la linfa y pasan al sistema venoso a través del conducto torácico. Estudios posteriores demostraron la posibilidad de la existencia de otra vía de absorción además de la corrientemente aceptada, que explicaría el destino del 40 % restante. A este respecto, Frazer (8) sugiere que las grasas ingeridas se absorben en parte después de sufrir la hidrólisis, pasando por los capilares y por la vena porta al hígado, donde se aprovechan energéticamente. La otra parte, no hidrolizada, pasa directamente por el sistema quilífero central a los depósitos de grasas donde queda como reserva para usarse en el futuro.

Desde el punto de vista de la absorción de las grasas, no interesa su naturaleza sino su punto de fusión. Normalmente las grasas que se encuentran al estado líquido a la temperatura del animal son bien absorbidas, mientras que las de punto de fusión elevado a veces se eliminan sin sufrir transformaciones, o se absorben en muy pequeña cantidad. A este respecto pueden citarse las experiencias de Arnschink (12), quien halló que alimentando perros con sebo de carnero - triestearina - sólo absorbían el 10 %, pero era suficiente la adición de una parte de aceite de olivas a la dieta, para que la absorción fuera total.

Levites (12) estudió el grado de absorción de diversos ácidos grasos administrados en forma libre o combinados como jabones sódicos, encontrando que decrece en el orden: oleico, palmítico y esteárico; manteniéndose la misma relación para sus sales.

Excreción de los lípidos.

La eliminación de las grasas por las heces no puede considerarse únicamente como un residuo de las grasas ingeridas. Shapiro, Koster, Rittenberg y Schönheimer (21) estudiaron la composición de los ácidos grasos eliminados por materias fecales, en sujetos sometidos a dietas con áci-

dos grasos conocidos, observando un aumento en la excreción, que atribuyeron a secreción intestinal. Krakower (15) determinó el número de iodo de las grasas de la dieta y las eliminadas por fecales, no encontrando relación entre ellas. Peretti (18) determinó el número de iodo de los lípidos excretados por fecales y halló eliminación parcial de la grasa ingerida.

Cuando se somete a dietas ricas en grasa a sujetos normales, existe evidentemente un aumento de la excreción, pero si se suprimen, hay una eliminación que es aproximadamente de 2 gs. diarios. En el ayuno también se excretan aunque en menor cantidad que en la dieta sin grasas, y, en este caso, hay similitud entre la composición de los lípidos sanguíneos y los de las heces (Bloor). La diferencia mayor está en que los ácidos grasos de la sangre son de carácter menos saturado que los de las materias fecales, lo que se explicaría por la acción reductora del intestino. Parece que existiera una verdadera filtración de los lípidos del plasma hacia el intestino, que podría explicar el aumento de la excreción cuando la dieta es muy rica en sustancias grasas.

Lo más probable es que exista una eliminación basal de lípidos, representada por la excreción obtenida con dietas sin grasas y que aumenta, en una pequeña cantidad, por los lípidos que no son absorbidos o son absorbidos y reexcretados en los regímenes habituales.

Sperry (23-29) estudió las diversas fuentes que podrían ser el origen de los lípidos excretados por las heces, en animales sometidos a una dieta libre de grasas. Encuentra que, en ausencia de bilis, la cantidad de grasas eliminadas es igual o mayor que en los casos normales. Esto se explicaría, suponiendo que existe una secreción intestinal que normalmente es reabsorbida, y que en ausencia de bilis no puede serlo; pero también podría ser producida por la acción de bacterias intestinales o por descamación del epitelio. La acción bacteriana no puede considerarse importante, pues de los trabajos de Sperry se deduce que los lípidos bacterianos forman una pequeña parte de los lípidos fecales y se sabe que el meconio estéril contiene gran cantidad de grasas. Además, Kovert y Koch (23), han obtenido lípidos de un trozo de intestino grueso esteri-

rilizado con sustancias asépticas.

Hasta el presente no se ha podido establecer qué porción de los lípidos excretados son segregados por el intestino y cual otra tiene origen celular; pero no puede descartarse la posibilidad de que representen una secreción intestinal total o parcialmente adsorbida por las partículas sólidas de las heces.

La reabsorción de los lípidos segregados en el intestino delgado normalmente tiene lugar en el mismo, pero existe también absorción en el colon, como lo prueban los trabajos de Sperry, Schönheimer, von Behring y otros.

Según el grado de digestión sufrido, los lípidos se encuentran en las heces en forma de grasas neutras, ácidos grasos libres o combinados - como jabones alcalinos y alcalino-terreos - y , además, formando la fracción insaponificable, constituida por sustancias etero-solubles, como ser esteroides y sus derivados, y sustancias no grasas, como ácido coláico, vitaminas y pigmentos.

El estudio de las grasas de las heces responde a dos fines distintos: digestión y absorción. Para establecer el grado de absorción Labbé y Larue determinaron el "coeficiente de absorción" denominado por Gouffón (9) "coeficiente de utilización intestinal", y que es la relación: entre las:

$$\frac{\text{Grasas eliminadas}}{\text{Grasas ingeridas}} \times 100.$$

Cuando este coeficiente es menor del 80 %, la utilización intestinal está disminuida y es necesario estudiar la composición de las grasas eliminadas. Para ello se debe establecer un régimen determinado, pues con una alimentación irregular existen considerables diferencias en la excreción de lípidos, variando de una persona a otra, y también en una misma de un día a otro. Fowweather (4), por eso, aconseja utilizar los resultados obtenidos en un análisis cuando éstos se repiten en varias determinaciones.

Este mismo investigador estableció los siguientes valores límites, refiriendo los resultados a 100 gs. de heces secas y no al peso total de las materias fecales excretadas:

1°. Cuando la grasa total es mayor del 25 %, la absorción es anormal.

2°. Cuando la grasa neutra es mayor del 11 %, la digestión es anormal.

3°. Cuando los ácidos libres y combinados sobrepasan el 16 %, es insuficiente la absorción.

Según Goiffón (9), no son suficientes estos resultados, sino que es necesario compararlos con la cantidad correspondiente de grasa ingerida. Establece así :

1°: Coeficiente de desdoblamiento = $\frac{\text{grasa neutra eliminada}}{\text{grasa neutra ingerida}} \times 100.$

2°: Coeficiente de absorción : $\frac{\text{ácidos grasos eliminados}}{\text{grasas neutras ingeridas}} \times 100.$

Resumiendo, para Goiffón es necesario determinar:

1°: Coeficiente de utilización intestinal.

2°: Coeficiente de desdoblamiento.

3°: Coeficiente de absorción.

El primero mide el aprovechamiento de los lípidos, el segundo indica la actividad de la lipasa, y el tercero la capacidad de absorción por la mucosa intestinal. El descenso del primer coeficiente denota un trastorno de las funciones biliares, pancreáticas o de absorción de las mucosas intestinales; el del segundo, es índice de déficit pancreático, y el del tercero indica insuficiencia biliar o incapacidad de absorción.

Creemos que esta serie de coeficientes pueden reducirse a:

1°: Índice de absorción : $\frac{\text{lípidos totales excretados}}{\text{lípidos totales ingeridos}} \times 100.$

2°: Índice de digestión: $\frac{\text{ácidos grasos libres y combinados}}{\text{lípidos totales excretados}} \times 100.$

En los casos de excesiva motilidad intestinal, los lípidos, junto con el resto de los alimentos, no tienen tiempo suficiente para ser digeridos, y la absorción es incompleta apareciendo, por tanto, en las heces, grasas neutras en gran cantidad.

En la insuficiencia biliar las grasas son digeridas, pero su absorción está dificultada por la ausencia de ácidos biliares, eliminándose gran cantidad de ácidos grasos libres y combinados como jabones, aumentando también, en consecuencia, los lípidos totales excretados.

Un ejemplo típico de insuficiencia biliar, producida por una fístula que impedía la llegada de bilis al intestino, es el siguiente:

Enfermo: A. de S. ficha: 48270

Valoración de Lípidos fecales.

Promedio diario de materias fecales : 180 gs.

Resultados obtenidos en gs.	%	total
Lípidos totales	17,032	30,660
Acidos grasos libres	4,118	7,412
Acidos grasos de jabones	12,034	21,661
Sustancias saponificables	0,284	0,511
Sustancias insaponificables	0,596	1,073

Para establecer los índices anteriores, debe tenerse en cuenta:

lípidos totales excretados por día : 30,660 gs.

ácidos grasos libres y combinados

excretados por día : 29,073 gs.

lípidos totales ingeridos por día : 54,860 gs.

con lo que se obtiene:

índice de absorción : 55,0 %

índice de digestión : 94,8 %

En la insuficiencia pancreática existe un aumento de los lípidos totales excretados y de las sustancias saponificables, por ser menor la cantidad de lipasas.

En la esteatorrea idiopática, que comprende el sprue tropical y no tropical de los adultos, y la enfermedad celíaca de los niños, hay lesiones inflamatorias y degenerativas del intestino delgado, que conducen a trastornos de la absorción, aunque según Andersen puede haber casos con funcionamiento anormal del páncreas.

Se observan también trastornos de la digestión de las grasas en alteraciones graves del intestino, como las producidas por tuberculosis mesentérica, enfermedad de Basedow y otras.

Rosell (19) dá las siguientes cifras de eliminación de grasas por fecales en relación a las grasas ingeridas:

individuos normales	5,5 %
diarreas de origen gástrico	6,9 %
dispepsia intestinal ácida de fermentación	11,4 %
trastornos por absorción, tabes mesentérica	17,1 %
aquilia pancreática funcional	19,0 %
obliteración del colédoco	25,9 %
acolias absolutas no complicadas	25,0 a 45,0 %
trastornos pancreáticos	25,0 a 83,0 %

Este mismo autor considera que la evaluación de las distintas fracciones de los lípidos fecales no tiene mas importancia para el diagnóstico de las afecciones biliares o pancreáticas que el análisis microscópico, debido a las oscilaciones considerables de los valores obtenidos. Sin embargo, es la única forma que permite verificar con precisión el grado de digestión y absorción de las grasas ingeridas.

Como se verá mas adelante, la determinación exacta de las distintas fracciones lipídicas depende de la técnica empleada, ya que, con algunos métodos se alteran los valores correspondientes a los ácidos grasos, grasas neutras y jabones, lo que conduce a resultados erróneos, careciendo de valor, por consiguiente, los coeficientes que en base a ellos se determinen.

Capítulo II

DESCRIPCION DE LOS DISTINTOS METODOS

En las heces los lípidos se encuentran en la siguiente forma:

- a) sustancias saponificables, constituidas por todas aquellas que calentadas en medio alcalino son capaces de formar jabones;
- b) ácidos grasos libres, considerando como tales a todos los de peso molecular elevado;
- c) ácidos grasos combinados, en forma de jabones alcalinos y alcalino-térricos, que estrictamente no son lípidos pero están estrechamente relacionados con ellos;
- d) sustancias insaponificables, formadas por un grupo de sustancias solubles en éter y de composición variada, entre las que se encuentran: esteroides, ácido colálico, pigmentos, vitaminas liposolubles etc. Según Mathews (16), el 80 % de los esteroides eliminados por las heces se encuentra formado por coprosterol, pero existe también beta-colestanol y colesterol no modificado.

Para realizar la determinación de estas fracciones se han propuesto dos tipos de métodos: a) los que efectúan la extracción directamente sobre las heces (extracción húmeda); b) los que previamente las someten a una desecación (extracción seca).

Métodos de extracción húmeda.

Todos los métodos actuales de extracción húmeda son modificaciones a la técnica de Saxon (20) propuesta en 1914. Las principales entre dichas modificaciones son las realizadas por Fowweather (7), quien determina por separado los lípidos totales, grasas neutras y jabones. La técnica es la siguiente: pesa dos porciones de 2 gs. de heces homogeneizadas y las coloca en dos probetas con tapa. A una, agrega 3 ml. de HCl conc. y 27 ml. de agua; a la otra, solo 30 ml. de agua. A cada probeta agrega 20 ml. de éter etílico, agita vigorosamente durante cinco minutos, deja en reposo unos minutos, agrega 20 ml. de alcohol en la probeta que no contiene ácido y

17 ml. en la otra. Mezcla por medio de un movimiento de rotación viva, enfría temperatura ambiente, agita durante cinco minutos, y deja en reposo para separar la capa eterea que extrae por medio de un sifón, tanto como sea posible. Repite la extracción con 20 ml. de éter y pasa todos los líquidos etéreos al extractor de Myers y Wardell. Evapora los extractos y lavados hasta sequedad; los purifica con éter de petróleo y evapora este disolvente secando el residuo hasta peso constante. El residuo de la mezcla acidulada corresponde a los lípidos totales, y el del extracto no acidulado a los ácidos grasos libres y grasas neutras. En este segundo extracto determina los ácidos libres, disolviéndolo en 50 ml. de benceno caliente y titulando con alcoholato de sodio 0,1 N en presencia de fenolftaleína. Expresa las grasas neutras por diferencia. Los jabones los deduce por las diferencia entre los residuos de los extractos con y sin ácidos.

El método de Holt-Courtney y Fales (13) se diferencia del anterior por que realiza una desecación previa del material en estufa, agregando alcohol para terminar el secado. Usa como disolvente una mezcla de éter etílico y éter de petróleo, y realiza la extracción en tubos de Röerig. Los resultados los expresa en la misma forma.

Ambos métodos presentan el inconveniente de formar emulsiones difíciles de romper y hacer la determinación de grasas y jabones en dos fracciones distintas. Con el fin de eliminar estas dificultades, Tidwell y Holt (30) propusieron la siguiente modificación :

Mantienen las muestras recolectadas cubiertas con alcohol al 50 % y luego las desecan a temperatura ambiente; las pulverizan y conservan en un desecador hasta el momento en que se efectúa el análisis, que siempre realizan antes de haber transcurrido 15 días. Pesan 1,5 a 2 gs del polvo y lo pasan a un tubo de extracción de 50 ml. de capacidad, provisto de un tapón de corcho. Le agregan 5 ml. de alcohol al 50 % y calientan en baño de maría casi hasta ebullición. Enfrian y extraen con una mezcla de partes iguales de éter etílico y éter de petróleo, agitando durante 1 minuto. Centrifugan inmediatamente despues para romper cualquier emulsion, y el líquido sobrenadante, que debe ser límpido, lo seperan y pasan a un frasco

especial. Repiten tres extracciones, filtrando si es necesario, los extractos étereos. Evaporan el éter y secan al vacío. El peso del residuo representa los ácidos grasos libres, grasas neutras y sustancias insaponificables. Disuelven el residuo en alcohol al 99 % y titulan los ácidos libres con solución acuosa de Na.OH 0,1 N en caliente. La diferencia entre el peso del extracto y el valor correspondiente a los ácidos grasos libres representa las grasas neutras y sustancias insaponificables. Para determinar estas fracciones se agrega a la solución alcohólica neutralizada unos ml. de solución acuosa saturada de KOH, y se calienta en baño de vapor regulando la temperatura para que la evaporación del alcohol tenga lugar en 35-40 minutos. Del residuo extrae la fracción insaponificable con éter etílico y la determina gravimétricamente. Los jabones se determinan en el residuo de la primer extracción, agregando HCl conc. y unos ml. de agua destilada; se calienta ligeramente, se enfría y extraen los ácidos liberados con la mezcla éter etílico-éter de petróleo. Del extracto evaporado se deduce la cantidad de ácidos grasos de los jabones; y los lípidos totales se obtienen sumando los valores encontrados para las diversas fracciones.

Otro método de extracción húmeda es el de Guassano (11), que emplea directamente éter de petróleo sobre dos fracciones de heces, una acidulada, cuyo extracto representa las grasas totales, y otra no acidulada, que corresponde a los ácidos grasos libres y grasas neutras. En esta segunda fracción titula los ácidos libres y por diferencia obtiene las grasas neutras.

Alloidi y Palomba (2) han propuesto un método de extracción de grasas tratando las heces con agua a 60° c, durante dos horas y agregando luego éter etílico. En la capa etérea separan las grasas neutras, ácidos grasos libres y sustancias insaponificables y en la acuosa, los jabones. Estos mismos autores consideran que es un método muy inexacto, no por que sea incompleta la extracción, si no porque el agua provoca la hidrólisis de parte de los jabones y aún de las grasas neutras.

Comentarios.

Gephart y Csonka (22) establecieron en 1914 los principales inconvenientes que presentaban los métodos de extracción húmeda de lípidos fecales, conocidos hasta esa fecha. Las principales objeciones son:

- 1°- el material debe estar perfectamente seco y pulverizado antes de la extracción, pues si contiene agua al evaporar el disolvente, aparecen en el extracto sustancias solubles no grasas.
- 2°- las heces contienen ácidos grasos en gran parte combinados en forma de jabones, insolubles en los disolventes de los lípidos.
- 3°- los disolventes usados extraen, junto con las grasas, otras sustancias: colesterol, pigmentos, vitaminas, etc. que pueden llegar a constituir hasta el 50 % del extracto total.
- 4°- no hay contacto íntimo entre el material y el disolvente.

Saxon (20) al proponer en ese mismo año su método, tuvo en cuenta todas esas objeciones, y las salva de la siguiente forma: la primera, purificando el extracto etéreo con éter de petróleo; la segunda, agregando HCl para descomponer los jabones; la tercera, sometiendo a los pacientes, antes de efectuar la determinación, a una dieta uniforme que mantiene constante el error debido a las sustancias no grasas; y la cuarta, por medio de una vigorosa agitación.

No obstante resolver todas estas dificultades, tanto el método de Saxon como sus modificaciones, no evitan la formación de emulsiones sumamente estables, que resultan muy difíciles de romper, y ni aún recurriendo a la centrifugación, como recomiendan Tidwell-Holt, se consiguen líquidos perfectamente limpios.

Por otra parte, siempre queda una pequeña porción de la capa etérea sin separar de la acuosa, lo que obliga a repetir los lavados, con el consiguiente consumo de disolvente. Además, es necesario trabajar sobre una cantidad de material no mayor de 2 gs, con lo que se elevan los errores en forma notable al expresar los resultados por ciento. De todos los métodos de extracción húmeda, el más conveniente es el de Tidwell-Holt, puesto que reduce al mínimo las dificultades señaladas, trabaja sobre una sola muestra y valora separadamente todas las fracciones lipídicas.

Pero es necesario recordar que la extracción no se hace directamente sobre el material, si no que se lo somete a una desecación previa, a temperatura ambiente y en presencia de alcohol.

El método de Fowweather es prácticamente irrealizable por las emulsiones que se forman, e incompleto por no determinar la fracción insaponificable. El de Holt, Courtney y Fales a pesar de hacer la extracción sobre el material húmedo, desecan previamente las heces en estufa, con lo que suma a los errores antes citados los producidos por acción del calor.

El método de Alloidi y Palomba es sumamente inexacto por las razones expuestas por sus mismos autores, y tampoco determina todas las fracciones grasas. El de Guassano tiene los mismos defectos y; además, trabaja sobre dos muestras.

Métodos de extracción sobre material seco.

Estos métodos fueron los primeros propuestos para la extracción de lípidos fecales y, en esencia, consisten en mezclar una cantidad conocida de heces bien homogeneizadas con arena fina, previamente lavada y calcinada con el fin de aumentar la superficie de contacto, y someterlas a la acción del calor en estufa, baño de maría o de vapor. La duración de esta operación es variable según la temperatura a que se realice. Así, Labbé (9) somete una cantidad de 50-100 gs de heces a calentamiento en baño de maría durante 18-20 horas y, finalmente, completa la desecación manteniéndolas en estufa a 105°C. Sobre el residuo, que queda reducido a 3-5 gs, efectúa la extracción en un Soxhlet modificado, utilizando éter como disolvente durante 1½ horas, y suspende la operación ½ hora después de comprobar que el éter sale del filtro del extractor incoloro. Por evaporación del extracto etéreo halla el peso correspondiente al extracto total. Disuelve y titula los ácidos grasos libres; saponifica las grasas neutras con un exceso de solución alcoholica de KOH, calentando a ebullición durante 10 minutos. Por diferencia entre los valores correspondientes al extracto total y la suma de ácidos grasos libres y grasas neutras, determina la fracción de sustancias insaponificables. Al residuo de la extracción

etérea lo mezcla con arena, agrega HCl diluido 1/3, y calienta de 15 a 30 minutos a 100-105°C. Extrae con éter etílico los ácidos grasos correspondientes a los jabones, y determina su cantidad gravimétricamente. Aconseja como control, disolver el residuo y titular la acidez, encontrando a veces, diferencias considerables.

Rousselet Gaultier (9) tritura 30 gs de heces con arena y las deseca calentando en estufa a 100°C. Sobre el polvo seco hace la extracción con éter anhidro, en un Soxhlet. Evapora el éter y por pesada del residuo halla el valor de las grasas neutras y ácidos grasos libres. Titula los ácidos y por diferencia obtiene las grasas neutras. El residuo del Soxhlet, acidulado con alcohol clorhídrico al 5 %, se deseca a 100°C; se extrae nuevamente con éter y en la solución se titulan los ácidos grasos de los jabones.

Roger (2) hace la desecación de las heces calentandolas en una estufa; extrae con éter el polvo seco, solubilizando los ácidos grasos libres y grasas neutras; a continuación agrega agua, disuelve los jabones alcalinos. ^{que} El residuo de este tratamiento contiene los jabones alcalino-terreos, le agrega HCl al 2 % y calienta; extrayendo con éter los ácidos grasos liberados, que determina por gravimetría. De la solución acuosa precipita los jabones alcalinos con solución de cloruro de bario, separa los jabones de bario, lava y seca; calculando de su peso los jabones sólidos presentes. La solución etérea, que contiene los ácidos grasos libres y las grasas neutras, la trata con solución acuosa de carbonato de sodio y 1/5 de su volumen de alcohol, transformando los ácidos grasos en jabones de sodio, solubles en agua. Separa la capa acuosa y la acidula con HCl, con lo que quedan libres los ácidos grasos, insolubles, que separe por filtración, seca y pesa. En el éter quedan disueltas las grasas neutras, que saponifica calentando con etilato de sodio; los jabones formados se precipitan como jabones de bario y determinan gravimétricamente.

R.P.Cook (5) hace la desecación de las heces calentandolas a 70°C hasta peso constante. Extrae con éter etílico los lípidos, por medio de un Soxhlet durante 72 horas, y observa que en esas condiciones la extrac-

ción es mas completa que con éter de petróleo. La saponificación la efectúa calentando por los menos durante 5 horas con solución alcohólica de KOH al 10 %.

Alloidi y Palomba (2), para evitar las descomposiciones que se producen por el calor aconsejan desecar a temperatura inferior a 60°C, aún cuando reconocen que la mejor forma de efectuarla es al vacío, en un desecador con cloruro de calcio anhidro o ácido sulfúrico concentrado, pero con el inconveniente de tardar mas tiempo. Para la extracción utilizan alcohol absoluto, que tiene mayor capacidad de disolución de lípidos que los disolventes comunes. Expresa todos los lípidos como ácidos grasos, excepto la fracción insaponificable. La técnica es la siguiente: mezclan 2-5 gs de heces desecadas a 45-50°C con 25 ml. de alcohol absoluto y lo mantienen durante 15 minutos en un baño de maría a 60-70°C. Separan el extracto alcohólico y repiten tres veces el tratamiento, lavado con éter el residuo en caliente. Mezclan el extracto etéreo con los alcohólicos y evaporan a sequedad. Disuelven el residuo en 50 ml. de éter, filtrando previamente por amianto. Sobre 10 ml. de la solución etérea titulan los ácidos grasos libres, expresándolos en ácido butírico. Los 40 ml. restantes, colocados en un embudo de decantación, se alcalinizan con NaOH N y acidulan con HCl N. En la capa etérea quedan los ácidos grasos, grasas neutras y sustancias insaponificables. Evaporan el éter, disuelven con éter de petróleo y finalmente se evapora y seca hasta peso constante. Determinan los jabones en el residuo de la primera extracción, haciendo un tratamiento con 25-30 ml de alcohol clorhídrico y calentando 1 hora a ebullición. Decantan el alcohol y repiten el calentamiento $\frac{1}{2}$ hora más con otra porción de disolvente y por último con éter. Pasan los extractos a un embudo de decantación, alcalinizan con NaOH y acidulan con HCl; separan la capa etérea, que contiene los ácidos grasos de los jabones, que determinan por pesada, despues de purificarlos con éter de petróleo.

Existen, ademas, métodos como los de Shapiro, Koster, Rittenberg y Schönheimer (21), que desecan las heces con un deshidratante, el sulfato de sodio anhidro.

Comentarios.

La valoración de lípidos fecales por los métodos de extracción seca son, comparados con los de extracción húmeda, de realización más sencilla pero de mayor duración, debido al período necesario para efectuar el secado. Esta operación, cuando se realiza a temperatura mas o menos elevada, produce la hidrólisis de las grasas neutras y descomposición de los jabones por efecto del calor y la presencia de agua y ácidos libres de las heces, como hizo notar van Oefele (19). Estas transformaciones son inevitables en el antiguo método de Labbé, que somete al calentamiento en b.de m. durante 18-20 horas y luego completa el secado durante 1-2 horas en estufa a 105°C. Esta última temperatura es la empleada por Gaultier y Roger para obtener la desecación de las heces. Cook efectúa dicha operación a 70°C, pero recién a temperaturas inferiores a 60°C parece que las grasas se conservan inalteradas, por cuya razón Alloidi y Palomba hacen el secado entre 45-50°C. Pero cuanto menor es la temperatura empleada, tanto mayor será el tiempo necesario para realizar la operación. Las experiencias que hemos efectuado en este sentido demuestran que trabajando sobre 5 gs de heces, a 70-80°C la desecación es completa en 2 horas, mientras que a 45-50°C el tiempo mínimo necesario es de 12 horas. Por lo que se refiere a la desecación efectuada en el vacío, en presencia de cloruro de calcio anhidro y a temperatura ambiente, es total en 12 horas y a veces aún en un tiempo menor. De modo que no presenta ninguna desventaja con respecto al secado a 45-50°C, en cuanto al tiempo necesario para efectuar dicha operación.

Para la extracción de grasas, el disolvente usado generalmente es el éter etílico; Labbé, Gaultier y Cook, utilizan el extractor Soxhlet y realizan la extracción durante 1½ hora en el primero, hasta 72 horas en el último. Como según Kumagawa-Suto la extracción etérea efectuada en el Soxhlet es incompleta, Alloidi y Palomba utilizan como disolvente alcohol absoluto, cuya capacidad para disolver los lípidos es, según dicen estos autores, superior a la de los solventes comunmente usados. La extracción es rápida, pero el alcohol absoluto disuelve además otras sustancias, entre las que se encuentran: cloruros, productos intermedios del metabolismo proteico y de los hidratos de carbono, pigmentos, sales biliares y ja-

bases alcalinas. Estas sustancias se eliminan purificando el residuo del extracto alcohólico con éter, pero los autores no tienen en cuenta la porción de jabones alcalinos disueltos y obtienen un resultado mucho menor al valorar los jabones en el residuo de la primera extracción únicamente. La evaporación del extracto alcohólico deja un producto resinoso difícilmente extraíble con el éter. Por otra parte, la desecación a 45-50°C durante 12 horas, tampoco evita las transformaciones de las sustancias grasas, como resulta de las experiencias que se detallarán más adelante.

En el método de Roger los resultados se encuentran sujetos al error de la descomposición de los lípidos provocada por acción del calor y, además, por realizar la extracción con éter en presencia de agua, se puede producir la hidrólisis de las grasas neutras, lo que conduce a un aumento de los ácidos grasos, solubles en la capa etérea.

Capítulo III

OBJETO DEL PRESENTE TRABAJO

El objeto del presente trabajo ha sido el de adoptar un método de extracción sobre material desecado, contemplando todos los inconvenientes que se pueden presentar, tanto en el secado como en la extracción y operaciones del fraccionamiento de las sustancias grasas, y comparar los resultados obtenidos con las determinaciones realizadas por extracción sobre material húmedo o desecado a distintas temperaturas.

Además, se han hecho ensayos para estudiar la conservación de las heces que deban ser sometidas al análisis de sus lípidos, pues se sabe que las enzimas y bacterias presentes continúan actuando aún cuando se las mantenga a bajas temperaturas, produciendo la descomposición de las grasas neutras y jabones. El criterio seguido para estos ensayos ha sido únicamente de orden práctico.

TECNICA EMPLEADA

La técnica empleada para la determinación de los lípidos fecales se describe a continuación:

Reactivos.

éter etílico anhidro.

alcohol etílico

solución alcohólica de KOH 0,1 N

solución alcohólica de HCl 0,1 N

solución alcohólica de HCl al 10 %

solución alcohólica de fenolftaleína al 1 %

arena lavada y calcinada.

Material

desecador de vacío con cloruro de calcio anhidro

bomba de aceite

baño de maría

extractor ASTM con refrigerante de Hanen

refrigerante a reflujo

cápsulas de porcelana y vidrio

matraces, embudos y pipetas

El material de vidrio utilizado, debe estar perfectamente limpio, desengrasado y seco.

Procedimiento.

a): Desecación de la muestra:

Se pesan en una cápsula de porcelana 5 gs de heces homogeneizadas, se mezclan con arena y colocan en el desecador efectuando el vacío durante $\frac{1}{2}$ hora a temperatura ambiente; para asegurar una completa desecación deben permanecer en esa forma por lo menos durante 12 horas.

b): Extracción de los lípidos:

El material desecado se pulveriza y pasa totalmente al dedal del extractor ASTM. Se lava la cápsula con varias fracciones de éter etílico y colocan estos lavados en el extractor. Para realizar la extracción son suficientes 20-30 ml. de disolvente. Se deja el extracto así preparado durante una noche, de manera que el éter recubra todo el material. A la mañana siguiente se realiza la extracción calentando durante 3 horas a ebullición. Si se efectúa la extracción inmediatamente después de preparar el aparato, debe realizarse por lo menos durante 6 horas.

c): Determinación del extracto total:

Terminada la extracción, si el líquido es turbio se filtra y pasa a una cápsula de vidrio tarada; por lo general es limpio, de modo que se evapora el disolvente; el residuo se purifica disolviéndolo con otra porción de éter etílico. Finalmente se evapora y seca hasta peso constante.

El peso hallado x 20 : Extracto etéreo total %

d): Determinación de los Ácidos grasos libres:

Se disuelve el residuo del extracto etéreo en 10 ml. de una mezcla neutra de tres partes de alcohol y una de éter etílico; se agregan unas gotas de sol. de fenolftaleína y titulan los Ácidos libres con la solución alcohólica 0,1 N de KOH.

Los ml. de KOH gastados por 0,0284 y por 20, representan los ácidos grasos libres %, expresados en ácido esteárico.

e): Determinación de las sustancias saponificables:

Determinados los ácidos grasos libres, se evapora el éter de la

solución y agrega un exceso conocido de KOH 0,1 N. Se adapta al matr az un refrigerante a reflujo y calienta a ebullic on durante $\frac{1}{2}$ hora para efectuar la saponificaci on. En el líquido frío se valora el exceso de KOH con sol.alcohólica de HCl 0,1 N.

Los ml. de KOH fijados por 0,02966 por 20 representan las Sustancias saponificables expresadas en triestearina %.

f): Determinación de las sustancias insaponificables:

Esta fracción queda determinada por la diferencia entre el extracto etéreo total y la suma de los ácidos grasos libres y sustancias saponificables.

g): Determinación de los ácidos grasos de los jabones:

El residuo de la extracción etérea se acidula con unos ml. de HCl al 10 % y calienta a sequedad en b.de m. El polvo resultante se extrae con éter etílico en el extractor de ASTM, durante 3 horas. El líquido límpido se evapora, purifica con otra porción de éter, evapora hasta sequedad y pesa.

El peso obtenido por 20, representa los ácidos grasos de los jabones.

h): Expresión de los resultados:

Los resultados obtenidos se expresan en la siguiente forma:

Acidos grasos libres %

Acidos grasos de jabones %

Sustancias saponificables %

Sustancias insaponificables %

Lípidos totales %,

entendiéndose como tales, la suma del Extracto etéreo total y los Acidos grasos de jabones.

Para que estos resultados tengan valor, debe conocerse el peso total de las materias fecales excretadas diariamente para referirlos a esa cantidad.

Los índices de digestión y absorción se establecen conociendo la cantidad de grasas ingeridas diariamente. Por esta razón se debe someter a los enfermos a un régimen alimenticio de composición conocida, que debe durar

6 días, iniciándose la recolección de las heces a partir del tercero. Se determina el peso total de las muestras y la valoración de los lípidos se efectúa sobre una parte alícuota de la mezcla.

Los pigmentos vegetales - clorófila y carotenoides - solubles en éter si están presentes en cantidad no muy elevada, no son causa de error importante en la determinación del extracto total; pero la intensa coloración que comunican a la solución etérea, sobre todo la clorofila, dificulta la titulación exacta por interferir con el color del indicador. Es por ello que deben suprimirse del régimen de prueba.

DISCUSION DEL METODO.

a): Deseccación:

Para asegurar la integridad de los lípidos presentes en las heces, se desecaron sometiéndolas durante media hora a la acción del vacío producida por una bomba de aceite, en un desecador con cloruro de calcio anhidro y a temperatura ambiente. En esta forma, al cabo de doce horas se obtiene un polvo perfectamente seco y se logra separar los ácidos volátiles de las heces que por su solubilidad en éter, podría ser causa de error al valorar los ácidos grasos libres.

Con el objeto de disminuir el tiempo que demanda la desecación se efectuaron ensayos comparativos entre el secado al vacío y a una temperatura de 45-50°C, teniendo en cuenta que Alloidi y Palomba (2) consideran que a esta temperatura no se producen alteraciones de las distintas fracciones lipídicas.

Las experiencias realizadas demuestran que a 45-50°C el tiempo necesario para obtener el material seco, no disminuye si no que por el contrario, en algunas muestras es mayor.

Los resultados obtenidos, referidos a 100 gs de heces se expresan a continuación:

INFLUENCIA DEL SECADO A 45-50°C SOBRE LAS FRACCIONES LIPIDICAS

Muestra N°	I		II		III	
	al vacío	45-50°	al vacío	45-50°	al vacío	45-50°
Lípidos totales	5,060	5,000	5,936	5,628	6,670	6,860
Ac.gras.libres	1,392	1,085	3,158	3,039	3,735	3,777
Ac.gras.de jab.	0,720	0,860	1,396	1,364	1,060	0,660
Sust.saponific.	1,601	2,335	1,127	0,593	1,780	2,374
Sust.insaponif.	1,347	0,720	0,255	0,632	0,095	0,109

Del examen de los resultados obtenidos se deduce que cuando se efectúa el secado de las neces a 45-50°C :

- a): los ácidos grasos libres no sufren modificación,
- b): se produce una disminución de los jabones,
- c): existe variación en las sustancias saponificables e insaponificables.

Las diferencias en menos observadas en los jabones, se debe, sin duda alguna, al efecto hidrolizante del agua a esa temperatura.

La variación de las sustancias saponificables e insaponificables parece producirse a expensas de los ácidos grasos de los jabones.

Para poner aún más de manifiesto la acción que produce la temperatura sobre las distintas fracciones lípidicas y demostrar los errores que se han cometido en otros métodos, hemos efectuado la desecación de las muestras en baño de maría hirviente, comparando los resultados obtenidos con los de las mismas muestras desecadas al vacío y temperatura ambiente (20°C).

Los valores de los ensayos realizados se expresan a continuación referidos a 100 gs. de neces:

INFLUENCIA DEL SECADO A BAÑO DE MARIA HIRVIENTE SOBRE LOS LIPIDOS.

Nº	Deseca- ción	Lipidos totales	Ac.Gras. libres	Ac.Gras. jabones	Sustanc. saponif.	Sustanc. Insapon.	Dif.de lip.tot	Difer. %
1	vacío	7,502	2,357	4,040	0,350	0,755		
	b.de m.	7,506	2,365	1,546	1,008	2,587	0,004	0,05
2	vacío	11,772	0,564	9,948	0,712	0,448		
	b.de m.	11,872	1,420	8,820	0,771	0,861	0,100	0,84
3	vacío	15,600	6,702	0,800	5,330	2,768		
	b.de m.	15,904	5,559	0,192	5,623	4,530	0,304	1,94
4	vacío	14,120	8,406	2,008	3,380	0,366		
	b,de m.	15,662	12,893	0,698	1,898	0,173	1,542	10,91
5	vacío	15,960	4,544	0,990	6,505	3,921		
	b.de m.	15,096	3,834	0,062	6,505	4,695	-0,864	-5,41
6	vacío	3,832	1,022	1,704	0,415	0,691		
	b.de m.	3,718	1,931	0,948	0,688	0,151	-0,114	-2,97
7	vacío	7,056	2,442	3,670	0,593	0,351		
	b.de m.	7,434	3,351	0,634	1,036	2,413	0,378	5,35
8	vacío	13,900	9,656	2,364	1,720	0,160		
	b.de m.	15,424	11,587	1,608	1,763	0,466	1,524	10,96
9	vacío	7,104	1,192	4,284	0,593	1,035		
	b.de m.	7,860	2,471	1,920	1,631	1,838	0,756	10,64
10	vacío	6,424	1,539	2,892	1,483	0,510		
	b.de m.	6,444	1,710	0,716	2,195	1,823	0,020	0,31
11	vacío	8,540	1,249	5,756	1,068	0,467		
	b.de m.	7,932	2,158	3,132	1,186	1,456	-0,608	-7,00
12	vacío	5,716	1,431	3,180	1,086	0,019		
	b.de m.	5,938	1,818	2,382	1,483	0,255	0,222	3,86
13	vacío	3,868	1,136	1,084	1,186	0,462		
	b.de m.	4,224	1,817	0,612	1,147	0,648	0,356	9,20

INFLUENCIA DEL SECADO A BAÑO DE MARIA HIRVIENTE SOBRE LOS LIPIDOS.

Nº	Deseca- ción	Lipidos totales	Ac.Gras. libres	Ac.Gras. jabones	Sustanc. saponif,	Sustanc. insapon.	Dif.de. lip.tot.	Difer. %
14	vacío	4,104	1,193	1,460	0,890	0,561		
	b.de m.	4,083	1,136	1,363	0,949	0,635	-0,021	-0,51
15	vacío	2,232	0,432	0,932	0,534	0,334		
	b.de m.	2,126	0,324	0,738	0,676	0,388	-0,106	-4,74
16	vacío	6,020	2,508	2,828	0,649	0,035		
	b.de m.	6,400	4,345	0,852	0,712	0,491	0,380	6,14
17	vacío	8,452	3,919	3,596	0,451	0,274		
	b.de m.	7,884	3,862	3,120	0,711	0,191	-0,568	-6,72
18	vacío	15,764	9,997	4,036	1,424	0,307		
	b.de m.	15,848	9,851	2,060	3,140	0,797	0,084	0,53
19	vacío	8,800	1,715	4,044	2,373	0,668		
	b.de m.	8,820	5,157	1,172	1,246	1,245	0,020	0,22
20	vacío	15,890	13,916	0,480	1,127	0,367		
	b.de m.	15,624	13,000	0,532	2,006	0,086	-0,266	-1,67
21	vacío	16,608	2,840	10,956	2,195	0,617		
	b.de m.	15,904	3,010	9,396	1,340	2,158	-0,694	-4,17
22	vacío	7,608	2,249	4,204	1,127	0,028		
	b.de m.	7,074	2,355	1,604	3,067	0,048	-0,534	-7,01
23	vacío	28,292	17,949	6,244	2,691	1,408		
	b.de m.	30,844	23,555	3,880	1,483	1,926	2,552	9,00
24	vacío	10,724	3,760	4,568	2,076	0,320		
	b.de m.	11,608	5,566	2,676	2,788	0,578	0,884	8,24

Las diferencias absolutas y porcentuales que figuran en este cuadro se refieren solamente a la cifra de lípidos totales y, como se puede ver, no son muy marcadas. Este resultado es lógico, dado que la única variante en la técnica empleada es la desecación de la muestra.

Por lo que respecta a cada una de las fracciones lipídicas, cuando se efectúa el secado a baño de maría hirviente, se observa:

- a): aumento del extracto etéreo total (que no figura en el cuadro),
- b): disminución de los ácidos grasos de los jabones,
- c): modificaciones de las cifras de ácidos grasos libres, sustancias saponificables e insaponificables.

El aumento del extracto total está condicionado por la descomposición de los jabones, los que al hidrolizarse por acción de la temperatura, elevan la cantidad de sustancias étero-solubles. Los ácidos grasos liberados pueden sumarse a los ya existentes, o bien combinarse a otras sustancias presentes en las heces, o sufrir transformaciones por acción de la temperatura, en ese medio tan complejo. En cuanto a las bases alcalinas o alcalino-térreas se unirían a los fosfatos, carbonatos o sustancias de carácter ácido y el amoníaco de los jabones de amonio podría volatilizarse.

Es probable que los ácidos grasos se combinen a las fracciones esterólicas libres originando sustancias solubles en éter, que posteriormente aparecen elevando las cifras correspondientes a las sustancias saponificables y disminuyendo las insaponificables. La posibilidad de tal combinación se ha probado experimentalmente en la siguiente forma: Se mezclan cantidades conocidas de ácido palmítico y colesterol y calienta durante una hora a baño de maría hirviente. A continuación se efectúa la extracción etérea y en el extracto obtenido se titula la acidez libre. Luego se saponifica con sol. alcohólica de KOH 0,1 N y, por diferencia, se determina la fracción insaponificable, que se considera constituida por el colesterol libre. Las sustancias saponificables se expresan como éster palmítico del colesterol y la cantidad obtenida se expresa en cada uno de sus componentes.

Los resultados obtenidos en dos ensayos son los siguientes:

ESTERIFICACIÓN DEL COLESTEROL.

Ensayo	I	II
ácido palmítico agregado	0,2418	0,4170
colesterol agregado	0,1000	0,1880
extracto etereo total	0,3440	0,6048
ácido palmítico libre	0,2285	0,3838
éster palmítico-colesterol	0,0507	0,0874
sustancias insaponificables	0,0648	0,1336
ácido palmítico combinado	0,0179	0,0358
colesterol combinado	0,0340	0,0540
ácido palmítico libre y comb.	0,0988	0,1876
colesterol libre y combinado	0,2464	0,4196

Extracción:

Teniendo en cuenta que Kumagawa- Suto consideran que en la extracción eterea en frío quedan grasas sin disolver, por lo que utilizan el eter a su temperatura de ebullición, hemos realizado la extracción en esta forma.

Para determinar el tiempo mínimo necesario para efectuar la extracción, se realizaron una serie de ensayos. En uno de ellos, se efectuaron extracciones por periodos de 90 minutos cada uno y los resultados referidos a 100 gs de heces, se expresan a continuación:

ESTUDIO DEL TIEMPO DE EXTRACCION

T.de extracción	1½ hs	3 hs	Total
Muestra I	2,560	0,176	2,736
Muestra II	1,972	0,270	2,242
Muestra III	1,024	0,164	1,188

Como puede observarse, en el segundo período se extrae todavía una cantidad apreciable de lípidos. Con el objeto de estudiar si tres horas de extracción son suficientes, se efectuaron ensayos durante tres horas más. Los resultados obtenidos se expresan a continuación en forma de cuadro:

T.de extracción	3 hs.	6 hs.	Total
Muestra I	12,132	0,136	12,268
Muestra II	3,492	0,192	3,684
Muestra III	3,532	0,140	3,672

De la observación del cuadro anterior se deduce:

- a): la extracción de lípidos en el segundo período de tres horas, es independiente de la cantidad total,
- b): en el segundo período de tres horas las diferencias expresadas por cien gramos de heces, son apreciables, pero en cifras absolutas sólo representan unos miligramos.

Haciendo fraccionamientos en períodos mas largos, se obtienen los siguientes resultados:

T.de extrac.	3 hs	6 hs	9 hs	12 hs	Total	Dif.% de tot.y 6 hs
Muestra I	12,132	0,136	0,100	0,080	12,448	1,40
Muestra II	3,532	0,140	0,160	0,152	3,984	7,80
Muestra III	4,340	0,144	0,166	0,036	4,686	4,20

Como puede observarse en el cuadro anterior, las diferencias porcentuales entre el total de lípidos extraídos en 12 y 6 hs., son desde el punto de vista práctico despreciables, desde que la cifra máxima observada no alcanza al 8 %; por tanto, estimamos que la extracción no debe continuarse más allá de las primeras 6 horas.

Con el objeto de estudiar si era posible aún disminuir este tiempo de extracción, se efectuaron otra serie de ensayos, en que el material a extraer se mantuvo en contacto con el solvente durante una noche, efectuando al día siguiente la extracción durante 3 horas.

Para comprobar el grado de extracción, se continuó extrayendo durante 3 horas más, y las cifras que se obtuvieron en este segundo periodo son practicamente despreciables, como lo demuestran los resultados que se expresan a continuación, referidos a 100 gs de heces:

LIPIDOS EXTRAIDOS DESPUES DE 12 Hs. DE IMPREGNACION

T.de extracción	3 hs.	6 hs.	Total
Muestra I	3,712	0,064	3,776
Muestra II	4,528	0,048	4,576
Muestra III	2,340	0,076	2,416

Control del método.

Como el método que estudiamos tiene características propias, no puede ser controlado por ningún otro, pero en cambio pueden efectuarse ensayos que demuestren su valor. Estimamos que son suficientes:

a) Pruebas de recuperación:

Para efectuar estas pruebas se agregó a una cantidad exactamente pesada de heces, cuyos lípidos habían sido previamente determinados, una cantidad conocida de aceite. La mezcla bien homogeneizada se desecó al vacío y sometió a la extracción en las condiciones establecidas. Los resultados obtenidos en las distintas pruebas de recuperación son los siguientes:

ENSAYOS DE RECUPERACION

Lípidos agreg.	Lípidos recup.	Difer.absol.	Dif.porcent.
1,0864 gs.	1,1010 gs.	0,0146 gs.	1,34
0,9042	0,9228	0,0186	2,05
0,9710	0,9610	-0,0100	-1,02
1,1300	1,1476	0,0176	1,35
0,9164	0,9252	0,0080	0,96
1,3614	1,3490	-0,0124	-0,91
2,0360	2,0518	0,0158	0,78

b): Ensayos por duplicado:

En los ensayos efectuados por duplicado sobre una misma muestra, se obtuvieron los siguientes valores:

ENSAYOS POR DUPLICADO.

Nº	Lípidos tot.	Difer.absol.	Dif,porcent.
1	5,444 5,424	0,020	0,36
2	5,418 5,398	0,020	0,36
3	4,144 4,104	0,040	0,96
4	15,688 15,666	0,022	0,14
5	8,820 8,800	0,020	0,22
6	4,104 4,083	0,021	0,51
7	6,444 6,424	0,020	0,31
8	15,688 15,600	0,088	0,56
9	7,506 7,502	0,004	0,05

Expresión de los resultados:

Acidos grasos libres:

Siguiendo la norma establecida por otros autores se han expresado los ácidos grasos libres en ácido esteárico, cuyo peso molecular es 284. Harrison (30) estudiando la distinta calidad de los ácidos grasos libres de las heces, aconseja utilizar como peso molecular medio 268 y emplea este factor de transformación para expresar los resultados.

Sustancias saponificables:

Teniendo en cuenta que en las heces no sólo

se encuentran triglicéridos, aunque estos son los que predominan, sino, que también existen otros ésteres de ácidos grasos, igualmente saponificables, y que se extren al mismo tiempo que aquéllos, preferimos designar con el nombre de "Sustancias saponificables" al conjunto de las que se hidrolizan en medio alcalino por el calor, expresando los resultados arbitrariamente en triestearina.

Sustancias insaponificables:

Esta fracción lipídica puede determinarse en dos formas:

- a) Por cálculo entre la diferencia del Extracto etéreo total y la suma de ácidos grasos libres y sustancias saponificables.
- b) Por extracción etérea del residuo de la saponificación.

Desde luego, la segunda manera de operar es más exacta, ya que se evitan los errores introducidos por los inevitables de las dos determinaciones anteriores, provenientes de la expresión arbitraria de los resultados. Como de cualquier modo, las diferencias desde el punto de vista práctico no son significativas, creemos que puede utilizarse la primera forma de cálculo.

Jabones:

Hemos utilizado la gravimetría para la determinación de los ácidos grasos provenientes de los jabones, expresando los resultados en esa forma, por cuanto nos parece más exacta que la determinación volumétrica que aconseja Labbé como control, A pesar de ello, se han efectuado una serie de ensayos disolviendo el residuo de la extracción en una mezcla de alcohol-éter y titulando los ácidos grasos provenientes de los jabones con sol.alcoholica de KOH 0,1 N, en presencia de fenolftaleína. Los resultados obtenidos, que expresamos en ácido esteárico, referidos a 100 gs de heces, demuestran que las diferencias no son marcadas, y que el control aconsejado por Labbé no tiene objeto, desde que las variaciones que dice haber observado en la titulación, se deben, sin duda alguna, a la deficiente eliminación del HCl, utilizado para liberar los ácidos grasos de los jabones y que en parte se solubilizan en éter al hacer la extracción.

ENSAYOS COMPARATIVOS
DE LA VALORACION DE JABONES.

Gravimetría	Volumetría	Difer.absol.	Dif.porcent.
1,590	1,377	- 0,213	-13,30
3,260	3,124	- 0,136	- 4,20
0,820	0,758	- 0,062	- 7,60
0,960	1,022	0,062	6,50
2,370	2,523	0,153	6,50
3,732	3,578	- 0,154	- 4,10
1,200	1,193	- 0,007	- 3,60
4,204	4,430	0,226	5,40
4,568	4,828	0,260	5,70
0,480	0,511	0,031	6,50
0,532	0,593	0,061	11,00
3,572	3,692	0,120	3,30

Capítulo IV.

ENSAYOS COMPARATIVOS ENTRE EL METODO
PROPUESTO Y LOS DE EXTRACCION HUMEDA.

Con el fin de comparar los resultados obtenidos entre la extracción etérea de las heces desecadas al vacío y la extracción directa sobre el mismo material húmedo, se hicieron determinaciones usando la técnica de Fowweather. Estos ensayos no dieron resultados satisfactorios, debido a las dificultades de realización, ya citadas anteriormente. Por este motivo, se recurrió al método de Tidwell-Holt, pero como estos autores hacen la desecación a la temperatura ambiente y el fin propuesto es el de trabajar con material húmedo, se efectuó la extracción aplicando dicho método directamente a las heces. El fraccionamiento de los lípidos se realizó en la misma forma que para las desecadas al vacío. Los resultados de los ensayos efectuados, referidos a 100 gs de heces se expresan a continuación.

EXTRACCION DEL MATERIAL SECO Y HUMEDO.

Nº	Extracc.	Lípidos totales	Ac.Gras. libres	Ac.Gras. jabones	Sustanc. saponif.	Sustanc. insapon.	Dif.de lip.T.	Difer. %
1	seca	6,848	2,556	3,044	0,879	0,469		
	húmeda	6,808	2,896	2,820	0,846	0,246	-0,040	-0,58
2	seca	14,748	10,622	2,364	1,720	0,062		
	húmeda	15,220	12,496	0,900	1,780	0,044	0,472	3,20
3	seca	5,716	1,431	3,180	1,086	0,019		
	húmeda	5,945	1,690	1,590	0,742	1,923	0,229	4,00
4	seca	3,968	1,411	1,204	1,305	0,048		
	húmeda	3,830	1,562	0,960	0,727	0,581	-0,138	-3,47

De la comparación de cada una de las fracciones lipídicas, se deduce: que cuando se opera sobre material húmedo:

- a): aumentan los ácidos grasos libres,
- b): disminuyen los ácidos grasos de los jabones,
- c): disminuyen las sustancias saponificables,
- d): aumentan las sustancias insaponificables.

El aumento de los ácidos grasos libres se debe, sin duda, a la descomposición de los jabones y grasas neutras producidas por acción del agua. No es posible explicar el aumento de la fracción insaponificable.

Capítulo V.

CONSERVACION DE LAS HECES.

Los lípidos contenidos en las heces son susceptibles de sufrir alteraciones cuando se las mantiene a temperatura ambiente durante cierto tiempo; por eso, cuando se quieren determinar estas sustancias, es necesario efectuar el análisis inmediatamente, pues en caso contrario, se pueden producir diversas transformaciones en las distintas fracciones grasas.

Según Smith, Miller y Hawk (22), los cambios son debidos a la acción bacteriana y a los fermentos lipolíticos de las heces. Estos autores estudiaron su conservación por medio del frío, considerando que cuando se las mantiene congeladas en presencia de timol, las sustancias nitrogenadas no se modifican. No siendo posible usar este conservante para preservar la alteración de los lípidos, debido a su constitución, sometieron las heces a una temperatura de -12°C , realizando durante cinco semanas determinaciones periódicas de: Lípidos totales, Acidos grasos libres y Grasas neutras utilizando la técnica de Saxon. Hallaron en todos los casos una disminución de los lípidos totales, tanto mayor cuanto más tiempo había transcurrido y la atribuyeron solamente a la acción bacteriana. Notaron además, el aumento de los ácidos grasos libres y disminución de las grasas neutras debido en parte a la hidrólisis enzimática de los triglicéridos y en parte a la misma destrucción de las grasas totales.

Los resultados obtenidos en la valoración de los ácidos grasos no son uniformes, lo que indica que la actividad de la lipasa presente es variable, pero, evidentemente aún a -12°C se conserva, aunque disminuida.

Todo esto está de acuerdo con los trabajos realizados anteriormente por Pennington, Hepburn y Connolly (22) sobre la actividad de la lipasa de la grasa del pollo, quienes demostraron que esta temperatura disminuye pero no inhibe la actividad lipolítica. Por otra parte, Richardson (22) encuentra que la lipasa pancreática conserva parte de su acción cuando se la mantiene congelada durante dos o tres meses. La simple congelación, resulta ineficaz para conservar inalteradas las grasas.

Los estudios efectuados por Glick y King (34) prueban que la lipasa pancreática es una globulina o que su actividad está íntimamente relacionada a dicha sustancia. Según los trabajos de Murray contiene grupos químicos capaces de reaccionar con el carbonilo de las cetonas.

Weinstein y Wynne (34) estudiaron la acción que ejercen in vitro, una serie de sustancias sobre la actividad o inhibición de la lipasa pancreática terminando la velocidad de hidrólisis de un triglicérido - tripropionina- en presencia o ausencia de dichas sustancias. Hicieron ensayos con cetonas y aldehídos, encontrando que los segundos tienen mayor acción inhibidora. Realizaron experiencias con sales de metales pesados encontrando que en concentración de $0,5 \times 10^{-5}M$ a $2,5 \times 10^{-5}M$, inhiben la acción lipolítica, pero resultan inactivos cuando la concentración alcanza a $10^{-7}M$. La misma acción se manifiesta con cianatos, sulfocianuros, fenoles, ortoquinona y algunas otras sustancias.

Parte experimental

Teniendo en cuenta todos estos antecedentes, se decidió el estudio de la conservación de las materias fecales durante cierto tiempo. Se determinaron previamente las alteraciones experimentadas por los lípidos cuando se mantienen en una heladera a $1-2^{\circ}C$, sin la adición de ningún conservante. Las valoraciones se efectuaron cada diez días, realizando la desecación de las heces al vacío y la extracción etérea según la técnica ya indicada. Los ensayos se repitieron a los veinte días y en una muestra hasta los treinta días, pero como el fin perseguido es sólo de orden práctico, se consideró suficiente un período de quince a veinte días.

Los resultados obtenidos en estos primeros ensayos, referidos a 100 gs de heces, se indican a continuación:

ALTERACIONES DURANTE LA PERMANENCIA A 1-2°C

Muestra	I			II		
	0	10	20	0	10	20
Tiempo en días						
Lípidos totales	15,960	15,600	15,688	3,868	3,770	3,330
Ac. Gras. libres	4,544	6,702	7,270	1,136	1,420	1,568
Ac. Gras. Jabones	0,990	0,800	0,460	1,084	0,818	0,102
Sust. saponific.	6,505	5,330	5,101	1,186	1,186	1,210
Sust. insaponif.	3,921	2,768	2,857	0,462	0,346	0,450

Muestra	III			IV		
	0	10	20	0	10	20
Tiempo en días						
Lípidos totales	12,380	11,584	10,828	5,424	5,716	5,418
Ac. Gras. Libres	1,363	1,377	0,511	1,543	1,431	2,366
Ac. Gras. Jabones	9,292	8,936	8,852	2,892	3,180	2,150
Sust. saponific.	0,593	0,712	0,593	1,483	1,086	0,890
Sust. insaponif.	1,132	0,559	0,872	0,510	0,019	0,012

De los resultados analíticos que anteceden se deduce:

- a): existe en general una disminución de los lípidos totales,
- b): se produce un aumento de los ácidos grasos libres,
- c): disminuyen las sustancias saponificables,
- d): disminuyen los ácidos grasos de los jabones.

Es de hacer notar que Smith, Miller y Hawk en su estudio no tuvieron en cuenta la fracción de los jabones, los que de acuerdo a nuestras experiencias disminuyen, en cantidad notable en algunos casos. Existe evidentemente hidrólisis enzimática de las grasas neutras y pérdida de los lípidos totales, a veces muy marcada, que puede atribuirse a la acción de las bacterias.

Las experiencias de los autores citados y las nuestras, demuestran que la acción del frío es insuficiente para evitar las acciones lipolíticas; por esa razón se recurrió al agregado de algunas sustancias químicas

Para la elección de las sustancias que han de utilizarse como conservantes de las materias fecales, se tuvo en cuenta :

- a): acción sobre lipasas y bacterias.
- b): acción sobre los lípidos.
- c): solubilidad en éter.
- d): posibilidad de purificar los extractos etéreos.

Tres sustancias se han ensayado con este objeto: formol; cloruro mercúrico y furfural; utilizándose el primero en forma de vapores y en solución.

Vapores de formol.

Se colocaron las heces en un recipiente cerrado, suspendiendo de la tapa una pastilla de formalina, de modo que en el interior del mismo se asegurase una atmósfera de vapores de formol. En esas condiciones se colocaron en heladera a 1-2°C, efectuando las valoraciones a los 10, 20, y 30 días. Los resultados obtenidos se expresan a continuación:

ENSAYOS DE CONSERVACION CON FORMOL (vapor)

Muestra	I			II			
	0	10	20	0	10	20	30
Tiempo en días							
Lípidos totales	7,104	6,848	6,760	7,746	7,638	7,502	7,056
Ag. Gras. libres	1,192	2,556	2,181	2,312	2,102	2,357	2,442
Ac. Gras. Jabones	4,284	3,044	3,016	4,296	4,194	4,040	3,670
Sust. saponific.	0,593	0,879	1,398	0,296	0,296	0,350	0,593
Sust. insaponif.	1,035	0,469	0,665	0,842	1,046	0,755	0,351

De los resultados que anteceden se deduce:

- a): la saturación con vapores de formol no es suficiente para impedir la acción bacteriana, por cuanto los lípidos totales disminuyen.
- b): parece existir una inhibición de la lipasa pues se produce el aumento de la fracción saponificable, el que podría ser a expensas de los ácidos grasos liberados de los jabones, esterificados con las sustancias

insaponificables.

c): el aumento de los ácidos grasos libres se explica por la descomposición de los jabones.

Solución de formol al 40 %.

Dada la ineficacia de los vapores de formol, se efectuaron otros ensayos incorporando 1 ml. de solución de formol al 40 % por cada 100 gs de heces. La mezcla homogeneizada se mantuvo en heladera a 1-2°C, valorando los lípidos a los 15 y 30 días. Los resultados obtenidos, referidos a 100 gs de materias fecales, son los siguientes:

ENSAYOS DE CONSERVACION CON FORMOL (solución)

Muestra	I		
	0	15	30
Tiempo en días			
Lípidos totales	15,688	15,666	15,470
Ac.Gras.libres	7,270	8,122	9,394
Ac.Gras.Jabones	0,460	0,372	0,204
Sust.saponific.	5,101	4,508	5,576
Sust.insaponif.	2,857	2,664	0,290

Muestra	II			III		
	0	15	30	0	15	30
Tiempo en días						
Lípidos totales	8,540	8,666	8,794	14,892	13,980	13,738
Ac.Gras.libres	1,249	1,363	1,323	1,363	2,204	1,022
Ac.Gras.Jabones	5,756	5,952	5,670	12,260	10,408	10,266
Sust.saponific.	1,068	1,186	0,850	0,889	0,652	0,830
Sust.insaponif.	0,467	0,165	0,951	0,380	0,716	1,620

Como puede observarse por los resultados obtenidos, las transformaciones se producen en el mismo sentido que cuando se conservan las heces impregnadas con los vapores de formol.

Cloruro mercurico.

Según los trabajos de Weinstein y Wynne, el cloruro mercurico inhibe in vitro la acción enzimática de la diastasa pancreática y tiene además acción bactericida, razón por la cual se lo ensayó para la conservación de las heces, incorporándose en forma tal que la concentración fuese de 0,1 g %. Análogamente a los casos anteriores, las muestras se mantuvieron a una temperatura de 1-2°C y las determinaciones de los lípidos se efectuaron a los 20 días. Los resultados obtenidos para 100 gs de heces, son los siguientes:

ENSAYOS DE CONSERVACION CON CLORURO MERCURICO

Muestra	I		II	
	0	20	0	20
Tiempo en días				
Lípidos totales	5,428	5,398	9,252	8,452
Ac.Gras.libres	1,431	2,130	3,294	3,919
Ac.Gras.Jabones	2,892	2,370	4,608	3,596
Sust.saponific.	1,086	0,978	0,771	0,451
Sust.insaponif.	0,019	—	0,579	0,486
Extracto etéreo	2,536	3,028	4,644	4,856

De los resultados obtenidos se deduce:

- a): los ácidos grasos libres aumentan,
- b): disminuyen los ácidos grasos de los jabones,
- c): las sustancias saponificables disminuyen,
- d): las sustancias insaponificables disminuyen,
- e): existe un aumento del extracto etéreo total.

Interpretamos estos resultados suponiendo que el cloruro mercurico ha formado complejos con las sustancias nitrogenadas proteicas de las heces y precipitado en forma inactiva frente a las enzimas lipolíticas. También podría ocurrir que la sal actuara como agente catalítico de oxidación de los ácidos grasos no saturados, lo que llevaría a la formación de nuevas

funciones ácidas, que la titulación posterior y su expresión en ácido esteárico conduciría al aumento del valor de los ácidos grasos libres y, en consecuencia a la disminución de las sustancias insaponificables, que en el caso de ser originariamente muy pequeña, como en la Muestra n°I, llegaría hasta tener valor negativo.

Furfural.

Teniendo en cuenta el alto poder de penetración de esta sustancia y su acción bactericida, se la ha ensayado para la conservación de las heces, utilizándola en la concentración de 0,2 g % y manteniendo las muestras en heladera a 1-2°C. Como el furfural es soluble en eter etílico, se purificaron los extractos etéreos con éter de petróleo. Los resultados obtenidos a los 15 días, expresados para 100 gs de heces, son los siguientes

ENSAYOS DE CONSERVACION CON FURFURAL

Muestra	I		II	
	0	15	0	15
Tiempo en días				
Lípidos totales	5,472	5,234	10,724	11,264
Ac. Gras. libres	2,508	2,919	3,760	4,942
Ac. Gras. Jabones	2,280	1,200	4,568	4,204
Sust. saponific.	0,649	0,816	2,076	1,661
Sust. insaponif.	0,035	0,299	0,320	0,457

De los resultados que anteceden se deduce que: La solución de furfural, en concentración de 0,2 gs %, tampoco presenta propiedades conservantes de las fracciones lipídicas, por cuanto no se mantienen los valores del momento inicial. Es evidente que el furfural impide el desarrollo de las bacterias pero no inhibe la acción enzimática.

Capítulo VI

CONCLUSIONES FINALES

Del conjunto de resultados obtenidos en este estudio experimental se deducen las conclusiones siguientes:

- 1°: Las técnicas de valoración de lípidos por medio de la extracción directa sobre las heces no son de realización práctica.
- 2°: Dichas técnicas son inexactas, por cuanto provocan la hidrólisis de los jabones y de las grasas neutras.
- 3°: Las técnicas que hacen la extracción de los lípidos después de la desecación de las heces a baño de maría hirviente, deben desecharse por cuanto producen intensas alteraciones en los mismos.
- 4°: El calentamiento de las heces a 45-50°C produce cambios en sus fracciones lipídicas, comparando los resultados obtenidos con la desecación a temperatura ambiente y vacío.
- 5°: La integridad de los lípidos fecales, se asegura por desecación del material a temperatura ambiente y en el vacío, antes de realizar la extracción.
- 6°: Un disolvente ~~que~~ apropiado para la extracción de los lípidos fecales es el éter etílico.
- 7°: Cuando se emplea el extractor de ASTM, con éter a su temperatura de ebullición, el tiempo mínimo necesario para que la extracción sea total es de 6 horas.
- 8°: Con el objeto de disminuir el tiempo de extracción de los lípidos conviene dejar las heces desecadas y pulverizadas en el extractor, cubiertas con éter, durante una noche y efectuar al día siguiente la extracción durante 3 horas.

FOURBA

- 9°: Cuando las heces se mantienen en heladera a 1-2°C, sólo conservan inalteradas sus fracciones lipídicas, durante los primeros 10 días.
- 10°: La adición a las heces de sustancias preservantes como el formol, cloruro mercuríco y furfural, en las condiciones indicadas, tampoco inhiben la descomposición de los lípidos.

WRA Pety

BIBLIOGRAFIA.

- 1 - Agasse-Laffont, E. Aplicaciones del laboratorio a la clínica. Madrid, 1923. Baillly-Bailliére.
- 2 - Alloidi, A. y Palomba, G. Sul dosaggio qualitativo dei grassi fecali. Clin.Med.Ital. 60: 364, (1929).
- 3 - Asenjo, Conrado. The chemistry of fats. A short review. Bol.Ofic. Asoc.Quim.de Puerto Rico. 23-28 Set. (1942).
- 4 - Bodansky, O. y Bodansky M. Biochemistry of diseases. N.York. 1940. The Mac Millan Co.
- 5 - Cook, Robert P. Cholesterol metabolism. I Acids apparently concerned in the metabolism of cholesterol. Biochem.J. 32: 1191, (1938).
- 6 - Dean, H.K. Utilization of fats. Chemical Pub.Co.of N.York Inc. 1938.
- 7 - Fowweather, F.S. The determination of the amount and ~~the~~ composition of the fats of feces. I. Investigation of a "wet" method and comparison with the "dry" method. Brit.J.Exp.Path. 7: 7, (1926).
- 8 - Frazer, A.C. Fat absorption and metabolism. Analyst. 63: 308, (1938).
- 9 - Goiffon, R. Manual de coprología clínica. Barcelona. J.Aragones.
- 10 - Gradwohl, R.B.H. Clinical laboratory methods and diagnosis. St.Louis, 1936. C.V.Mosby Co.
- 11 - Guasano G. Determinazione dei grassi fecali. Diagn.e tecn. lab. 1: 254, (1930).
- 12 - Hilditch, T.P. The chemical constitution of natural fats. N.York, 1940. John Willey and Sons.
- 13 - Holt, Courtney y Fales. A method for the determination of fat in dried feces and its distribution as soaps, free fatty acids and neutral fat. An application to feces of the Rose-Gottlieb method. Am.J.Dis.Child. 17: 38, (1919).
- 14 - Kaye, Leibner y Sobel. Improved apparatus for the extraction of lipids from liquids and solids, with further applications to the fractionation of fecal fat. J.Biol.Chem. 138: 643 (1941).
- 15 - Krakower, A. Fecal fat and its relation to fat in the diet. Am.J.Physiol. 107: 49 (1934).

- 16 - Mathews, A.P. Principles of Biochemistry. Baltimore. 1936. Wood, Co.
- 17 - Peters J. y Van Slyke D. Quantitative Clinical Chemistry. Methods. London, 1932. Baillière, Tindall and Co.
- 18 - Peretti, G. Escrezione di grassi esogeni al traverso la mucosa entérica. Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. X: 79, (1935).
- 19 - Rosell, J.M. Coprología clínica. Madrid, 1920. Soc. Española de Publicaciones médicas.
- 20 - Saxon, E.J. A method for the determination of the total fats of undried feces and other moist masses. J. Biol. Chem. 17: 99, (1914).
- 21 - Shapiro, Koster, Rittenberg y Schönheimer. The origin of fecal fat in the absence of bile, studied with Deuterium as an indicator. Am. J. Physiol. 117: 525, (1936).
- 22 - Smith, Miller y Holt. Changes in the fat content of feces preserved by freezing without the addition of a preservative. J. Biol. Chem. 1: 254, (1915).
- 23 - Sperry, Warren. Lipids excretion. III Further studies of the quantitative relations of the fecal lipids. J. Biol. Chem. 68: 357, (1926).
- 24 - idem. Lipids excretion. IV. A study of the relationship of the bile to the fecal lipids with special reference to certain problems of sterols metabolism. J. Biol. Chem. LXXI: 351, (1927).
- 25 - idem. Lipids excretion. V. A study of the partition of the fecal lipids with special reference to bacteria. J. Biol. Chem. 81: 299, (1927).
- 26 - idem. A method for studying the distribution of fecal lipids. J. Biol. Chem. 78: Proc. XLIV, (1928).
- 27 - idem. Lipid excretion. VII The partition of fecal lipids in bile fistula dogs. J. Biol. Chem. 85: 455, (1930).
- 28 - idem. The lipid content of the intestinal mucosa. J. Biol. Chem. 92: XXXIII-XXXV, (1935).
- 29 - Sperry, W. y Angevine, R. Lipid excretion. IX The secretion of lipids into the intestine. J. Biol. Chem. 26: 769, (1932).
- 30 - Tidwell, H. y Holt, L. The estimation of the total lipids and the lipids partition in feces. J. Biol. Chem. 112: 605, (1935-36).

- 31 - Thannhauser, S.J. Tratado del metabolismo y enfermedades de la nutrición. Barcelona, 1932. Labor.
- 32 - Verzár, F. The absorption of fats. Nutrition Abstracts and reviews. II: 441, (1933).
- 33 - Verzár, F. Absorption from the intestine. London, 1936. Longmans, Green and Co.
- 34 - Weinstein, S. y Wynne, M. Studies on Pancreatic lipase. II. Influence of various compounds on the hydrolytic activity. J. Biol. Chem. 112: 649, (1935-36).
-

INDICE

<u>Capítulo I.</u>	
Introducción	pag. 1
Digestión y absorción de las grasas	1
Excreción de los lípidos	3
<u>Capítulo II</u>	
Descripción de los distintos métodos	9
Métodos de extracción sobre material húmedo	9
Comentarios	12
Métodos de extracción sobre material seco	13
Comentarios	16
<u>Capítulo III.</u>	
Objeto del presente trabajo	18
Técnica empleada	18
Discusión del método	21
Desecación	21
Extracción	26
Pruebas de recuperación	29
Ensayos por duplicado	30
Expresión de los resultados	30
<u>Capítulo IV.</u>	
Ensayos comparativos entre el método propuesto y los de extracción húmeda	33
<u>Capítulo V.</u>	
Conservación de las heces	35
Parte experimental	36
Vapores de formol	38
Solución de formol	39
Cloruro mercuríco	40
Furfural	41
<u>Capítulo VI.</u>	
Conclusiones finales	42
Bibliografía	44
