

T.D.  
5/12



UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE MEDICINA

ESTUDIO DEL MANTO LIPIDO DE LA PIEL Y SUS  
MODIFICACIONES EN ALGUNAS ENFERMEDADES  
CUTANEAS Y BAJO LA ACCION DE JABONES Y DE-  
TERGENTES.

Tesis para optar al Grado de Doctor en  
Medicina y Cirugia.

Dirigida por el Profesor BERNARDO LOPEZ

A handwritten signature in dark ink, appearing to read "Ismael Sotillo Gago", written over a horizontal line.

ISMAEL SOTILLO GAGO  
Sevilla 1971

R. 10.595



D. BERNARDO LOPEZ MARTINEZ, Catedrático de DERMATOLOGIA MEDICO-QUIRURGICA, de la Facultad de Medicina de Sevilla :

Certifica que D. ISMAEL SOTILLO GAGO, ha realizado bajo mi dirección el Trabajo, "ESTUDIO DEL MANTO LIPIDO DE LA PIEL Y SUS MODIFICACIONES EN ALGUNAS ENFERMEDADES CUTANEAS Y BAJO LA ACCION DE JABONES Y DETERGENTES", como Tesis para obtener el grado de Doctor.

Sevilla 10 de Mayo de 1971

Habiendo realizado este trabajo, en la Cátedra de Dermatología y en el Instituto de la Grasa y sus Derivados, de Sevilla, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mi maestro, Prof. BERNARDO LOPEZ, al Dr. en Ciencias Químicas, EDUARDO VIDQUE PIZARRO, a cuyas dotes de investigador, conocimientos, magisterio y cariño, debo el desarrollo de este trabajo, y a su colaboradora Srta. MARIA DEL PILAR DE LA MAZA Y SAINZ DE LA FUENTE, Doctora en Ciencias Químicas, que con su valiosa ayuda supo siempre animarme en el logro de esta ilusión.

Agradezco de corazón al Instituto de la Grasa y sus Derivados, a todo su personal científico y colaboradores, su ayuda y simpatía en mi gestión.

ESTUDIO DEL MANTO LIPIDO DE LA PIEL

Y SUS MODIFICACIONES EN ALGUNAS EN-

FERMEDADES CUTANEAS Y BAJO LA ACCION

DE JABONES Y DETERGENTES.

I N D I C E

	Págs.
<u>INTRODUCCION</u> . . . . .	1 - 2
Recuerdo anatomo-fisiológico de los lípidos cutáneos. . . . .	3 - 23
Antecedentes . . . . .	24 - 28
Extracción de lípidos. Antecedentes . . . .	29 - 35
Métodos cromatográficos de análisis . . . .	36 - 46
 <u>PARTE EXPERIMENTAL</u>	
Aparatos y productos . . . . .	47 - 51
 <u>MÉTODOS</u>	
A. Obtención de los lípidos de la piel . .	52 - 53
B. Separación de los distintos componentes de los lípidos cutáneos . . . .	54 - 60
C. Obtención de los ésteres metílicos en general . . . . .	61 - 62
D. Estudio estructural de los triglicéridos. . . . . .	63 - 66
E. Método de determinación de lípidos en la piel mediante los ácidos hidroxámicos. . . . . .	67 - 68
 <u>RESULTADOS</u>	
A. Piel normal . . . . .	69 - 78
B. Psoriasis . . . . .	79 - 94

	Págs.
C. Seborrea . . . . .	95 - 104
D. Acné juvenil . . . . .	105 - 114
Cromatogramas . . . . .	115 - 121
E. Piel sometida a Jabones y Detergentes.	122 - 129
<u>CONCLUSIONES</u> . . . . .	131 - 134

BIBLIOGRAFIA

En este trabajo, nos proponemos hacer un estudio del manto lípido de la superficie cutánea y sus posibles variaciones en determinadas dermatosis en comparación con el manto lípido de la piel normal.

Las enfermedades a estudiar son :

- a) PSORIASIS
- b) SEBORREA PURA
- c) ACNE JUVENIL
- d) PIEL SOMETIDA A LAVADOS CON JABONES Y DETERGENTES.

Desconociendo la etiopatogenia de todos estos procesos, determinados trabajos realizados por algunos autores como WILKINSON (1), STRAUSS y KLIGMAN (2), nos han inducido al estudio del manto lípido de estas enfermedades.

Todos sabemos que en el PSORIASIS se ha debatido una posible alteración metabólica en el sentido de la existencia de un trastorno en las cifras de lipemia, por tanto, ¿ qué nos impide pensar que esta alteración pueda manifestarse en el manto lípido de las zonas afectadas?.

Igualmente se piensa, que los ácidos grasos libres



pudieran ser responsables de la aparición del Acné, manifestación ésta, de una seborrea pura en piel lampiña y que por tanto justifica nuestra preocupación por este tema.

Y por último, nos interesa sobremanera, observar la respuesta del manto lípido tras lavados con jabones y detergentes.

Hoy en día, en que la medicina del trabajo ocupa un lugar preeminente y dentro de ella los accidentes dermatológicos, no podía pasar desapercibido a nuestra atención el probable trastorno y recuperación del manto graso de la piel ante las agresiones externas con jabones y detergentes y su tiempo de recuperación.

Nuestros estudios han ido orientados a los siguientes puntos :

- a) Estudio de los ACIDOS GRASOS LIBRES en piel sana y en piel enferma de PSORIASIS, SEBORREA Y ACNE.
- b) Estudio de los ACIDOS GRASOS DE LOS TRIGLICERIDOS en piel enferma y piel sana de los mismos procesos.
- c) Estudio de la ESTRUCTURA DE LOS TRIGLICERIDOS, en piel sana y enferma de PSORIASIS Y SEBORREA.
- d) Estudio de la RECUPERACION DEL MANTO LIPIDO DE LA PIEL sometido a lavados con jabones y detergentes.

Los métodos de los que nos hemos valido para dichos estudios han sido: el Cromatográfico y el del Acido Hidroxámico, gracias a los cuales hemos podido realizarlos, ya que estos procedimientos no exigen grandes cantidades de lípidos, cuya extracción en la piel supone un auténtico problema.

## RECUERDO ANATOMO-FISIOLOGICO DE LOS LIPIDOS CUTANEOS.-

Los lípidos cutáneos podemos dividirlos en dos clases:

- a) Lípidos de constitución o de estructura.
- b) Lípidos de secreción.

Lípidos de estructura.- Estos lípidos se presentan en el tejido adiposo, la dermis y en las diferentes capas epidérmicas.

En ellos se engloban sustancias lipídicas intra y extracelulares que se acumulan particularmente en determinadas zonas, y en los lípidos fijos o lípidos de órganos que son verdaderos lípidos celulares y fuente particular de las estructuras celulares.

Debemos subrayar que los lípidos variables o de de pósito se metabolizan de forma diferente a los lípidos de los órganos; los primeros representan un cúmulo de reservas, mientras que los segundos representan o desempeñan una actividad metabólica del órgano considerado.

Cuantitativamente los primeros están sometidos a fluctuaciones esencialmente ligadas a la alimentación, mien tras que los segundos son prácticamente insensibles.

Los componentes de los lípidos constantes están o constituidos principalmente por fosfolípidos, cerebrósidos y otros complejos ligados al colesterol. Podemos admitir, que estos elementos son lípidos esenciales del protoplasma.

Es precisamente la capa epidérmica la que nos inte resa, Esta capa comprende un conjunto de filas diferencia- das y corresponde a la siguiente estructura :

Capa Basal.- Constituida por dos tipos de células, basales y melanocitos.

Las células basales presentan una forma cilíndrica y se ordenan con su eje mayor perpendicular a la línea que separa la epidermis de la dermis. Poseen un citoplasma muy basófilo y un núcleo oval o alargado hipercromático. Estas células están unidas entre sí y con las células espinosas mediante unos puentes intercelulares, los cuales no son tan patentes y visibles como los que se observan entre las células granulosas del cuerpo mucoso de Malpighio; pero es fácil de poner de manifiesto fijando con rapidez en líquido de Zenker y coloreándolo con hematoxilina fosfo-túngstica.

Los melanocitos, son de origen neural. Se colorean con la DOPA, 3,4-Dihidroxifenilalanina levogira y de ordinario con la impregnación argéntica. Se encuentran formando una especie de cuña entre las células basales de la epidermis. Teñidos los cortes con hematoxilina y eosina los melanocitos aparecen como células claras con un núcleo pequeño e hipercromático y un citoplasma transparente ligeramente basófilo. Teñidos de plata, aparecen como células dendríticas con numerosas prolongaciones, largas y ramificadas siempre y cuando exista una cantidad suficiente de gránulos de melanina en las mismas que sea capaz de señalar su forma.(3).

Cuerpo mucoso de Malpighio.- Las células del cuerpo mucoso, llamadas células escamosas o espinosas, son poligonales y forman un mosaico, aplanándose hacia la superficie. Dichas células están separadas por espacios que se

encuentran atravesados por puentes o espinas intercelulares. Cada uno de estos puentes, muestra cerca de su centro, un pequeño engrosamiento llamado nódulo de Bizzozero.

El examen en el microscopio de fases, revela en el citoplasma de las células basales y escamosas la presencia de múltiples tonofibrillas, las cuales constituyen una estructura tridimensional alrededor del núcleo y en forma radial hacia los bordes de las células. Las tonofibrillas contienen grupos sulfhidrilo y disulfuro y sus imágenes de difracción a los rayos X son las mismas presentadas por la queratina, lo cual sugiere que las tonofibrillas son precursoras de la queratina.

Capa granulosa.- Constituida por un espesor de una a tres células. Tienen forma de diamante tallado, y se encuentran repletas de granulaciones a las que UNNA denominó gránulos de queratohialina. Son gruesos, de forma y tamaño variables y muy basófilos. Esta capa es más gruesa en las áreas en las que la queratinización es más activa. En zonas paraqueratósicas por lo general no existe esta capa. No es bien conocida la naturaleza química y la función de estos gránulos de queratohialina.

La falta en ellos de grupos sulfhidrilos o disulfuros, autoriza a pensar que desempeñan un papel muy secundario en la queratinización. (3).

Estratum lucidum.- Se halla situado entre las capas granulosa y córnea. Es visible tan solo en la palma de la mano y en la planta del pie, donde está formado por dos o tres capas de células anucleadas, planas, de aspecto homogéneo o transparente. De aspecto refringente, la sustancia

que llena las células, da un aspecto de apariencia oleosa y se la denomina eleidina.

Capa córnea.- Su espesor varía de 0,02 mm a 0,5 mm. No es posible observar espacios intercelulares entre las células córneas, en cambio se hace visible cuando se les observa con el microscopio electrónico. En condiciones normales no se observan núcleos en esta capa.

Junto con el conocimiento de las capas epidérmicas, debemos recordar las glándulas sudoríparas, ecrinas y apocrinas, que aunque en pequeña cantidad dan lugar a eliminación de lípidos y las glándulas sebáceas que forman parte activa en la secreción lipídica de la piel.

Glándulas sebáceas.- Radican en cualquier parte de la piel excepto en la palma de la mano y en la planta del pie. Las glándulas sebáceas son alveolares, holocrinas o, lo que es lo mismo, carecen de luz y su secreción está formada por la descomposición de sus células. La secreción es evacuada a través de los conductos sebáceos, en el folículo pilosebáceo. Este, puede estar provisto de pelo o carecer de él.

El tamaño de las glándulas sebáceas varía a menudo en razón inversa del diámetro de los pelos de los cuales dependen; las glándulas mayores se hallan en las zonas donde el sistema piloso es muy escaso o atrófico, como ocurre en la frente y en la nariz.

La glándula sebácea se compone de varios lóbulos. Cada lóbulo tiene en su periferia una capa de células cúbicas muy basófilas, las células generativas. Todas las célu-

las situadas hacia el interior de la glándula muestran sus respectivos citoplasmas, dispuestos en una delicada red, cuyas mallas aparecen repletas de grasa, con predominio de grasa neutra. (3).

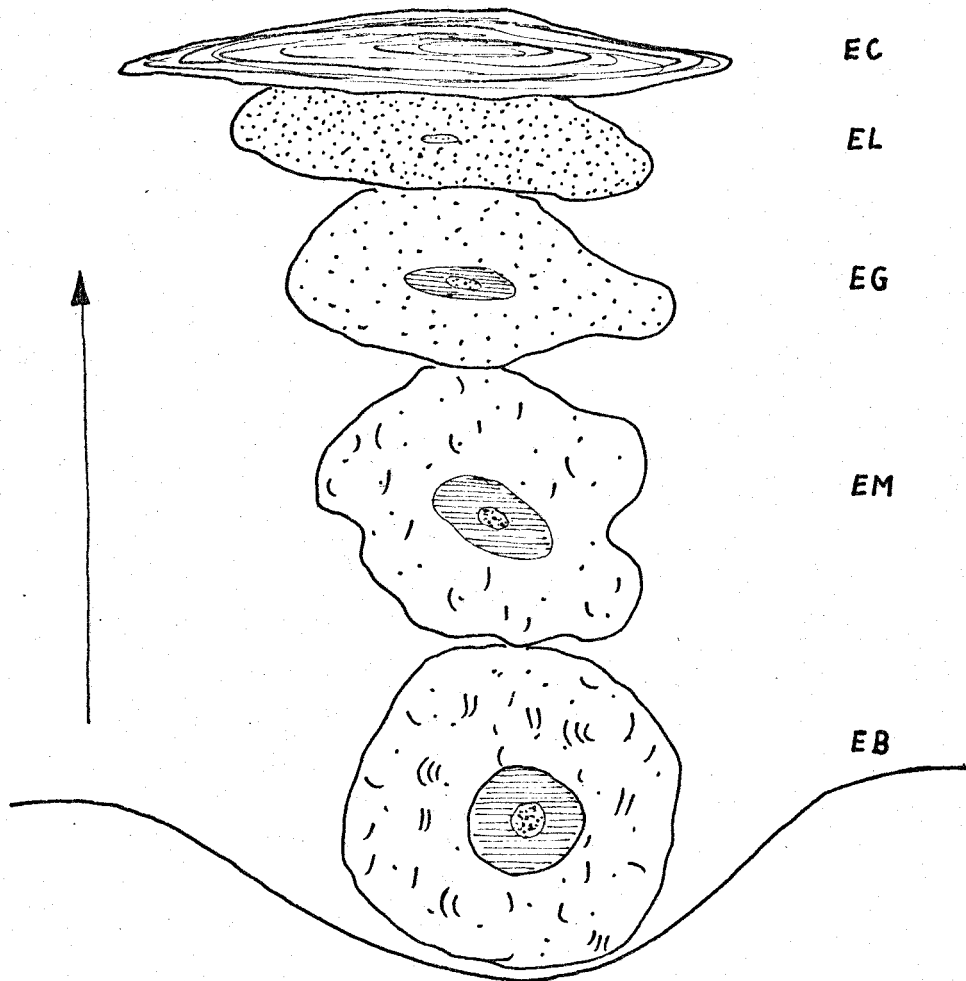
Debemos recordar, que la epidermis deriva del ectodermo, que no es otro que el primer tejido cutáneo del embrión;

La queratinización de las capas epidérmicas superficiales pasará por un estado de degeneración lipídica de las células ectodérmicas.

La descamación se manifiesta como células desprendidas con sebo secretado por las glándulas cutáneas constituyendo el vernix caseoso, recobrando así la superficie cutánea el aspecto de la piel del feto.

La capa córnea es la que más nos interesa. Está formada por 15 o 20 hileras de células muertas, aplastadas, cuyos núcleos están degenerados. Corresponde este fenómeno a la transformación biológica que sufren las células desde la capa basal, pasando por sucesivos pasos hasta llegar a las primeras filas, donde se disocian y eliminan continuamente por descamación, constituyendo el Stratum Disjunctum de los franceses.

Esta transformación de células nobles, ricas en agua (70%), en células degeneradas, pobres en agua (10-20%), destinadas a proteger nuestro cuerpo contra las influencias exteriores es un proceso notable, lento y continuo. Se necesita un mínimo de un mes en condiciones normales, para que una célula de la capa basal adquiera su plena madurez y se elimine por descamación. Este proceso "ascensional", podríamos representarlo por el esquema siguiente :



Esquema nº 1

Este esquema atribuido a MATOLTSY, nos da una idea de la evolución de las células diferenciadas hacia la queratinización. Los lípidos presentes en esta capa no están en estado estático, sino al contrario, existe un real movimiento lipídico demostrado por diversos investigadores.

SZAKALL (4) ha demostrado, que de una experiencia a otra, existían variaciones de los lípidos en las diferentes capas epidérmicas. Estos lípidos de las células queratinizadas no están constituidos por complejos inmutables y estacionarios, al contrario, están continuamente en movimiento y sumisos a las leyes fisiológicas del medio biológico al que están sometidas desde el nacimiento.

Las experiencias efectuadas por HERMAN, PROSE, SULZBERGER, KAUFMAN, BUDWIG, SZAKALL (4) y otros, han demostrado que la existencia de lípidos en la capa córnea disminuye desde la superficie hacia las capas más profundas, siendo su mayor contenido en las capas más superficiales de la misma. En medio de esta capa el contenido es casi nulo.

SZAKALL y BUCKUP(4), tienen la impresión de que los lípidos no atraviesan las capas celulares medianas, sin estar acumulados. Está demostrado, que durante la menstruación, los lípidos presentes en las diferentes capas, están en disminución sensible.

Algunos autores creen, que los ácidos grasos insaturados pueden intervenir como factores de unión entre las fibrillas queratinicas.

Se sabe que la queratina dura (procedente de los pelos), es pobre en lípidos, mientras que la queratina



blanda procedente de la epidermis (epidermina de RUDDALL) es relativamente rica en aquellos.

KOODYMAN (4), demuestra que la palma de la mano y planta del pié, que están desprovistas de glándulas sebáceas y de folículos pilosos, contienen colesterol no esterificado procedente de la capa basal y granulosa. Al contrario, en la capa córnea se encuentra colesterol esterificado en mayor proporción.

Las células epiteliales poseen la propiedad de sintetizar el colesterol y sus ésteres que proceden de otras partes y que se desarrollan paralelamente a la biosíntesis de la queratina.

De más sabemos, que durante la queratinización, los fosfolípidos se encuentran degradados y ciertos investigadores piensan que esta degradación comienza a realizarse en las tonofibrillas, donde nace la queratina, debiendo jugar un papel importante en los fenómenos de la queratogénesis.

El *stratum lucidum*, es considerado por algunos autores como una barrera para el paso de los lípidos de las capas profundas a la superficie, pero no en el sentido rígido de la palabra sino desde el punto de vista funcional.

No se puede considerar a los lípidos presentes en la superficie de la piel como de simples sub-productos desechados por las células nobles que se destruyen sistemáticamente o a medida que se realiza la queratinización.

BORODACH y MONTANGNA (4), demuestran que a pesar de las apariencias histológicas (aumento del espesor de la capa adiposa), los contenidos lipídicos serían fijos, constantes.

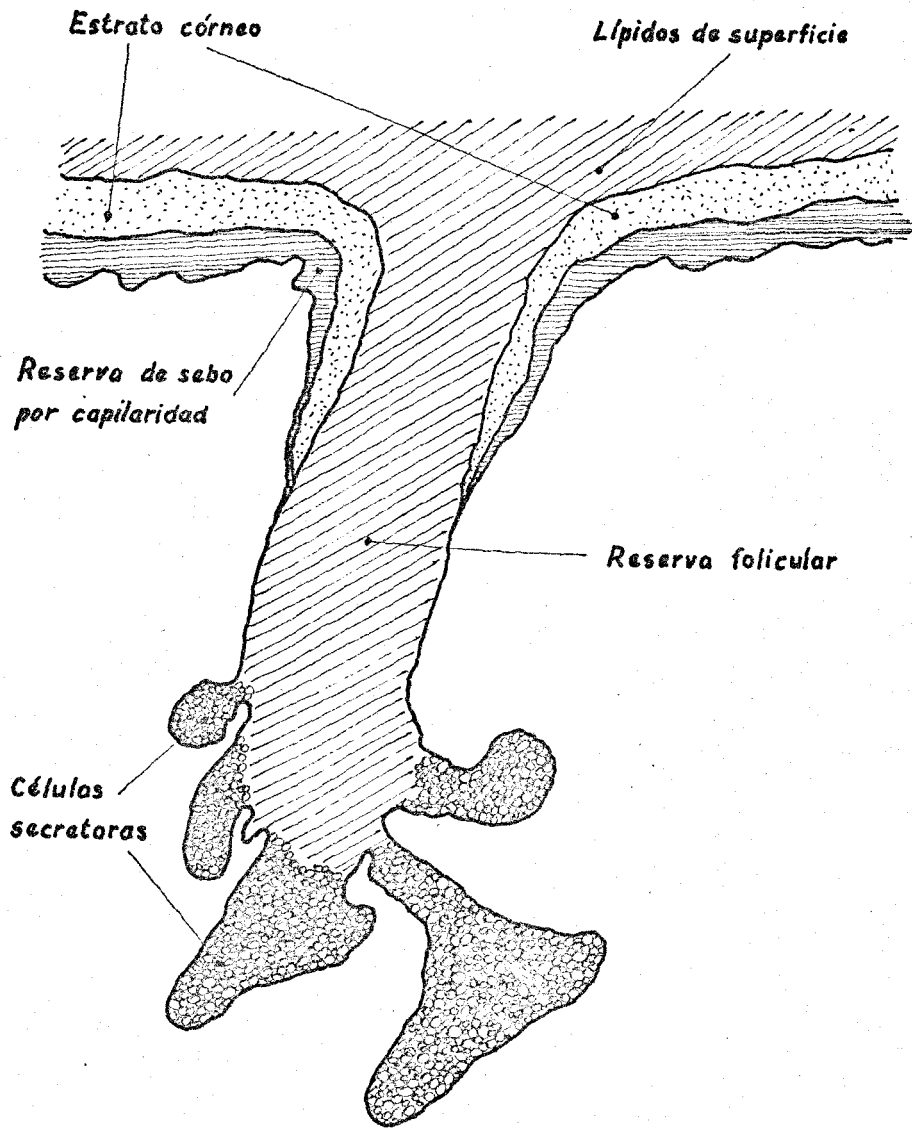
Lípidos de secreción.- Forman la película grasa presente en la superficie cutánea, y que proceden en parte de la ascensión progresiva de los lípidos del protoplasma celular destruido en el fenómeno de la queratogénesis, de los lípidos secretados por las glándulas sebáceas y en cierta medida del secretado por las glándulas sudoríparas.

No estamos aún bien preparados para conocer con precisión el mecanismo de acumulación y de síntesis de los lípidos a partir de la sangre misma; serían fenómenos de expulsión.

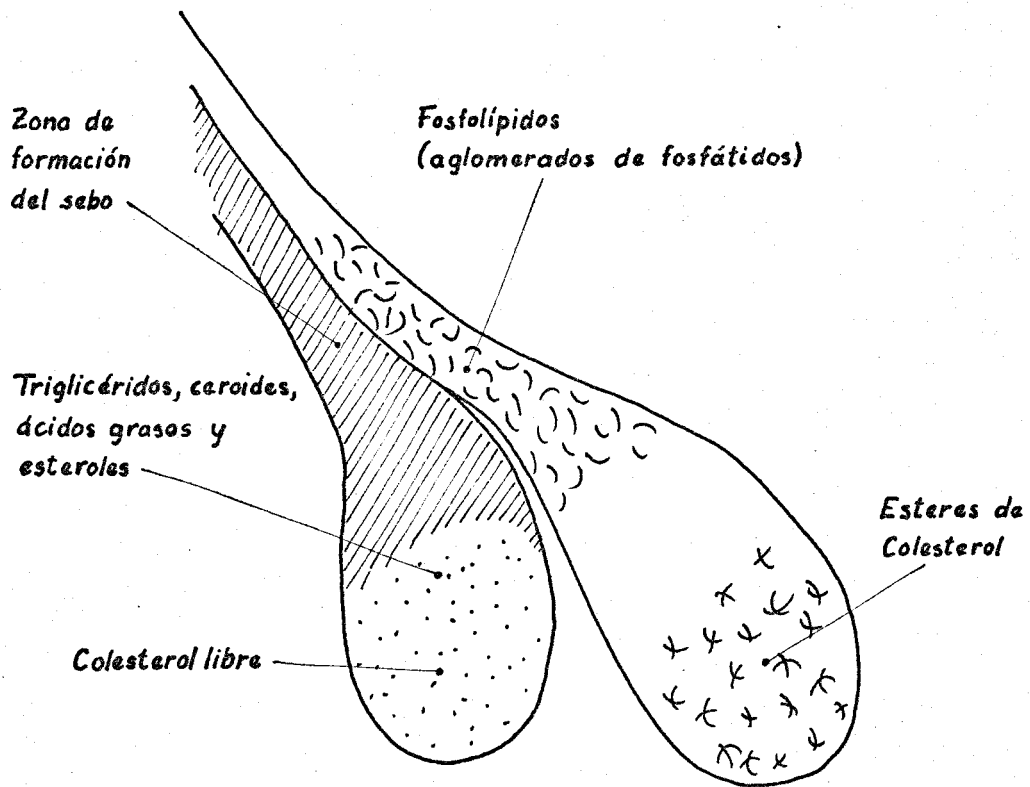
Vamos a dar una idea sobre la interferencia de las glándulas sebáceas en la fisiología y patología cutánea.

Recordamos que las glándulas sebáceas están formadas, por una parte secreticia, comprendiendo uno o muchos sacos, de dimensiones relativamente voluminosas y que pueden variar de 1 a 2 mm de diámetro. Y de un canal secretor, que desemboca frecuentemente en el canal piloso y a veces en la superficie de la piel.

La secreción lipídica que se excreta por el folículo piloso puede autooxidarse, dando lugar a la formación de los filamentos seborreicos que al endurecerse dan lugar al comedón, manifestación patológica de ciertas dermatosis.



Esquema nº 2



Esquema nº 3

Parece ser, que los lípidos son excretados por las glándulas sebáceas, se almacenen y cuando adquieren un cierto volumen, aumenta la presión intraglandular y son excretados por el canal secretor.

SHELLEY y KLIGMAN (4), opinan que la impregnación de las células córneas por capilaridad, es la responsable de este papel regulador. Otros autores creen, que las glándulas secretoras poli-sebáceas son incapaces de expulsar sebo a la superficie.

La secreción seboreica parece depender de ciertas influencias. Estas son :

- a) De la tasa de impregnación de la capa córnea.
- b) Del espesor de la capa lipídica.
- c) De la temperatura. Es más alta la secreción en verano que en invierno, por el hecho de la disminución de la viscosidad.
- d) De la interferencia de las hormonas endocrinas, principalmente en la pubertad y menopausia.
- e) De los centros reguladores del cerebro que ejercitan una acción frenadora. Así, las encefalitis producen aumento seboreico.

BRUN (4) señala, que en la mujer gestante se produce una disminución de la película lipídica a medida que avanza el embarazo en determinadas zonas cutáneas, como la dorsal.

Se han señalado ciertos test para medir la actividad de las glándulas sebáceas. Así :

El ácido ósmico bajo la forma de vapor permite poner en evidencia los lípidos cutáneos que hayan impregnado un papel. Este ensayo no es específico de los lípidos, pero se diferencia de la acción de otras sustancias por la rapidez de la revelación; así los ácidos grasos insaturados son revelados en primer lugar.

El antraceno permite obtener un test rápido. Se trata simplemente de impregnar un papel de filtro con una solución etérea de esta sustancia a una concentración de 5 por mil; se seca el papel y se aplica sobre la piel. Se presenta el papel a la luz de Wood y se observa una fluorescencia intensa que está ausente de las partes que contienen lípidos.

Constitución de los lípidos cutáneos.- Como puede suponerse, el estudio de la constitución de los lípidos cutáneos ha sido objeto de múltiples investigaciones con el fin de conocer las variaciones de los componentes en función de la edad, del sexo y principalmente en función de las anomalías patológicas ligadas al disfuncionamiento de las glándulas sebáceas.

Ante todo, es preciso señalar toda la importancia de los métodos y de las condiciones de deducciones, de las cuales van a depender los resultados definitivos.

Así, por ejemplo, HERMAN y PROSE (4), han demostrado que la suma de valores obtenidos después de cuatro extracciones, distantes media hora unas de otras, era más importante que el valor obtenido por una sola extracción

al cabo de dos horas. Así, cuanto más se limpia de sebo la superficie cutánea, más secreción se produce.

Esta cantidad de sebo obtenida por cuatro extracciones repetidas, es llamada por estos autores, Nivel accidental, y se ha comprobado que luego de las extracciones efectuadas la cantidad de sebo secretado cesa de aumentar para quedar constante.

Así pues, tenemos dos tipos de deducciones lipídicas: Extracción en muchas veces y se determinará el Nivel accidental, o bien la extracción en una sola vez y se determinará el Nivel de retención.

En los trabajos de MCKENNA, WHEATHLEY y WORMALL (14), se observan los siguientes lípidos con sus respectivos porcentajes.

Acidos insaturados libres . . . . .	20
Acidos saturados libres . . . . .	10
Triglicéridos . . . . .	25
Esteres de ácidos grasos . . . . .	25
Colesterol . . . . .	5
Hidrocarburos . . . . .	15

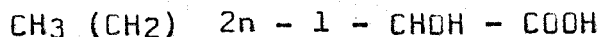
NICOLAIDES y ROTHMAN (15), demuestran los constituyentes lipídicos en la piel del antebrazo del hombre con sus porcentajes .

Acidos grasos libres . . . . .	30
Triglicéridos . . . . .	32,5
Ceras . . . . .	10,7
Esteres de colesterol . . . . .	4,3
Colesterol libre . . . . .	2,5
Escualeno . . . . .	5
Parafina . . . . .	7,5

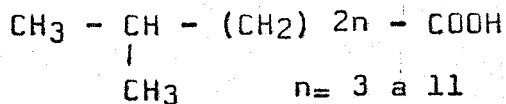
Como puede observarse, los ácidos grasos libres son los elementos predominantes sobre los cuales parece útil atraer nuestra atención. Cuando se habla de ácidos grasos libres, no debemos incluir solamente los ácidos saturados o insaturados del tipo clásico como los ácidos esteárico, palmítico, oleico, linoleico, etc., pues WEITHAMP, ROTHMAN, SMILGANIC y SHAPIRO (4), han puesto en evidencia en la grasa del pelo otros ácidos grasos más complejos que contienen grupos hidroxilo y metilo de la serie iso o ante-iso.

La estructura general de estos ácidos grasos pueden ser :

- a) De los ácidos alfa-hidroxilos en C12 y C14

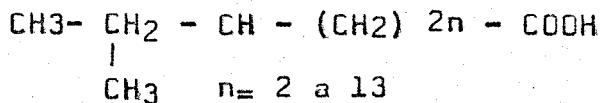


- b) De los ácidos ramificados iso, portan un grupo metilo sobre el penúltimo carbono de la cadena, de C10 a C26





c) De los ácidos ante-iso, ácidos ramificados de C<sub>9</sub> a C<sub>13</sub> portan un grupo metilo sobre el carbono antepenúltimo :



Precisamos que WEITKAMP pudo detectar cuatro series homólogas representativas en total de 32 ácidos. Esto nos da idea de la complejidad de los ácidos grasos presentes en la superficie de la piel, y por ello debe representar a fisiólogos y bioquímicos auténticos problemas en el estudio de la queratogénesis. (4)

Funciones de los lípidos cutáneos. - Veamos las funciones desglásadas de los lípidos de la epidermis y de los lípidos de las glándulas sebáceas.

Lípidos de la epidermis ; En la epidermis, la capa germinativa es el sitio de la actividad mitótica y los lípidos deben ser sintetizados para todas las membranas nuevas.

La energía para esta síntesis se deriva de la glucosa circulante por los capilares de la epidermis. Los compuestos celulares empiezan a degradarse cuando las células empiezan a sufrir la queratinización.

Los lípidos de estas células también son degradados y parece que son utilizados como una fuente de energía cuando las células se alejan de la capa basal donde tenían su nutrición.

Evidencia de ello son los estudios de respiración realizados, donde se demuestra que la glucosa y las proteínas no pueden consumir todo el oxígeno empleado. Esto aclara la utilización de los lípidos.

Está demostrado, y más después de las experiencias de LINKE, que los ácidos grasos presentes en el manto grasoso cutáneo, varían cualitativamente y cuantitativamente en función de la edad, de la capacidad de reproducción de las glándulas sebáceas y de las zonas corporales consideradas. Estas variaciones son excepcionales entre los 20-70 años; por contra, aumenta en la edad puberal el índice de los ácidos grasos. (6).

Lípidos de las glándulas sebáceas: Los lípidos que constituyen el sebo de un animal, pueden encontrarse en forma de un aceite líquido o de una cera semisólida a la temperatura del organismo. El escualeno y los triglicéridos bajan el punto de fusión, mientras que la saturación de los enlaces cis lo suben.

Los diésteres de cadenas grasas con dos grupos funcionales, por ejemplo, los ácidos grasos hidroxí pueden elevar el punto de fusión por encima de los ésteres simples.

Las glándulas sebáceas tienen una variedad de medios para preparar una superficie oleosa o cerácea, por el empleo de tales modificaciones como la saturación, no saturación, ramificación, cadenas rectas y de uno a tres grupos de ésteres en la molécula como en un simple éster de cera o éster de esterol, un diéster de cera o un triglicérido.

Los lípidos de diferentes glándulas sebáceas se diferencian entre sí; por ejemplo, los lípidos extraídos de las glándulas sebáceas largas de la nariz y de la mejilla tienen muchos menos triglicéridos y muchos más ácidos libres que aquellos de la superficie del cuero cabelludo. Esta puede ser la causa de la exposición del sebo en ductus más largos a la acción de la lipasa.

Los lípidos de la glándula de Meibomio se diferencian todavía más. Una mezcla de éter de cera y éster de esterol, constituye las 3/4 partes de esta excreción sebácea, además de que tienen poco escualeno y triglicéridos.

Esta mezcla es semisólida en comparación con el sebo que es oleoso a la temperatura del organismo. (6).

La superficie cutánea, puede ser acuosa, oleosa o cerácea.

Una superficie acuosa es una superficie donde hay mucha fricción. Las palmas de las manos y las plantas de los pies tienen un estrato córneo grueso, un rico contenido en glándulas sudoríparas y esto hace que sean estas superficies muy acuosas.

Una superficie oleosa, se encuentra en área donde dos superficies se contactan, por ejemplo, la axila y la región anogenital.

Una superficie cerácea, es conveniente en áreas donde necesitan de ser protegidas del agua; así es el caso de la cera semisólida producida por las glándulas de Meibomio, que ayudan a mantener la humedad de los ojos durante el sueño.



Algunos lípidos sufren reacciones en la superficie cutánea.

El escualeno forma pequeñas cantidades de una variedad de unas preparaciones oxidadas muy complejas.

Los ácidos grasos no saturados pueden ser oxidados; sin embargo los lípidos cutáneos superficiales son estables. Además el número de ácidos grasos encontrados en la superficie cutánea aumenta con el tiempo y la microfiora existente en la superficie cutánea podría ayudar en este proceso, además de que puede cambiar a otros constituyentes y añadir algo de sus productos a los lípidos de la superficie cutánea. (6).

NICOLAIDES y ROTHMAN, en análisis efectuados sobre el sebum de hombres y mujeres adultos, demuestran :

Que los ácidos grasos totales están más elevados en las mujeres que en los hombres.

Las personas en edad de pubertad, presentan un contenido netamente inferior que en los adultos.

El contenido en hidrocarburos es más elevado en los jóvenes de 6 a 12 años que en los adultos, y aún menos en la mujer.

El contenido en colesterol libre es más elevado en la infancia que en los adultos.

En el niño, los ácidos grasos ramificados representarían aproximadamente un contenido del 50% inferior que en los adultos. La cantidad de escualeno, es más débil en el niño que en el adulto de ambo sexo.

Los lípidos juegan un papel de primer plano en numerosas reacciones metabólicas de la piel. En las diferentes capas celulares se efectúa el fenómeno de colesterinogénesis, y puede afirmarse que tras el hígado, la piel es el órgano más importante en la sintetización del colesterol. Este aumenta con la edad y más en el hombre que en la mujer.

Es interesante saber la relación existente entre el colesterol libre y el colesterol esterificado.

COLLINS señala, la abundante cantidad de colesterol libre hidrófilo en la dermis, por la gran cantidad de agua existente en la sustancia fundamental, y parece ser que tendría un gran papel regulador con la salida de agua al manto lípido en el que encontraríamos el colesterol libre hidrófobo o esterificado. (4).

Entre la dermis y la capa córnea se observa un aumento de colesterol esterificado a medida que nos acercamos a la superficie. Esta proporción entre el colesterol libre y el esterificado constituiría una barrera funcional, llamada por REIN, barrera electrofisiológica, y fué estudiada por BLANK tras sus experimentaciones sobre la deshidratación de la capa córnea.

Es necesario saber, las fluctuaciones existentes en los fosfolípidos que por sus propiedades emulsionantes desarrollan un gran papel en la regulación hídrica de la piel, y por lo tanto en el estrato córneo. (4).

Vemos por tanto, el gran problema que representa para su estudio el manto lípido de la piel, y que todavía existen puntos confusos en la estabilidad fisiológica de la piel y del cabello.

Se conoce el efecto antagónico existente entre los peróxidos lipídicos y los grupos sulfidrilo de una parte, y los sistemas enzimáticos indispensables de otra, sistemas necesarios al proceso de queratinización.

SCHNEIDER y SCHULLIET, han demostrado que la capa lipídica favorecería la maleabilidad de la piel. Se puede decir como resumen en la fisiología de los lípidos de la piel, que juegan un papel protector nada despreciable y que debe tenerse en cuenta no perturbarle, para mantener una estabilidad fisiológica de la superficie cutánea. (6).

ANTECEDENTES.-

Desde que en 1910, E. SALKOWSKY demostró la existencia de palmitato de colesteroína en la grasa de la piel, la investigación no ha cesado en el estudio de la misma, para su perfecto conocimiento, no solo en el aspecto cuantitativo sino en el cualitativo.

En 1946, se investigaron más a fondo los lípidos de la grasa de la piel y así G.N. FESTENSTEIN y R.A. MORTON, así como R.M.B. MAC KENNA y sus colaboradores encontraron que juntamente con la colesteroína y otras sustancias análogas a la estearina, existían pequeñas cantidades de alfa-tocoferol. (.7).

E. BROUWER y NIJKAMP, identificaron ácidos grasos volátiles de C<sub>2</sub> a C<sub>6</sub>, así como ácidos C<sub>8</sub> y C<sub>10</sub> en la segregación de la piel de seres humanos, caballos, borregos, perros y conejos. (.8)

A.T. JAMES y V.R. WHEATLEY, descubrieron ácidos grasos saturados de cadena ramificada impar. No obstante la mayor parte la constituían ácidos grasos sin saturar con longitudes de cadena de C<sub>14</sub>, C<sub>16</sub>, y C<sub>18</sub>. (.8).

WHEATLEY, determinó escualeno en la piel de forma cuantitativa mediante sistemas yodométricos. (.8).

N. NICOLAIDES y colaboradores, establecieron que los lípidos de la piel contienen de un 25% a un 35% de ácidos grasos libres, de un 28 a un 40% de ácidos grasos esterificados ( en forma de triglicéridos, ceras, ésteres de colesteroína); de un 8% a un 13% de escualeno; de un 9% aun

12% de alcoholes de cera y de un 2% a un 4% de colesteroína libre. (9).

D.B. WINDHORST y FOSTER, encontraron en hombres con poco desarrollo capilar, menores cantidades de grasa general, colesteroína libre y esterificada, que en los que tenían un desarrollo capilar normal. En mujeres estaban las proporciones a la inversa. (10).

SOBEL y colaboradores, hallaron más escualeno en la grasa de la piel de enfermos con carcinoma de células basales y menos en caso de carcinoma epidermoide. (11).

E. WALTER, extrajo grasa de la piel en ropas sucias y halló lauril, miristil, palmitil y estearil. (12).

Igualmente podríamos enumerar los innumerables estudios realizados con el cabello, entre los que destacan los hallazgos de WEITKAMP y colaboradores, que encuentran ácidos grasos saturados y sin saturar entre C7 y C22.

También BROWN encuentra en los lípidos del cabello, utilizando la espectrografía de masas, grandes cantidades de alcoholes de cera. (13).

HAATI y T. NIKKARI, demuestran en la grasa de la piel de la región torácica, extraída con acetona y en estudio cromatográfico, la existencia de parafinas, escualeno, ceras, esterés de esterol, triglicéridos, esterol libre; al mismo tiempo realiza una separación de las ceras y esterés de esterol en placa de óxido de aluminio G, resultando : escualeno, ceras y esterés de esterol. (14).



ESBEN KIRK, demuestra la misma secreción sebácea durante 12 horas, en una serie de individuos cuyas edades oscilaban entre los 12 y 70 años; mientras que en la mujer encuentra una disminución de la grasa con respecto al hombre, comprueba posteriormente que en el hombre aumenta con forme avanza en edad.

La secreción de colesterol era parecida entre los dos sexos, pero con menos diferencia en la eliminación total. (15).

Posteriormente ESBEN, IVERSEN y VIDEBAEK, hacen una investigación sobre la eliminación lipídica en la frente y dorso de las manos en una serie de hombres y mujeres, demostrando que en la frente existían menos lípidos en la mujer que en el hombre, mientras que en el dorso de la mano era más abundante que en el hombre. (16).

DAVID I. WILKINSON, realiza unos estudios en este sentido en la enfermedad de psoriasis. Extrae los lípidos con acetona, los colecciona a intervalos de tiempo y observa una variación considerable en los constituyentes de los lípidos, particularmente de triglicéridos y ácidos grasos libres. Esto resulta difícil de explicar por los conceptos corrientes de la biogénesis de los lípidos cutáneos. No observó aumento de otros componentes como los esteroides libres y ácidos no saturados. (16).

El mismo autor con FARBER, estudian los lípidos de antebrazo y palma de la mano en sujetos no psoriásicos, en particular haciendo referencia a la cantidad de ácidos grasos libres (FFA) y la composición total de los ácidos grasos.

Estudios anteriores en este sentido no observaban diferencias, si bien el nivel casual de los lípidos puede conducir a resultados erróneos. (17).

GARA, ESTRADA, ROTHMAN y LORINZ, estudian la capacidad esterificadora del colesterol de la superficie cutánea en una serie de psoriásicos y no psoriásicos. Lo realizan mediante la aplicación de un sistema radiactivo, aplicando un microcurio de  $C_{14}$  con ácido palmítico en una superficie de  $300 \text{ cm}^2$  de piel normal y tras 2,5 horas practicaban la extracción de los lípidos. En individuos psoriásicos solamente se encuentra la décima parte de la radiactividad que existía en personas normales. (18).

NIKKARI y HAAHTI, en el terreno experimental, estudian los lípidos de la piel de la rata, introduciendo en acetona el animal luego de un lavado con éter. Una vez <sup>2</sup>preparado el extracto, se cromatografió y se obtuvieron ácidos grasos hasta el  $C_{34}$ . (19).

Otra comunicación de estos autores, trata de la separación de los ésteres de esterol en placa de Nitrato de plata-silica gel, comparando la piel con el suero del mismo enfermo o sano, encontrando ciertas diferencias en los ácidos grasos del total de los ésteres-esteroles. Existían diglicéridos en el suero y no en la piel.

KIRK realiza experiencias que nos interesan para el estudio de los lípidos tras lavados con detergentes, demostrando la reducción de los lípidos a los 20 minutos del lavado e incluso una reducción mantenida largo tiempo después de la experiencia. (20).

Realiza este autor junto a EFFERSVE, otra experiencia pero tras lavados con jabones, de la superficie cutánea de la frente, y tras una semana de extracciones lipídicas, no observa gran diferencia. (20).

Por último, destacamos las experiencias realizadas en 1960 por STRAUSS y KLIGMAN, y posteriormente en 1965 por los mismos autores, donde demuestran que los ácidos grasos libres, y sobre todo los de cadena corta hasta el C14 (mirístico) serían los responsables del acné, es decir serían acneígenos.

EXTRACCION DE LOS LIPIDOS CUTANEOS : ANTECEDENTES.-

Los lípidos de la superficie cutánea provienen del sebo de las glándulas sebáceas, de las células que sufren el proceso de queratinización y de las glándulas apocri--nas y ecrinas.

Su extracción y colección son un serio problema por diversos factores que van a influir en su conservación. Así, las lipasas y otros enzimas de la superficie cutánea y la microflora folicular pueden modificar los lípidos cu--táneos.

Algunos enzimas endógenos, como las esterases, den--tro del ductus glandular y del folículo piloso pueden ac--tuar sobre los lípidos de las glándulas sebáceas antes de que lleguen a la superficie cutánea.

En el organismo humano hay áreas con diferentes can--tidades de lípidos cutáneos y esta variación depende del número de glándulas y tamaño de las mismas.

La actividad metabólica de las bacterias sobre la piel, constituye un gran problema para el estudio de los lípidos cutáneos; por ello la extracción debe realizarse bajo condiciones estériles.

Estos factores ya tienen su gran influencia en el estudio de los lípidos cutáneos en cantidades suficientes para su estudio y análisis, que gracias a la cromatogra--fía de gases, esta dificultad ha sido superada.

Otro problema a tener en cuenta es el solvente u--sado para la extracción "in vivo" de los lípidos de la

piel, constituyendo una severa limitación en el análisis de los mismos.

Solventes no polares, tal como Hexano, Pentano, Eter de petróleo, mueven relativamente lípidos no polares, pero fallan en la extracción de los lípidos polares.

Los lípidos polares pueden ser extraídos con una combinación de cloroformo/metanol en la proporción de 2 a 1 de volumen, pero este solvente es muy irritativo y puede causar daño y destrucción en la piel intacta.

También podemos emplear el eter dietílico.

La combinación de cloroformo/metanol, es la ideal para la extracción de los lípidos cutáneos "in vitro" en la proporción de 2 a 1 .

#### MÉTODOS PARA LA EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS DE LA PIEL.-

Muchos son los métodos a emplear para la extracción de los lípidos de la superficie cutánea. Haremos una revisión de los diversos métodos empleados según el origen de los lípidos. Así, veremos métodos para la obtención de lípidos de la superficie cutánea, métodos para lípidos ductales, para lípidos de las glándulas sebáceas, para los lípidos de la epidermis y para los lípidos de la dermis.

##### a) Obtención de lípidos de la superficie cutánea:

Se extraen con un solvente de lípidos.

a-1. Métodos de copa: Consiste en aplicar sobre un área determinada de la piel un cilindro de cristal, abierto por ambos extremos. Se le añade una

determinada cantidad de solvente, se mantiene durante cierto tiempo y se extrae mediante una pipeta. (18)

Una variedad de este sistema es el empleado por el Profesor Bernardo López, que a su vez modifica el método propuesto por MARCHIONINI.

No es más que un dializado de la superficie cutánea con cloroformo. Sobre la superficie de la piel de la cara anterior del antebrazo coloca un embudo de 5 cm de diámetro mayor, sujeto a la piel por medio de una cinta elástica. Se colocan en su interior 10 c.c. de cloroformo purísimo, se mantiene durante 3 minutos, tiempo máximo que toleran los enfermos y se agita mientras tanto con una varilla de vidrio. Posteriormente se extrae el solvente. (21)

WILKINSON, a su primitivo sistema por el que obtenía los lípidos bañando el antebrazo y palma de mano con 200 c.c. de acetona, introduce o adopta el sistema de copa en la palma de la mano, empleando un cilindro de 5 cm de diámetro y capacidad de 500 ml, le añade 30 ml, lo invierte en la zona a extraer y lo mantiene durante 3 segundos. (22)

HAATI y NIKKARI, lavan la superficie cutánea de la región torácica con acetona, cinco horas después de lavada la región cutánea con un detergente neutro. (23)

a-2.- Fregado de la piel, con bolas de algodón impregnadas en un solvente.

a-3.- Inmersión de una extremidad, u otra zona en un solvente lipídico.

- a-4.- Por derrame libre, con acetona sobre la piel de la mitad superior de la espalda.
- a-5.- Extracción de la grasa del pelo, con solventes. Tiene un inconveniente que es la facilidad de contagio exógeno.
- a-6.- En animales de experimentación, por ejemplo, en la rata se hace la siguiente forma; se sumerge al animal entero en un solvente. Los animales se mantienen en cajas cerradas para reducir la contaminación. Se anestesian con éter y las patas, cola y región anal se lavan con acetona. El animal se introduce en 350 ml de acetona durante 1 minuto, con las orejas y boca mantenidas por encima de la superficie del solvente. Se obtenían así, de 130 a 170 mg por kilo y día. (6).

- b).- Extracción de lípidos adsorbidos con papel de filtro, o con papel de cigarrillos o tejido.

Este sistema ha sido muy empleado, y consiste en cortar papeles en cuadrados de 2 cm de lado. Se suelen aplicar en la piel de la frente. Estos cuadrados de papel se sujetan con el maguito de un esfigmomanómetro para mantenerlos a presión constante. Se mantienen los papeles durante 2 minutos. Este método es más bien para valoración cuantitativa. (24).

- c).- Por ablación de las glándulas sebáceas, usado sobre animales.

b) Obtención de lípidos ductales : Se extren canalizando los ductus glandulares con micro-cánulas de acero inoxidable. Procedimiento fracasado por la composición viscosa y semi-líquida de la materia lípida en la glándula sebácea. (6)

c) Obtención de lípidos de glándulas sebáceas:

Se obtienen tanto en el hombre como en el animal.

c-1.- Se utiliza el cuero cabelludo por ser muy rico en glándulas sebáceas. Se obtienen alrededor de 10 mg por glándula sebácea.

c-2.- Obtención de las glándulas de Meibomio, haciendo presión del párpado contra un porta, e introduciendo la materia obtenida en un solvente.

c-3.- De la glándula prepucial del ratón . Se extrae completa. Se utiliza para el estudio in vitro de la lipogénesis.

c-4.- De la glándula de la pluma del ganso. Se localizan en la base de la cola y miden unos 3 cm de longitud. (6).

d) Obtención de lípidos de la epidermis:

d-1.- De la epidermis total: Se han empleado muchas técnicas para la separación de la epidermis de la dermis. Tales como:

Por calor, por tratamiento químico con sales inorgánicas, por ácidos (tal como el acético)



y bases (HO NH<sub>4</sub>), por digestión con enzimas (de origen pancreático). Debemos cuidar la contaminación y por tanto evitarla.

BLANK, utiliza el queratotomo de [castroviejo] ya que el procedimiento de separación con técnicas histológicas es mucho mejor, obteniendo capas muy delgadas de piel (de 0,1 mm de espesor).

d-2.- Del estrato córneo : se utilizan cintas de celofán, pero con el inconveniente de que el celofán deja materia, que da lugar a un test de Lieberman-Burchard, intenso.

Se puede separar el estrato córneo, una vez separada la epidermis con amoníaco, o la separación del estrato córneo con cantaridina.

d-3.- Los lípidos de la epidermis viva, pueden ser extraídos, después de haber separado el estrato córneo, por el método de la tripsina diluida. (25).

e) Obtención de lípidos dérmicos : Se obtienen después de la separación epidérmica-dérmica, por los métodos descritos anteriormente, pero esta fracción tiene el inconveniente de contener glándulas sebáceas; pero una piel libre de glándulas sebáceas se puede obtener de la palma de la mano y planta del pie. [Este método se ha realizado en miembros amputados, necesitando de una serie de procedimientos químicos para conseguir la preparación y separación de los lípidos. (26)].

Como vemos los procedimientos de obtención de lípidos de la superficie cutánea son muy variados, cruentos e incruentos, todos difíciles de aplicar en la piel de los enfermos. Nosotros aplicamos un método que nos ha dado buenos resultados y que describiremos en el capítulo corres--pondiente.

### MÉTODOS CROMATOGRAFICOS DE ANALISIS.-

La cromatografía puede definirse como la técnica de separación de una mezcla de solutos, basándose esta separación en la diferente velocidad con que se mueven cada uno de los solutos a través de un medio poroso, arrastrados por un disolvente en movimiento.

El biólogo ruso TSWETT fue probablemente la primera persona que advirtió las posibilidades del método, allá por el año 1906. TSWETT utilizó una columna larga de vidrio, rellena de sulfato cálcico finamente dividido, -- provista de una llave en el extremo inferior. Este investigador indicó que cuando una mezcla de pigmentos verdes de plantas se pone en los altos de la columna y a continuación se agrega éter de petróleo, aparece una serie de bandas horizontales de colores distintos, que corresponden a cada uno de los pigmentos de la mezcla y que indican que ha habido una separación a lo largo de la columna. Para describir este color, se introdujo el término de cromatografía, que literalmente quiere decir "escribir en color".

Esta separación no tiene que ver nada con el color de los compuestos, sino con la diferente afinidad de adsorción de los pigmentos hacia el yeso; así, los que se adsorben más débilmente avanzan con más rapidez a lo largo de la columna que los que lo hacen con mayor fuerza. Este experimento fué, sin duda, la primera aplicación de una columna de adsorción cromatográfica. Aunque TSWETT investigó este fenómeno, posteriormente quedó relegado a una mera curiosidad de laboratorio, hasta que MARTIN y SYNGE intro-

ducen la cromatografía de reparto. Los medios usados en estas columnas contienen una cierta cantidad de agua y las separaciones que en ellas se llevan a cabo dependen de la distribución continua o coeficiente de reparto de los componentes de la mezcla a separar entre el agua de la columna y el disolvente que fluye continuamente hacia la parte inferior.

Las separaciones por cromatografía de reparto son particularmente interesantes para los compuestos solubles en agua. Debido a esto, es por lo que este método ha alcanzado tanta importancia en la separación de sustancias de origen biológico.

Con columnas de relleno es, sin embargo, muy difícil obtener una identificación formal con cantidades muy pequeñas de las sustancias a separar, y posteriormente, en 1944, GONSDEN, GORDON y MARTIN describieron la cromatografía de papel, en la que las separaciones se llevan a cabo (principalmente por reparto) sobre tiras, en un sistema de columna abierta. Con la cromatografía de papel pueden ser detectados e identificados de manera segura cantidades del orden de microgramos de las mayorías de los compuestos.

Posteriormente, se introdujo la cromatografía de capa fina, de la que ya en el año 1938 IZMAILOV y SHRAIBER habían descrito su principio. En ésta, las separaciones se realizan en un material soportado sobre placas de vidrio. Este método, no obtuvo aplicación universal hasta que STAHL generalizó el procedimiento e indicó sus aplicaciones en el año de 1958.

Las ventajas más importantes de la cromatografía de capa fina son la excelente nitidez, alta sensibilidad

y gran rapidez. Alguna separación, que sobre papel necesita muchas horas, se logra en pocos minutos sobre una capa apropiada.

La última de las técnicas cromatográficas, la cromatografía de gases, fue el desarrollo lógico de la cromatografía en columnas, en las que un gas reemplaza al disolvente líquido. Debido a esto, las separaciones han de realizarse dentro de una columna cerrada. Es particularmente interesante para la separación de mezclas de gases, líquidos o sólidos volátiles, y sus aplicaciones se han desarrollado rápidamente desde que MARTIN y JAMES describieron sus primeros experimentos en 1952.

La cromatografía de capa fina, en la separación de sustancias lipófilas, es mucho más ventajosa que la cromatografía de papel.

#### TEORIA DE LA CROMATOGRAFIA.-

Las separaciones cromatográficas están basadas en un reparto múltiple o en un proceso de adsorción-desorción. La razón por la que es posible conseguir separaciones por cromatografía, en el caso de que fueran muy difíciles otros métodos, estriba en que, durante el paso a través del sistema cromatográfico, pequeñas diferencias en el coeficiente de reparto o en la adsorción-desorción de cada uno de los componentes se va multiplicando a lo largo de la columna. Cuanto mayor sea esta multiplicación, tanto mayor será la facilidad con que los componentes se separan y tanto mejor la resolución.

Siguiendo este criterio, se compara muy a menudo la cromatografía con la destilación fraccionada y se apli-

ca el concepto de plato teórico.

Un plato teórico es una unidad de la columna de destilación, en la que hay un equilibrio entre el vapor ascendente y el líquido que cae. Naturalmente a mayor número de platos, mayor es la eficacia de la columna de fraccionamiento.

De una manera análoga se puede considerar que un sistema cromatográfico está formado por una serie de tales platos, siendo cada uno una unidad del sistema en la que se establece el equilibrio entre las fases móvil y estacionaria.

La ventaja principal de la cromatografía es que se puede conseguir una alta eficacia debido al gran número de platos teóricos. Como en el sistema cromatográfico se establece el equilibrio muy rápidamente, se pueden llevar a cabo buenas separaciones en un tiempo muy corto.

Se pueden distinguir tres tipos de cromatografías: Cromatografía de reparto, cromatografía de adsorción y cromatografía de intercambio iónico. Esta división es más o menos arbitraria y no siempre se sabe qué fenómeno es el principal responsable en una separación dada.

La cromatografía de intercambio iónico no la describiremos por no haberla utilizado.

CROMATOGRAFIA DE REPARTO : Se lleva a cabo sobre tiras de papel de filtro, columnas y capas finas de polvo de celulosa, gel de sílice húmeda y polvo de diatomeas (kieselguhr y celita). En cada uno de estos casos el medio poroso sirve únicamente como soporte para el agua, la

cual actúa como un agente de reparto.

Distinguimos dos tipos de separación: Líquido-Líquido y Gas-Líquido, que son las más frecuentes.

Consideramos como ejemplo típico la separación de una mezcla de sustancias, sobre una tira de papel de filtro. Se sabe que el papel de filtro está formado por numerosas fibras de celulosa que portan un cierto porcentaje de humedad. Podemos considerar que las partes individuales de cada fibra, junto con su humedad asociada, constituyen hipotéticas "células" elementales.

La separación se lleva a cabo al repartirse las sustancias entre la humedad de las células y el flujo de disolvente sobre ellas.

El agua de las células permanece estacionaria, mientras que el disolvente circula sobre ellas. Debido a esto, a las células se las llama fase estacionaria, mientras que al disolvente se le denomina fase móvil.

En la cromatografía de reparto, el factor que influye en el movimiento de un compuesto a lo largo del papel es la solubilidad relativa de éste en la fase móvil y estacionaria.

Las sustancias que son solubles solo en el disolvente emigrarán a la misma velocidad que la parte frontal de este, mientras que las que son solamente solubles en agua, permanecerán en el origen de la cromatografía.

En la verdadera cromatografía sobre papel influyen otros factores sobre la velocidad de emigración, tal como la adsorción.

### CROMATOGRAFIA DE ADSORCION :

La adsorción es un fenómeno de superficie que consiste en el aumento de concentración de una sustancia en la superficie de un sólido (fase estacionaria) presente en el seno de la fase móvil.

No debemos confundir la adsorción con la absorción que es la penetración de una sustancia en el seno de otra.

La adsorción es un fenómeno físico que depende de una serie de fuerzas, tales como las de Van der Waals, puentes de hidrógeno o enlaces electrostáticos. El otro tipo de adsorción es la que recibe el nombre de intercambio iónico, en la que la separación se basa en el desplazamientos de los iones del medio por los de la muestras, seguida de una desorción selectiva que se lleva a cabo por otros iones.

Las separaciones de este tipo se pueden llevar a cabo en capas finas, columnas o tiras de papel, especialmente modificadas. No se puede aplicar a la cromatografía de gases, porque el intercambio solo puede tener lugar en el seno de un líquido.

Las separaciones por adsorción se basan en la existencia de un equilibrio entre las moléculas adsorbidas sobre la fase estacionaria y las que se mueven libremente en el disolvente. Si las moléculas de un compuesto, tienen afinidad por el adsorbente, se moverán lentamente, mientras que sin tienen otros componentes menor afinidad, lo hará más rápidamente. En este mecanismo se basa la separación.



Las diferencias en la separación de la cromatografía de gases y las otras formas de cromatografía de adsorción, en medio líquido, se indican por los nombres respectivos de cromatografía gas-sólido y líquido-líquido.

#### ADSORBENTES :

En la cromatografía de adsorción los sólidos más empleados son: el carbón activo, alúmina y otros óxidos metálicos, sales metálicas, gel de sílice y algunos hidratos de carbono especiales.

El método de preparación del adsorbente es muy importante si se quieren obtener resultados óptimos y reproducibles.

Pequeñas trazas de impurezas influyen mucho en la marcha de la cromatografía, principalmente por ocupar los centros en que la adsorción tiene lugar. Una de ellas es el agua.

Cuando un adsorbente tiene bloqueados algún centro activo, debe ser calentado, proceso que denominamos activación. Lo contrario se denomina desactivación. En cromatografía de gases la adición de sustancias para reducir la actividad se denomina envenenamiento, que tiene el mismo significado.

Algunos adsorbentes, cuando se desactivan con agua, actúan como magníficos agentes de reparto, y así se pueden llevar a cabo dos tipos de separación sobre el mismo medio. El mejor ejemplo, de esto, es la gel de sílice, que en estado activo se usa para separar compuestos insolubles en agua, tales como grasas, ceras y mezclas de pigmentos de plantas.

El estado físico del adsorbente es muy importante. Normalmente el tamaño de partícula ha de ser pequeño, para conseguir llegar al equilibrio más rápidamente y disminuir los efectos de difusión, pero no debe ser tan pequeña que impida el flujo del disolvente.

Por ello se tamizan los adsorbentes, para que las partículas más groseras sean eliminadas.

Es interesante considerar que el adsorbente, con su elevada superficie, actúa muy a menudo como un catalizador eficaz y puede en algunas circunstancias, llevar a cabo cambios químicos importantes en los componentes de una mezcla durante la separación.

#### CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.-

La cromatografía sobre papel es muy versátil y sus métodos se emplean con mucha frecuencia, pero su uso se limita a separaciones sobre celulosa, ya que otros medios adsorbentes, como alúmina y gel de sílice, no pueden prepararse en forma de tiras. Esta dificultad puede superarse fabricando capas finas de estas sustancias sobre placas de vidrio. Estas placas se denominan cromatoplasmas o placas simplemente.

Se usan dos tipos de capas: capa sólida, que se adhiere a la placa de vidrio por medio de un agente aglomerante incorporado al adsorbente o por cualidades adherentes del propio material, es la capa suelta.

La preparación de las placas, elección de disolvente, aplicación de las muestras sobre la placa, desarrollo de las mismas, conservación del cromatograma serán puntos

que desarrollaremos en nuestra parte experimental.

Otro sistema de cromatografía es el de columna, pero que no le describiremos por no haber sido utilizado por nosotros.

#### CROMATOGRAFIA DE GASES.-

Como su nombre indica, es particularmente apropiada para la separación de gases y líquidos volátiles o sólidos en estado gaseoso.

Una pequeña muestra del material a separar se inyecta en la corriente de un gas inerte, tal como nitrógeno, hidrógeno, dióxido de carbono, argón o helio, que corre hasta una columna que contiene un medio apropiado, capaz de ir retardando el flujo de manera gradual, de cada uno de los componentes individuales de la muestra que fluye a través de la columna.

Los compuestos separados emergen a intervalos discretos (característicos de cada componente) y pasan a través de algún tipo de detector. La diferencia en la adsorción o en el reparto sobre el material de la columna es el factor que hace posible la separación.

Como regla general, los análisis de gases se llevan a cabo en columna de absorción (cromatografía de gas-sólido), mientras que los líquidos y sólidos volátiles se cromatografían en columnas de reparto (cromatografía de gas-líquido).

La cromatografía de gases, aunque está basada en un concepto muy simple requiere un aparato y un control más complicado que en los casos anteriores.

### EL GAS PORTADOR:

Los gases que se emplean en esta cromatografía pueden adquirirse en estado puro, embotellados a presión.

Para obtener resultados óptimos es necesario secar el gas antes de su uso, pasándolo antes a través de los tubos que contienen un material conocido con el nombre de tamiz molecular.

Este tamiz elimina selectivamente el vapor de agua del gas. El anhídrido carbónico se prepara normalmente a partir de "hielo seco".

La elección del gas portador depende de la naturaleza de la muestra y del tipo de detector empleado. El hidrógeno y el helio se emplean particularmente cuando el tipo de detector usado está basado en la conductividad térmica (catarómetro), ya que ambos poseen una gran conductividad, lo que permite una rápida respuesta del detector. La velocidad del gas portador a través del aparato se controla por medio de una válvula especial y se mide con un aparato llamado "medidor de caudal".

Introducción de la muestra .- La cantidad de muestra a introducir depende del tamaño de la columna y del tipo de detector. Generalmente se utilizan muestras pequeñas. Los volúmenes varían entre 1 y 40 microlitros para gases y líquidos, y de miligramos (fracciones) para sólidos. Muestras mayores conducen a peores separaciones.

Las muestras de gases y líquidos se introducen en el gas portador con una microjeringa, mediante una aguja que atraviesa un tapón de goma que tiene el aparato.

Para introducir sólidos y líquidos viscosos se coloca la muestra en una ampolla de paredes finas que se rompe en el interior de la corriente del gas portador.

Otra solución consiste en disolver la muestra en un disolvente apropiado e introducirla en la columna de forma análoga a los líquidos normales.

El punto de inyección se calienta con una resistencia eléctrica o cualquier otro sistema, para conseguir que la muestra se evapore rápidamente al entrar en el aparato. Es suficiente una temperatura de unos 50° C por debajo del punto de ebullición del componente menos volátil. Con gases o muestras muy pequeñas la calefacción no es necesaria.



PARTE EXPERIMENTAL

APARATOS Y PRODUCTOS

A-1 .- APARATOS.

CROMATOGRAFO GASEOSO, de PERKIN-ELMER 11

Condiciones : Detector con llama de hidrógeno.  
Columna de 2 m por 0,3 cm; se llena con CHROMO-  
SORB W (80 - 100 mallas), impregnado al 2,5 %  
de E G S (etilenglicol-succinato).

Temperaturas: columna : 160 ° C

inyector y detector : 220 ° C

Flujos de gases: Gas portador (nitrógeno) 30 ml/  
minuto.

Hidrógeno, 2,5 ml/ minuto.

Aire, 300 ml/ minuto.

Registrador : HITACHI, PERKIN-ELMER, modelo 159

COLORIMETRO - SPECTRONIC 20, de la casa Bausch  
and Lomb.

APARATOS PARA PREPARACION DE PLACAS DE CAPA FINA :

DESAGA y SCHANDON

APARATO COLECTOR DE FRACCIONES

EVAPORADOR ROTATORIO A VACIO:

Büchi (Glasapparete Gabrik Flawil,  
Suiza ).



A-2 .- PRODUCTOS QUIMICOS UTILIZADOS.

ACETONA, para análisis.

BENCENO.

HEXANO: (para cromatografía).

Condiciones de obtención: Se agita durante 24 horas el hexano comercial con ácido sulfúrico de 61° Be, usando una cantidad aproximadamente igual a la décima parte del hexano; se pasa a un embudo de decantación y se lava con agua, después con permanganato potásico 0,1 N en 10 % de ácido sulfúrico; a continuación con permanganato potásico 0,1 N en sosa, y de nuevo con agua hasta reacción neutra. Se seca sobre cloruro cálcico y se destila en columna recogiendo la fracción que destila entre 66-70 ° C.

CLOROFORMO : ( para análisis) Condiciones,

Una vez destilado sobre columna de reflujo, se seca en cloruro cálcico durante un par de días; después de filtrar se destila nuevamente.

METANOL . Condiciones :

Se calienta a reflujo un litro de metanol, al que se le ha añadido 5 gr. de potasa y 12,5 gr de zinc en polvo, empleando una columna Vigreux, por lo menos durante un par de horas. A continuación se destila empleando la misma columna. El destilado se

guarda en frasco de tapón esmerilado.

ETER SULFURICO. Destilado sobre potasa en columna de reflujo.

ESCUALENO. Obtención a partir del aceite de oliva.

El escualeno, que hemos utilizado como patrón para la identificación del mismo en los lípidos de la piel, se ha obtenido del aceite de oliva, que es sabido lo contiene como componente principal del insaponificable.

Para ello se saponifican 10 gramos de aceite de oliva con potasa alcohólica al 5%, hirviendo a reflujo durante una hora. Una vez saponificado se añade agua - igual volumen que el se utilizó de potasa alcohólica y se extrae el insaponificable con dos extracciones en un embudo de extracciones, utilizando hexano para las mismas.

Los dos extractos se reúnen y lavan con agua, con objeto de eliminar las trazas de grasas que se hayan podido arrastrar en el hexano.

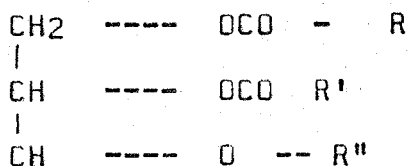
El insaponificable contiene además del escualeno, otro hidrocarburos, esteroides, alcoholes triterpénicos, etc. Para ello y para obtener el escualeno como patrón de la mayor pureza, el insaponificable una vez concentrada su solución a unos centímetros cúbicos, es cromatografiada en placa fina de Gel de Sílice G recién activadas, durante una hora a 110° C. Usado hexano como líquido de

de desarrollo se logra que el escualeno se sitúe en el frente del disolvente como ocurriría si las placas no estuviesen recién activadas.

La solución a cromatografiar se coloca en banda en la parte inferior de la placa. Después del desarrollo se coloca - tapando la placa excepto una banda lateral - en una cubeta conteniendo yodo sólido en el fondo. De esta forma en la parte no tapada de la placa se ve inmediatamente aparecer el escualeno, que al ser muy insaturado toma el yodo con gran rapidez e intensidad. La mancha visible de escualeno sirve de guía para localizar la banda de escualeno en el resto de la placa de donde se raspa y extrae en columnitas, como se indica en otro lugar.

GLICERIL-ETER-DIESTER. Obtención a partir del aceite de tiburón. (*Squalus acanthius*).

Como es sabido (26) el aceite de algunos escualos contiene el tipo de compuesto conocido con el nombre de gliceril-éter-diéster, de fórmula general :



Donde R, R' y R'' son radicales alquílicos normales en las sustancias grasas. Estos compuestos tienen una polaridad ligeramente inferior a la de los triglicéridos, pero la suficiente para separarse

de éstos en placas de gel de sílice. Por ello y con objeto de obtener aquellos compuestos como patrones, para posteriores estudios, se cromatografía el aceite de tiburón directamente, y se desarrolla con hexano-éter en la proporción de 9=1.

Puesto que las dos manchas fundamentales de este aceite serían los GLICERIL - ÉTER = DIESTERES y los TRIGLICERIDOS, introduciendo la placa tapada casi en su totalidad como se indicó anteriormente, fácilmente se localiza la mancha correspondiente al producto que nos interesa, que posteriormente es obtenido del resto de la placa.

TRIGLICERIDOS, de aceite de oliva.

ESTERES METILICOS, (patrones)

LIPASA PANCREATICA.

M E T O D O S

A.- OBTENCION DE LOS LIPIDOS DE LA PIEL.

Nuestro método de obtención de los lípidos de la piel, es una variante del método utilizado por WILKINSON, pero en el que hacemos la extracción con gran rapidez y buenos resultados.

En primer lugar, las zonas que deseamos utilizar las lavamos con acetona para ser limpiadas de grasa, restos de células, microflora etc., y así la mantenemos en el más absoluto reposo, libre de ropas y sin rozarse a nada, durante tres horas como mínimo, que es el tiempo que nos asegura una nueva y completa regeneración del manto lípido normal.

Utilizamos un tubo de unos 12 cm de longitud, con un diámetro de 2,9 cm y cerrado por uno de los lados o fondo. Tiene una capacidad aproximada de unos 30 c.c.

Como extractor de la grasa utilizamos la acetona purísima, magnífico solvente de los lípidos, que nos produce reacciones secundarias, todo lo contrario que el cloroformo que es frecuente produzca reacciones secundarias, como prurito, etc.

En el tubo incluimos unos 10 c.c. de acetona, lo aplicamos sobre la zona deseada, lo invertimos sobre la piel y así lo mantenemos unos segundos, bastan de 3 a 5.

Con ello, tomamos muestras de las zonas enfermas exclusivamente, evitando tomar de zonas sanas y afectadas simultáneamente.

Casi siempre la piel utilizada ha sido la de flexión del antebrazo, pero también hemos necesitado de otras zonas.

En el PSORIASIS hemos tomado de las mismas placas y zonas sanas cercanas.

En SEBORREA y ACNE, de la piel de la región interescapular e incluso de la frente.

En los LAVADOS CON DETERGENTES Y JABONES, la zona cutánea de ambos antebrazos.

Una vez hechas las extracciones que deseamos, las coleccionamos en un frasco o matraz perfectamente limpio y tapamos con tapón de goma, para no producir oxidación de los diversos componentes de la grasa cutánea y por tanto de transformación de los mismos. *Ver fig. 1*



Fig. 1

B.- SEPARACION DE LOS DISTINTOS COMPONENTES DE LOS LIPIDOS CUTANEOS.

1º . Pesamos una pera de cristal, en la cual vamos a reunir los lípidos.

2º . Evaporamos hasta sequedad en el evaporador rotativo.

3º . Una vez conseguida la evaporación volvemos a pesar, con ello obtenemos el peso de los lípidos totales extraídos.

4º . Conseguido ésto, vamos a separar los distintos constituyentes de los lípidos cutáneos, y para ello nos valemos de la cromatografía de capa fina.

PREPARACION DE LAS PLACAS : o capas separadoras. Las placas se preparan aplicando una capa uniforme del material apropiado (el adsorbente) en forma de una pasta acuosa muy fina sobre las placas de vidrio, por medio de un aparato especial. Es esencial para obtener óptimos resultados conseguir que las capas sean uniformes.

Existen diversos tipos de aparatos para extender las sustancias adsorbentes sobre las placas de vidrio.

Uno de los equipos más empleados es el de la casa DESAGA. La confección de las capas se realiza en tres etapas :



1. Colocación de las placas de vidrio y preparación del extendedor de capa. Las placas de vidrio tienen el siguiente tamaño: 20 por 20 cm; 20 por 10 cm y 20 por 5 cm.
2. Elaboración de una suspensión del material soporte y llenado del extendedor de capa.
3. Extensión de la masa sobre las placas de vi  
drio.

COLOCACION DE LAS PLACAS DE VIDRIO Y PREPARACION DEL EXTEN-  
DEDOR.

- a) limpiar correctamente las placas, deben quedar exentas de grasa (con detergentes).
- b) se lavan correctamente con agua destilada y des  
pues se secan en el bastidor de secado a temperatura ambiente o en estufa.
- c) la plantilla de trabajo de material plástico, de una longitud aproximada de 110 cm, se coloca sobre la mesa de laboratorio de forma que su lis  
tón de tope corto sobrepuesto quede a la dere -  
cha.
- d) sobre la plantilla se colocan 5 placas del mismo espesor y tamaño, sean grandes, medianas o pequeñas. Para que no resbalen las placas se ad  
hieren con una gota de agua, o bien como en el SHANDON, que lleva un almohadillado en el que se insufla aire mediante una pera de goma y se man-

tienen la presión constante, consiguiendo que las placas estén sujetas y no exista salto en tre ellas.

- e) el extendedor se coloca, abierto hacia arriba sobre la placa inicial de la izquierda, que casi siempre es de 20 por 5. El espesor de la capa se puede graduar en una escala adyacente. Puede variar el espesor entre 0 y 2 mm. Generalmente es de 0,25 mm.

#### PREPARACION DE LA MASA A EXTENDER.

Los adsorbentes empleados por nosotros es el silicagel de Merck, la alúmina.

La de sílice se hacen de la siguiente manera :

Se pesan 25 g de silicagel y 50 c.c. de agua destilada, se mezclan uniformemente en un mortero removiendo constantemente para no producir grumos, hasta que se ha des leido totalmente.

Una vez hecha la suspensión se llena inmediatamente el extendedor, ya que se endurece en pocos minutos a causa de su contenido en yeso.

Las de plata se preparan de la misma forma pero con la siguiente fórmula :

27 grs de Silica G

3 grs de Nitrato de plata

55 grs de agua destilada

Unas gotas de ácido nítrico, que permite no se oscurezcan.

### EXTENSION DE LA MASA SOBRE LAS PLACAS DE VIDRIO.

Una vez introducida la masa en el aparato extendedor, se sujeta con las dos manos y se desplaza sin hacer mucha presión sobre las placas, hasta llegar a la placa final.

Conseguido el recubrimiento de las placas, se dejan en reposo hasta que la superficie esté opaca (unos 10 minutos). Se dejan

Normalmente se deben activar las placas y para ello se introducen en una estufa, dependiendo la activación del tiempo de calentamiento y temperatura. Un calentamiento a 105° C durante 30 minutos, dan como resultado una actividad que es aproximadamente igual al óxido de aluminio neutro normalizado de Merck.

Posteriormente deben ser conservadas, pues el aire húmedo las desactiva, por lo que deben ser introducidas en un desecador.

La superficie de la placa ha de ser lisa, sin granulaciones y la adhesión debe ser tal que no se desprenda al pasar ligeramente el dedo.

Para obtener una nítida delimitación de la capa en los bordes, se pueden separar las superficies marginales con una espátula o con los dedos pulgar e índice en un ancho de 2 mm.

### APLICACION DE LAS MUESTRAS SOBRE LA PLACA.

De esta forma tenemos la placa de sílica gel preparada; a los lípidos desecados y pesados, le añadimos un disolvente (cloroformo, acetona) y se colocan en la placa, para su separación. Las mezclas a separar se aplican, sobre la línea de origen del cromatograma, que generalmente se encuentra a una distancia de 1,5 hasta 2 cm del borde de la placa. Existen plantillas especiales para colocar perfectamente alineadas las sustancias sobre la placa.

Para la aplicación de sustancias se emplean pipetas apropiadas. Nosotros hemos utilizado una jeringa especial micrométrica tipo HAMILTON, graduada en microlitros.

En esa línea horizontal de la base del cromatograma se van colocando las sustancias, dejando se seque el disolvente.

Una vez colocada toda la sustancia que deseamos separar, se colocan en una cubetas especiales para desarrollarlas, por el método ascendente, tapando la cubeta para conseguir que la atmósfera interior esté saturada con el vapor del disolvente.

Generalmente se permite que el disolvente ascienda unos 10 cm, antes de sacar la placa de la cubeta.

Se saca entonces, se marca la altura alcanzada con el disolvente, se deja que se evapore el disolvente y está dispuesta entonces para el revelado.

Una vez que la placa, había sido desarrollada en hexano-eter-ácido fórmico ( o acético) en la proporción

de 70:30:1, se seca a la temperatura ambiente para que se evapore todo el líquido de desarrollo adsorbido en la placa y entonces se introduce en una cubeta que contiene yodo sólido que tiene la particularidad de fijarse a los lípidos.

Para ello se tapa la placa casi en su totalidad, dejando solo una pequeña porción de la misma, donde se ha depositado la sustancia y los patrones, se tapa la cubeta para que el ambiente de yodo se haga más completo y veremos que toma cada una de las bandas que distinguimos un color amarillento que nosotros señalaremos para separar unas de otras. Se deja desaparecer el color adquirido y entonces se raspan cada una de estas bandas que coinciden con los patrones y así obtenemos en el caso que nos ocupa 6 bandas en total, que corresponden de arriba a bajo:

- |                   |                       |
|-------------------|-----------------------|
| Banda 1 . . . . . | en la que se acumulan |
|                   | Hidrocarburos         |
|                   | Ceras                 |
|                   | Parafinas             |
|                   | Escualeno             |
| Banda 2 . . . . . | Esteres de colesterol |
| Banda 3 . . . . . | Triglicéridos         |
| Banda 4 . . . . . | Acidos grasos         |
| Banda 5 . . . . . | Colesterol            |
| Banda 6 . . . . . | Fosfolípidos.         |

No obstante, la suposición de estas bandas, como ya dijimos, deben ser raspadas cada una de ellas y entonces preparamos unas pequeñas columnitas de cristal que tie-

nen una longitud de 25 cm y un diámetro de 9 mm, a las que se le coloca un tope de corcho en la parte inferior aproximadamente a 3 cm de la base, y en cuyo interior colocamos un disco de filtro grueso. Se montan tantas como bandas. Se raspan y mediante un pequeño embudo se añade la sílice correspondiente a cada banda y se colocan sobre una perita de cristal que van siendo numeradas según la banda, y se les añade un líquido solvente para que arrastre el constituyente que existe en la columna, normalmente se emplea cloroformo, procurando llenar la columnita.

Se deja pasar totalmente todo el líquido, y vamos evaporando una a una las peritas hasta total sequedad en el evaporador rotatorio.

Una vez conseguido todo ello, nos interesa confirmar estos productos y entonces en una placa mediana de 20 por 10 cm colocamos las manchas correspondientes a las 6 bandas comparando con patrones, y desarrollamos de nuevo en el mismo líquido, dejamos que suba hasta una altura que creemos igual que en la anterior ocasión, secamos de nuevo y rociamos con éter sulfúrico para posteriormente quemar en la plancha que está a gran temperatura, por encima de 250° C, y observamos como se queman las manchas donde han subido los diversos componentes de los lípidos, destacando el color rojo-violáceo que adquiere el colesterol y ésteres de colesterol .

Ya tenemos reconocidos los diversos componentes que uno a uno pueden ser estudiados detenidamente.

C.- OBTENCION DE LOS ESTERES METILICOS EN GENERAL.

El método a seguir para la obtención de los ésteres metílicos a partir de los triglicéridos y monoglicéridos, es el siguiente : 5 - 10 mg. de grasa se disuelven en 6 ml de reactivo de esterificación que se prepara, añadiendo 2 ml de ácido sulfúrico concentrado a 230 ml de una mezcla de 3 volúmenes de metanol y un volumen de benceno.

Se hierve a reflujo durante 2,5 horas. Se deja enfriar y se pasa la mezcla a un embudo separador añadiendo 10 ml de agua.

Se extrae dos veces con 5 ml de hexano.

Los extractos combinados se lavan con porciones de 2 ml de agua destilada hasta libre de acidez (comprobando con rojo de metilo), se seca con sulfato sódico y se evapora el disolvente en el evaporador rotatorio a vacío.

Los ácidos grasos libres, han sido metilados siguiendo el método propuesto por H. Schlenk y J.L. Gellerman.

Se disuelven 5-30 mg de ácidos grasos en 2 - 3 ml de éter etílico que contiene 10 % de metanol y se colocan en una perita de cristal.

En un tubo se introducen 0,7 ml de alcohol, 1 ml de una solución de 5 grs de KHO en 10 ml de agua destilada y aproximadamente 2 moles de MNSA (N - metil - N - Nitroso - p - toluen sulfonamide ) "DIAZALD", por miliequivalente de ácidos grasos disueltos en 1 ml de éter etílico.

En otro tubo colocamos éter etílico sobre el que se hace pasar una corriente de nitrógeno.

Ello va a permitir el paso de la combinación del tubo que contiene la mezcla antes dicha, impulsada por la corriente de  $N_2$  a la perita que contiene los ácidos grasos libres, y cuando veamos que el color amarillo de  $CH_2 N_2$  se observa en la solución de la perita, desconectaremos la corriente de  $N_2$ .

El exceso de  $CH_2 N_2$  se elimina evaporando, y para ello lo llevamos al evaporador rotatorio, a temperatura ambiente hasta sequedad.



D.- ESTUDIO ESTRUCTURAL DE LOS TRIGLICERIDOS DE LA PIEL.

Con el descubrimiento llevado a cabo en 1956 simultáneamente por MATTSON y VOLPENHEIM (28) y DESNUELLE (29), sobre la especificidad del ataque de la lipasa pancreática con respecto a los grupos ésteres 1 y 3, ó alfa y alfa prima de la molécula de un triglicérido, se dispone de un método sencillo y rápido para el estudio de los distintos tipos de triglicéridos presentes en una grasa natural.

Para el cálculo de los distintos tipos de triglicéridos, es necesario conocer la composición porcentual de los ácidos grasos presentes en los triglicéridos totales, así como, bien aquella composición correspondiente a los ácidos en posición alfa o en beta ya que cualquiera de éstas puede deducirse a partir de la composición de los ácidos totales y una de ellas (alfa o beta), mediante las fórmulas siguientes :

$$C_2 = 3 ( C_{1,2,3} ) - 2 ( C_{1,2} )$$

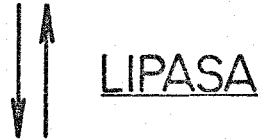
$$C_{1,3} = \frac{3 ( C_{1,2,3} ) - C_2}{2}$$

Donde  $C_2$ ,  $C_{1,3}$  y  $C_{1,2}$ , representan el porcentaje de un ácido en la posición beta, alfa o en los triglicéridos totales.

La lipasa pancreática origina en su ataque los siguientes productos :

## HIDROLISIS de la LIPASA

TRIGLICERIDO



1,2-Diglicérido + 2,3-Diglicérido + Acidos grasos



2-Monoglicérido + Acidos grasos

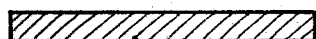


Glicerol + Acidos grasos

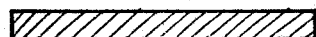
Por tanto si después del ataque con la lipasa llevamos a cabo una TLC del total de los productos de la reacción, tendremos en general el esquema siguiente :



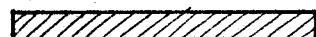
Triglicéridos no atacados



Acidos grasos libres



1,2 - diglicéridos



2 - Monoglicéridos

desarrollando en un líquido de desarrollo de hexano- éter ácido fórmico (o acético) en la proporción de 70 : 30 : 1.

Si se aislan de la placa los ácidos grasos liberados, que ocupaban las posiciones 1 y 3 en las moléculas de los triglicéridos tendremos mediante el análisis de sus ésteres metílicos por cromatografía gaseosa, la composición centesimal de los mismos.

Si obtenemos los 2-monoglicéridos de la placa mediante transesterificación, formamos los ésteres metílicos, el análisis de éstos por cromatografía gaseosa, nos dará la composición centesimal, en este caso de los ácidos en posición central de las moléculas de los triglicéridos. (posición 2 o beta).

Con estos dos datos y la composición de los ácidos grasos totales presentes en los triglicéridos se calculan los distintos tipos de aquellos y su cuantía mediante las fórmulas siguientes :

$$\% A A A = ( \% A \alpha ) ( \% A \beta ) ( \% A \alpha ) / 10.000$$

$$\% A B A = ( \% A \alpha ) ( \% B \beta ) ( \% A \alpha ) / 10.000$$

$$\% A A B = ( \% A \alpha ) ( \% A \beta ) ( \% B \alpha )^2 / 10.000$$

$$\% A B C = ( \% A \alpha ) ( \% B \beta ) ( \% C \alpha )^2 / 10.000$$

$$\% A C B = ( \% A \alpha ) ( \% C \beta ) ( \% B \alpha )^2 / 10.000$$

$$\% B A C = ( \% B \alpha ) ( \% A \beta ) ( \% C \alpha )^2 / 10.000$$

Donde  $A\alpha$ , y  $A\beta$ , representan el porcentaje del ácido A en las posiciones  $\alpha$  y  $\beta$  respectivamente. Y  $\% A A A$ , es el porcentaje de triglicéridos monoácidos;  $\% A B A$  y  $\% A A B$ , son los porcentajes de triglicéridos diácidos y  $\% A B C$ ,  $\% A C B$  y  $\% B A C$ , los porcentajes de triglicéridos tri-ácidos.



E.- METODO DE DETERMINACION DE LIPIDOS EN LA PIEL MEDIANTE  
LOS ACIDOS HIDROXAMICOS.

La determinación de los lípidos extraídos de la piel, se hace mediante la reacción de los ácidos hidroxámicos que da los grupos ésteres presentes en total y que incluye los ésteres de colesterol, triglicéridos y fosfolípidos .

Hemos escogido esta determinación debido a que se ha comprobado que desde un principio todos los tipos de compuestos (incluyendo los ácidos grasos libres y colesterol que no son determinados en este método, por no contener el grupo éster) aparecen desde un principio en los lípidos extraídos de la piel.

El método, además de ser muy exacto, solo requiere una pequeña cantidad de lípidos totales, aproximadamente 0,3 mg en total, pues esta cantidad de éster ya da un color conveniente para ser medido.

METODO DE DETERMINACION.-

Para la determinación se añade a la cantidad conveniente de lípidos medio ml de una mezcla de hidróxido sódico al 8% en etanol y otra de clorhidrato de hidroxilamina al 4% en etanol. Estas dos soluciones se mezclan justamente antes de su uso y se filtra el precipitado de clorurosódico formado. De la solución filtrada se añade como se indica anteriormente medio ml. a cada muestra. Se coloca en una estufa a 80° C durante un cuarto de hora, se deja

enfriar a temperatura ambiente y se añade a cada muestra 3 ml de una solución preparada como se indica a continuación:

A). Solución de perclorato férrico madre :

Se prepara disolviendo la cantidad de cloruro férrico equivalente a 0,4 grs de hierro en 5 ml de ácido clorhídrico concentrado . Se añaden 5 ml de ácido perclorídrico del 70% y se evapora casi a sequedad y diluye hasta 100 ml de agua destilada .

B). Solución de perclorato férrico de trabajo :

Se toman 10 ml de la solución madre. Se añaden 5 ml de ácido perclórico del 70% y se lleva a un litro con etanol del 95%.

por cada 100 ml de esta solución se añaden 5 ml de ácido nítrico concentrado con objeto de que el color obtenido con ácidos hidroxámicos sea estable. Si la solución final aparece turbia se añade la misma cantidad de agua a cada muestra hasta que éstas aparezcan totalmente transparentes antes de medir.

La medida se hace en un SPECTRONIC 20 a 520 m $\mu$ . Para evitar la turbidez a que nos referimos antes de una vez y para siempre se puede añadir a la solución de trabajo la cantidad calculada de agua destilada deducida de la cantidad necesaria añadida a los 3 ml de un ensayo.

RESULTADOS

### ESTUDIO DE LOS LÍPIDOS DE PIEL NORMAL.-

La obtención de los lípidos cutáneos de piel sana, ha sido realizado por nuestro método descrito anteriormente.

Teniendo en cuenta una serie de factores que pueden influir en la secreción lipídica de la piel, tales como, la edad ( a medida que aumenta la piel se hace más seca), la menstruación en la mujer como la ovulación que permiten un aumento de los lípidos cutáneos, como factores emocionales, anatómicos, etc., hemos obtenido los lípidos de 20 personas de ambos sexos, cuyas edades estaban comprendidas entre los 17-22 años, lo que permite una perfecta similitud, de la piel de la cara de flexión de ambos antebrazos en un área aproximada de  $360 \text{ cm}^2$ .

Los lípidos totales obtenidos fueron: 0,2472 g, que representa  $0,7 \text{ mg/cm}^2$ .

Para su estudio se opera de la siguiente forma:

- a) Colocamos todos los lípidos en cinco placas de Sílice G, de 20 por 20 cm.
- b) Desarrollamos con hexano, éter y ácido acético en la proporción de 70:30:1.
- c) Introducimos en una cubeta con yodo para reconocer bandas.
- d) Se reconocen 6, que raspamos y colocamos su sílice en columnitas que se extraen con cloroformo.



e) Todas las bandas, ya concentradas se estudian en otra placa de sílice G con patrones, y observamos los componentes indicados en la figura 2.

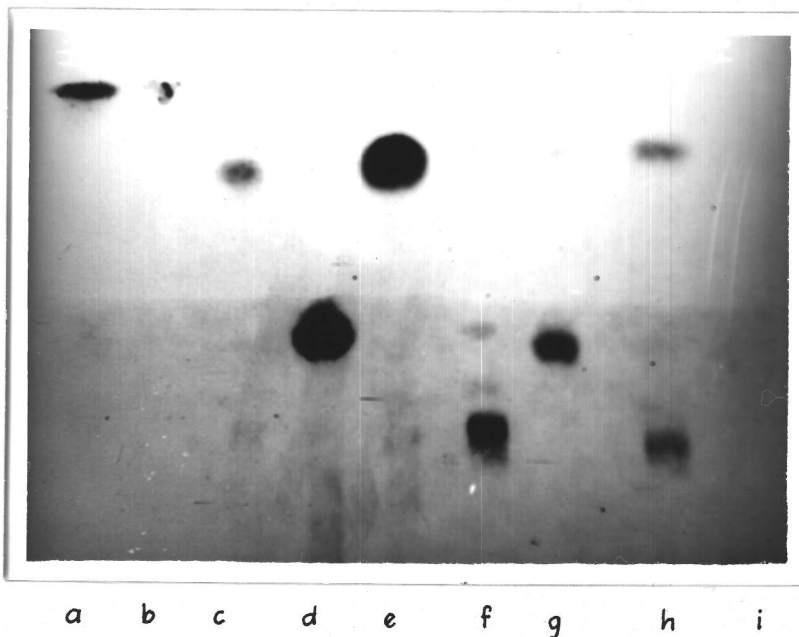


Figura 2

CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA, de los lípidos totales en la piel normal.

- a) HIDROCARBUROS SATURADOS (piel)
- b) " " (patrón)
- c) ESCUALENO (piel)
- d) PALMITATO DE COLESTEROL (patrón)
- e) ESCUALENO (patrón)
- f) TRIGLICERIDOS (patrón)
- g) ESTERES DE COLESTEROL (piel)
- h) TRIGLICERIDOS (piel)
- i) Lípidos polares (piel)

A continuación pasamos a estudiar los diversos componentes.

En la primera banda: suponemos la existencia de escualeno, ceras, y parafinas. Al producto existente en la perita 1 (correspondiente a la primera banda raspada), le añadimos 200 microlitros de disolvente (acetona). Hacemos una placa de sílice G de 20 por 5 cm, sin patrones y desarrollamos con hexano puro, puesto que se trata de componentes muy poco polares.

Quemamos la placa y observamos los siguientes compuestos :

Escualeno, ceras y esteroides de colesterol.

Hacemos la placa con el total de esta banda, que introducimos en atmósfera de yodo, y separamos tres bandas.

Raspamos y preparamos las tres columnas como se ha dicho anteriormente.

Nos interesa separar las ceras de los esteroides de colesterol, y para ello tratamos de separarlas haciendo una placa de alúmina (29) y desarrollando con hexano, y tras el proceso habitual separamos las dos bandas, ceras y esteroides de colesterol.

Tras hacer una placa de comprobación de estos componentes, hacemos una placa de plata con los esteroides de colesterol y patrones, llevando a desarrollo con benceno.

Se observa la presencia de distintos tipos de ésteres de colesterol con número de dobles enlaces de cero a cuatro. Siendo los componentes fundamentales los de un doble enlace (oleico posiblemente) y dos dobles enlaces (linoleico).

Con los hidrocarburos, hicimos una placa de plata que se desarrolla con hexano y revelada con fluoresceína, se observó la existencia de los mismos en forma de una mancha grande. No se observaban ceras quedando arriba la mancha de los hidrocarburos.

Las ceras , se estudian del modo siguiente,

Añadimos 200 microlitros de acetona, e hicimos una placa de Sílice G que desarrollamos con hexano, sucesivamente fuimos haciendo desarrollos con el mismo disolvente, hasta un total de 7 veces, obteniendo hasta diez bandas de ceras.

Con la banda de los triglicéridos, hacemos una pequeña placa de gel de Sílice con nitrato, para ver los distintos tipos de triglicéridos, desarrollando con benceno y colocando aceite de oliva como patrón.

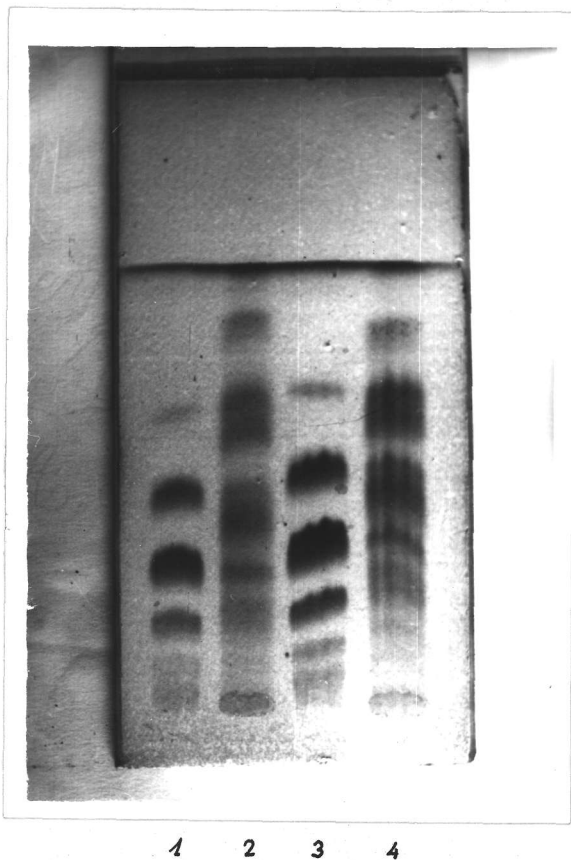


Figura 3

CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA, de sílice Gel con nitrato de plata, correspondiente a los triglicéridos de una piel sana.

Los cromatogramas 1-3 corresponden a los patrones.

Los cromatogramas 2-4, a los triglicéridos de la piel sana.

La figura 3, muestra el resultado obtenido. Puesto que los triglicéridos del aceite de oliva, la primera mancha superior corresponde a triglicéridos con un doble enlace, se deduce que en los triglicéridos de la piel existen también triglicéridos trisaturados (mancha superior en los cromatogramas 2 y 4) cosa que se confirmará químicamente como se verá más adelante. La placa de nitrato de plata separa más los componentes de los triglicéridos de la piel dentro de cada grupo de insaturación, ya que se encuentran al menos dos bandas en los lugares correspondientes a los triglicéridos con uno y dos enlaces.

Logicamente se debe tratar de triglicéridos isómeros de posición, (30) que como es sabido son separados normalmente en este tipo de cromatografía.

A parte de este estudio cualitativo que sirve de orientación sobre el número y tipo de triglicéridos presentes se ha llevado a cabo un estudio químico de la fracción de triglicéridos empleando la técnica de la enzima lipasa-pancreática, que como se indicó anteriormente es fundamental para el conocimiento de los distintos tipos de triglicéridos presentes en una grasa animal o vegetal. El método seguido ha sido el siguiente :

#### LIPOLISIS DE LOS TRIGLICERIDOS DE PIEL NORMAL.

- 1) La mitad de los triglicéridos se colocan en una perita y evaporamos hasta sequedad.
- 2) Se le añade 1 ml de TRIS hidroximetilaminometano ( este es un compuesto que mantiene un tampón aproximado de pH 8); 0,1 ml de cloruro cálcico al 2,2 %, 0,25 ml de sales biliares al 0,05 % y lipasa (unos 10 mg).

- 3) Se agita en un timbre o vibrador durante minuto y medio y se le añade aproximadamente 1 c.c. de HCl para parar la hidrólisis, 2 ml de eter y se agita.
- 4) Debemos saber como ha ido la lipolisis, para ello hacemos una placa con patrones totales y desarrollamos con eter / hexano / ácido acético en la proporción de 70 : 30: 1.
- 5) Una vez comprobado que la hidrólisis ha marchado bien ( aproximadamente un 60 % de ácidos grasos libres) se extrae con eter en el embudo separador y se lava dos veces con agua para eliminar el HCl añadido.
- 6) Se evapora el disolvente con el evaporador rotatorio a vacío.
- 7) Todo el producto que ha sido sometido a la lipolisis se cromatografía en una placa de Silice Gel, desarrollando con eter/hexano/ácido acético, en las proporciones ya conocidas, para separar las distintas bandas que nos interesan, que son los monoglicéridos y los ácidos grasos libres de los triglicéridos.
- 8) Preparamos las columnas para la extracción de cada banda y le añadimos cloroformo.
- 9) Los ácidos grasos libres obtenidos en la lipolisis de estos triglicéridos se metilan con diazometano, por el procedimiento ya descrito en métodos, evaporamos y quedan en disposición de ser inyectados en el cromatógrafo de gases. Resultados Tablas 1,2 y 3. págs. 82-83-84

10) La parte de triglicéridos totales, que no fueron sometidos a la lipólisis, y los monoglicéridos obtenidos de la lipólisis se metilan del modo siguiente :

Le añadimos unos ml de una solución que está compuesta por metanol: benceno: sulfúrico, le añadimos plato poroso y ponemos a hervir durante 30 minutos.

- 11) Extraemos con hexano los monoglicéridos y los ácidos grasos libres de los triglicéridos ya metilados.
- 12) Con los ésteres obtenidos en varios casos hacemos placa, y desarrollamos con hexano/benceno al 20% ( ya que son poco polares). Se revelan con yodo. Separamos los ésteres metílicos de los ácidos grasos y extraemos en pequeñas columnitas obteniéndose los ésteres prácticamente puros y dispuestos para el análisis por cromatografía de gases.

Los ácidos grasos libres de los lípidos totales, se metilan con diazometano.

A los ésteres metílicos de los ácidos grasos le añadimos 3 c.c. de acetona, hacemos una placa de plata con patrón de linaza-cacao, colocando las manchas algo extendidas. Desarrollamos con hexano/benceno al 20%. Se rocian con fluoresceína y vemos a rayos ultravioleta. Una raspadas y extraídas las columnitas se cromatografían (CG).

Resultados : Ejemplos de composición de los ácidos grasos libres, así como de los ácidos grasos totales de los triglicéridos de piel normal, se encontrarán más adelante cuando se describan los estudios realizados de aquellos com



puestos en los distintos tipos de enfermedades.

Con respecto a las dos bandas correspondientes a colesterol y fosfolípidos, no hemos profundizado en su estudio. Respecto a los fosfolípidos es lógico esperar que al ser muy poco solubles en acetona se han extraído en muy pequeña proporción con el método seguido por nosotros.

El uso de la acetona como líquido de extracción de los lípidos de la piel, se ha impuesto dado que la mezcla ideal (cloroformo-metanol 2:1), para la extracción de aquellos produce gran irritabilidad, máxime cuando ha sido frecuente el tener que extraer lípidos de la misma persona en diversas ocasiones.

Nuestro interés se ha centrado -dado el gran número de componentes presentes en los lípidos de la piel- hacia el estudio de los ácidos grasos libres y de los ácidos grasos totales de los triglicéridos, así como en el de los distintos tipos de triglicéridos presentes tanto en los lípidos de piel sana, como en los de piel afectada de diversas enfermedades.

A continuación destacamos los estudios efectuados en las distintas enfermedades de un modo más detallado dado que, en ciertos casos, hemos podido identificar algunos compuestos de interés.

Aparte de ellos, siempre se incluirán los estudios indicados anteriormente sobre ácidos grasos libres, ácidos grasos totales de los triglicéridos y composición total de los distintos tipos de triglicéridos.

## B. ESTUDIO DE LOS LIPIDOS EN EL PSORIASIS.-

Obtención de los lípidos: Extraemos los lípidos por el procedimiento ya descrito en los métodos de obtención.

Tomamos tres grupos de enfermos, acumulados según edad, y no olvidando los factores que pueden influir en la secreción lipídica y que ya tuvimos en cuenta en la piel normal.

La obtención se realiza de las mismas áreas con respecto a superficie y de las mismas zonas. Casi siempre en zonas de piel de antebrazos ( por comodidad en la extracción).

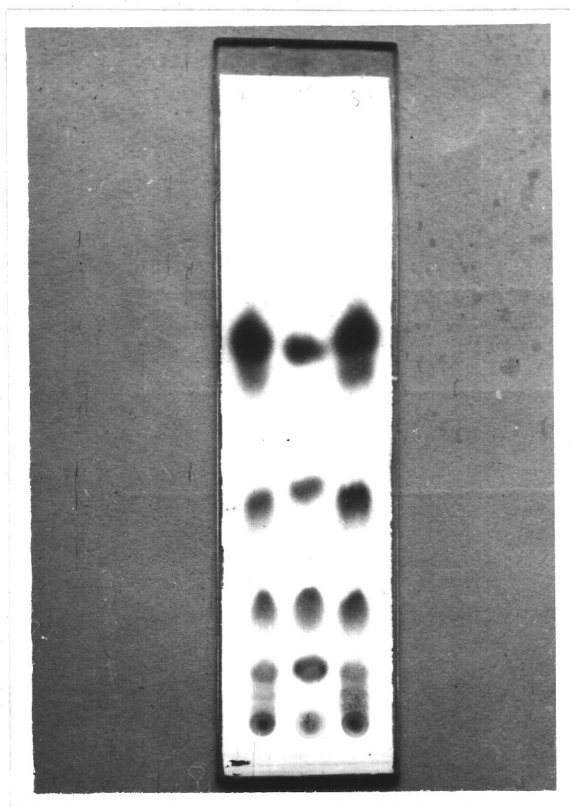
Los grupos los formamos con enfermos de :

<u>Grupo A</u>	<u>Grupo B</u>	<u>Grupo C</u>
15 - 30 años	30 - 50 años	más de 50

Una vez obtenido y evaporado el solvente se observa en general que existe una disminución en peso de lípidos totales en zonas afectadas por la enfermedad, comparada a zonas indemnes.

Quizás pueda influir en ello la paraqueratosis, que existe en esta enfermedad, y que da lugar a que el proceso de queratinización, biológicamente normal, no se realice.

Una vez confirmada esta diferencia, pasamos al estudio de los lípidos, siguiendo la norma que hemos seguido con los de la piel normal. Una cromatografía de placa fina con patrones, de los lípidos de la parte enferma y parte sana se representa en la figura 4.



E P S

Figura 4

CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA, de silica-gel correspondiente a los lípidos totales en el PSORIASIS.

E) Corresponde a parte enferma

P) " patrones

S) " a parte sana.

Desarrollo en E/H al 30% + 1 c.c. de HCl.

En esta misma figura 4 se incluyen asimismo patrones que de arriba a abajo, son : palmitato de colesterol, trioleina, ácido oleico, colesterol y lecitina. Como se observa de un modo cualitativo están presentes los mismos componentes en ambos casos.

Es interesante observar como hay una clara separación entre los hidrocarburos y ceras; mancha superior de las dos que han avanzado más y los ésteres de colesterol - mancha inferior pegada a la anterior - de las dos que aparecen juntas.

En las tablas que se incluyen a continuación, se detallan los resultados obtenidos en los análisis que como se indica, más arriba, son de nuestro interés.

PSORIASIS

<u>Grupo A :</u>	<u>Parte sana</u>	<u>Parte enferma</u>
Superficie extraída.	70 cm <sup>2</sup>	70 cm <sup>2</sup>
Peso lípidos totales.	49,9 mg	36,9 mg

ACIDOS GRASOS LIBRES Y ACIDOS GRASOS TOTALES DE LOS TRIGLICERIDOS.-

<u>Acidos grasos</u>	<u>Libres - Trig.</u>	<u>Libres-- Trig.</u>
Mirístico . .	10,5 - 11,1	8,2 - 10,3
C15 . . . . .	0,4 - 1,2	0,7 - 1,5
A1 . . . . .	5,1 - 3,9	2,8 - 5,9
P . . . . .	32,5 - 29,3	37,3 - 27,0
Po . . . . .	10,0 - 16,2	10,9 - 15,3
A2 . . . . .	-- --	-- --
B . . . . .	1,6 - 1,9	0,3 - 2,2
E . . . . .	8,3 - 2,8	16,4 - 4,2
O . . . . .	31,0 - 23,0	20,5 - 23,3
L . . . . .	0,6 - 4,0	1,6 - 9,2
Ln . . . . .	-- 6,6	1,3 - 1,2

PSORIASIS

<u>Grupo B :</u>	<u>Parte sana</u>	<u>Parte enferma</u>
Superficie extraída.	70 cm <sup>2</sup>	70 cm <sup>2</sup>
Peso lípidos totales.	47 mg	46 mg

ACIDOS GRASOS LIBRES Y ACIDOS GRASOS TOTALES DE LOS TRIGLICERIDOS.-

<u>Acidos grasos</u>	<u>Libres - Trig.</u>	<u>Libres - Trig.</u>
Mirístico . .	5,9 - 6,0	5,9 - 5,2
C15 . . . .	3,2 - 3,1	1,8 - 3,0
A1 . . . .	1,9 - 1,2	2,6 - 1,2
P . . . .	22,6 - 25,77	24,8 - 26,8
Po . . . .	10,6 - 13,9	9,0 - 16,1
A2 . . . .	-- 1,1	-- 1,5
B . . . .	1,7 - 1,8	1,0 -- 1,9
E . . . .	8,0 - 5,9	16,2 - 7,5
O . . . .	39,4 - 35,8	32,2 - 33,7
L . . . .	3,7 - 5,5	2,6 - 3,2
Ln . . . .	trazas --	trazas --
	C10 tr. -----	C10 0,7
	C12 2,1 -----	C12 1,8
	C17 0,9 -----	C17 12

PSORIASIS

<u>Grupo C :</u>	<u>parte sana</u>	<u>parte enferma</u>
Superficie extraída.	70 cm <sup>2</sup>	70 cm <sup>2</sup>
Peso lípidos totales .	36 mg	29,7 mg

ACIDOS GRASOS LIBRES Y ACIDOS GRASOS TOTALES DE LOS TRIGLICERIDOS.-

<u>Acidos grasos</u>	<u>Libres - Trig.</u>		<u>Libres - Trig.</u>	
Mirístico . .	8,8	- 5,4	6,6	- 6,7
C15 . . . . .	3,8	- 2,7	4,0	- 3,4
A1 . . . . .	2,3	- 1,3	0,8	- 1,2
P . . . . .	26,9	- 18,9	23,9	- 20,9
Po . . . . .	15,9	- 13,2	14,8	- 12,3
A2 . . . . .	0,9	- 0,6	0,9	- 1,3
B . . . . .	2,0	- 2,1	2,4	- 1,9
E . . . . .	10,0	- 3,4	9,8	- 4,9
O . . . . .	18,2	- 41,4	32,0	- 36,4
L . . . . .	4,0	- 10,5	2,4	- 10,0
Ln . . . . .	↓	↓	↓	↓
	C12 7.3	CL2 0.5	C12 2.8	CL2 1.0

TRIGLICERIDOS EN PIEL SANA DE PSORIASIS

	<u>ACIDOS GRASOS</u>			<u>O</u>	<u>L</u>	I.Yodo (teórico)
	<u>P</u>	<u>Po</u>	<u>E</u>			
Totales	34,0	14,0	7,8	34,2	7,7	Acidos grasos
Beta	28,0	5,0	12,0	48,0	6,7	totales.
Alfa	37,0	18,5	5,7	27,3	8,2	58,7

TRIGLICERIDOS

Grupo AAA

PPP	=	3,83
PoPoPo	=	0,17
EEE	=	0,03
OOO	=	3,57
LLL	=	0,04

---

7,64

Grupo ABA

P Po P	=	0,68	Po P Po	=	0,95	E P E	=	0,09
P E P	=	1,64	Po E Po	=	0,41	E Po E	=	0,01
P O P	=	6,57	Po O Po	=	1,64	E O E	=	0,15
P L P	=	0,91	Po L Po	=	0,22	E L E	=	0,02
		<u>9,80</u>			<u>3,22</u>			<u>0,27</u>

O P O	=	2,08	L P L	=	0,18
O Po O	=	0,37	L Po L	=	0,03
O E O	=	0,89	L E L	=	0,08
O L O	=	<u>0,49</u>	L O L	=	<u>0,32</u>
		3,83			0,61



Grupo AAB

P P Po = 3,82	Po Po P = 0,68	E E P = 0,50
P P E = 1,18	Po Po E = 0,10	E E Po = 0,24
P P O = 5,64	Po Po O = 0,50	E E O = 0,36
P P L = <u>1,68</u>	Po Po L = <u>0,14</u>	E E L = <u>0,10</u>
12,32	1,42	1,20
O O P = 9,68	L L P = 0,40	
O O Po = 4,84	L L Po = 0,20	
O O E = 1,48	L L E = 0,62	
O O L = <u>2,14</u>	L L O = <u>0,28</u>	
18,14	1,5	

Grupo ABC

P Po E = 0,20	P E Po = 1,64	P O Po = 6,56
P Po O = 1,00	P E O = 2,20	P O E = 2,02
P Po L = <u>0,30</u>	P E L = <u>0,72</u>	P O L = <u>2,90</u>
1,50	4,56	11,48
P L Po = 0,90	Po P E = 0,58	Po O P = 6,56
P L E = 0,28	Po P O = 2,42	Po O E = 1,00
P L O = 1,34	Po P L = <u>0,84</u>	Po O L = <u>1,44</u>
	3,84	9,00

Grupo ABC

Po L E = 0,14  
Po L O = 0,66  
Po L P = 0,90  
1,70

E P O = 0,806  
E P L = 0,260  
1,12

E Po O = 0,14  
E Po L = 0,04  
0,18

E O L = 0,44  
E L O = 0,20  
0,62

O P L = 1,24  
O PoL = 0,22  
1,46

L E O = 0,52  
0,52

TRIGLICERIDOS PRESENTES EN PIEL ENFERMA DE PSORIASIS.

ACIDOS GRASOS

	<u>P</u>	<u>Po</u>	<u>E</u>	<u>O</u>
Totales	33,3	6,0	10,0	50,7
Beta	47,3	7,3	12,7	32,7
Alfa (cal.)	26,3	5,4	8,6	59,7

TRIGLICERIDOS

Grupo AAA

P P P =	3,27
PoPoPo =	0,02
E E E =	0,08
O O O =	<u>11,65</u>
	15,02

Grupo ABA

P Po P =	0,50	Po P Po =	0,13	E P E =	0,34
P E P =	0,87	Po E Po =	0,03	E PoE =	0,05
P O P =	<u>2,26</u>	Po O Po =	<u>0,09</u>	E O E =	<u>0,24</u>
	3,63		0,25		0,63
O P O =	16,85				
O Po O =	2,60				
O E O =	<u>4,52</u>				
	23,97				

Grupo AAB

P P Po = 1,22  
P P E = 1,96  
P P O = 13,64  

---

16,82

Po Po P = 0,20  
Po Po E = 0,06  
Po Po O = 0,46  

---

0,73

E E P = 0,56  
E E Po = 0,11  
E E O = 1,30  

---

1,97

O O P = 10,26  
O O Po = 2,08  
O O E = 3,34  

---

15,68

Grupo ABC

$$\begin{array}{r} P P o E = 0,32 \\ P E O = 3,98 \\ P P o O = 2,28 \\ \hline 6,58 \end{array}$$

$$\begin{array}{r} P o P E = 0,42 \\ P o E O = 0,80 \\ P o P O = 3,04 \\ \hline 4,26 \end{array}$$

$$\begin{array}{r} O P P o = 3,04 \\ O P E = 4,84 \\ P P o E = 0,74 \\ \hline 8,62 \end{array}$$

$$\begin{array}{r} E P P o = 0,42 \\ E P O = 1,30 \\ E P o O = 0,74 \\ \hline 2,46 \end{array}$$

PORCENTAJES DE LOS TRIGLICERIDOS POR INSATURACION.

P S O R I A S I S

<u>Parte sana</u>	<u>Parte enferma</u>
7,27	7,09
24,39	30,60
37,92	46,12
20,85	16,90
6,59	--
1,83	--
0,04	--
-----	-----
98,89	100,71

Dado que en las partes afectadas de PSORIASIS, era posible la existencia de un tipo de triglicéridos de distinta insaturación - provocada ésta, bien por una mayor movilización de los lípidos más fluidos o sea más insaturados, bien por una oxidación de estos mismos lípidos que originaría su desaparición - hemos reunido los triglicéridos encontrados tanto en la parte de piel sana como afectada con respecto a los índices de yodo teóricos, lo cual a "grosso modo" nos daría una idea de la mayor o menor in saturación total del conjunto de los triglicéridos.

La tabla que reúne los distintos grupos de triglicéridos nos lleva a la conclusión de que efectivamente existe una desaparición de los tipos de triglicéridos con cuatro, cinco y seis dobles enlaces en los lípidos de parte afectada por psoriasis con lo que se confirma el supuesto indicado anteriormente.

PRESENCIA DE DIGLICERIDOS EN LOS LIPIDOS DE LA PIEL  
AFECTADA DE PSORIASIS.-

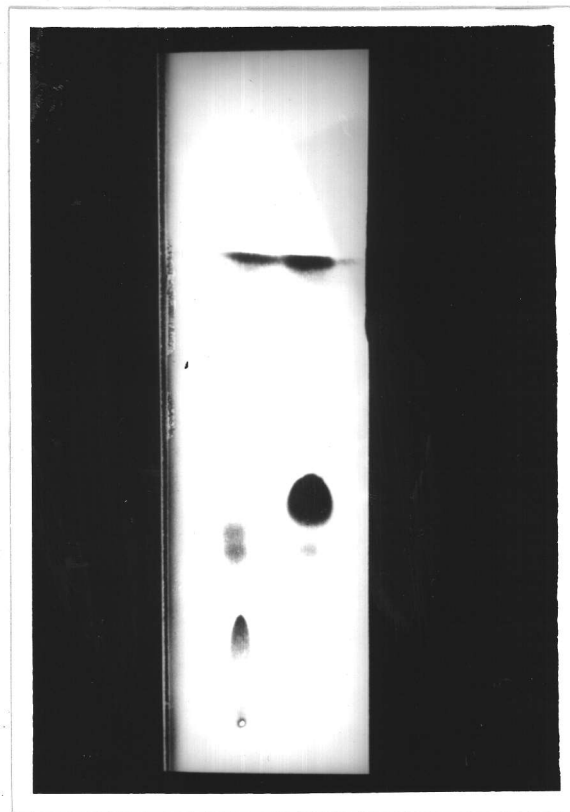
En los cromatogramas de los lípidos totales de Psoriasis, se observaron en ciertos casos, manchas que por su situación (Rf) podrían corresponder a DIGLICERIDOS.

Con objeto de confirmar este supuesto, se cromatografió una parte alicuota de la solución de los lípidos y se raspó y extrajo en cloroformo la banda en estudio.

Una vez concentrado el extracto clorofórmico se hizo una cromatografía de capa fina (CCF), con patrones de 1,3 y 1,2 dipalmitina.

En la figura 5, se observa, como efectivamente es tá presente tanto el 1,3 como el 1,2 - diglicérido prácticamente en iguales proporciones.





A B

Figura 5

CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA, de silica-gel correspondientes a los diglicéridos del PSORIASIS.

A) DIGLICERIDOS, aislados de piel ( 1,3 y 1,2)

B) DIGLICERIDOS patrones (1,3 y algo de 1,2 )

### C. ESTUDIO DE LOS LÍPIDOS EN LA SEBORREA.-

Obtenemos los lípidos de zonas cutáneas en que la seborrea se pone de manifiesto más objetivamente.

Así, hacemos las extracciones de la piel de la zona interescapular e incluso de la frente.

Areas: 70 cm<sup>2</sup>

Lípidos obtenidos: 50 mg

Destaca una mayor proporción de lípidos con respecto a la piel normal.

Hacemos cromatografía en sílice gel G, para ver si existe alguna variación de los componentes normales de los lípidos de piel normal.

Obtenemos la siguiente cromatografía. Ver figura 6.

Comparando un cromatograma de los lípidos de la seborrea, figura 6, y los de la Psoriasis y piel normal, se observa que así como los lípidos de la piel afectada de psoriasis son muy similares cualitativa y cuantitativamente, a aquellos presentes en la piel normal - cromatogramas de la derecha e izquierda de la figura 3 a el caso de la seborrea (fig.7), la proporción de algunos de ellos se alteran grandemente respecto a los de la piel normal.

Así, es de destacar, que la mancha correspondiente a los ésteres de colesterol - mancha segunda de las dos superiores - se iguala prácticamente con la de los hidrocarburos y ceras. Del mismo modo la proporción de triglicéridos aumenta considerablemente.

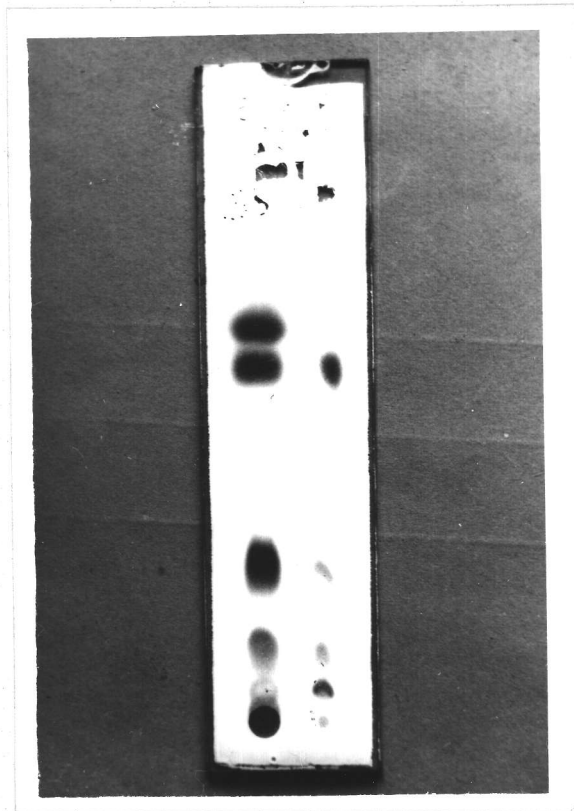


Figura 6:

CROMATOGRAFIA DE CAPA FINA, correspondiente a los LÍPIDOS TOTALES DE SEBORREA. La izquierda corresponde a la parte enferma. Destacan en la parte superior, dos manchas muy grandes. La superior corresponde a ESTERES DE COLESTEROL y la inferior a HIDROCARBUROS Y CERAS.

Se destaca la existencia de unas manchas existentes entre los ésteres de colesterol y los triglicéridos, que es interesante el averiguar a qué corresponden.

por su situación podría tratarse de gliceril-éster-diéster. Hecho el desarrollo total de todos los lípidos, raspamos las bandas correspondientes a dichas manchas a estudiar y extraemos como de costumbre.

Una cromatografía de capa fina (CCF), nos muestra que efectivamente, la citada mancha posee el mismo Rf que el de los gliceril-éster-diéster presentes en el aceite de tiburón. Para confirmar su identidad, el producto, es hidrolizado y el insaponificable obtenido como se indica en Métodos para la obtención del Escualeno a partir del aceite de oliva, se cromatografía frente a Alcohol batílico, dando éste, el mismo Rf que la mancha fundamental del insaponificable obtenido.

Esto demuestra, de un modo indirecto, la presencia en cantidades apreciables de aquél tipo de compuestos en la piel afectada de seborrea.

Posiblemente aquellas existen en piel afectada de psoriasis e incluso quizás, en piel normal su proporción no debe ser lo suficientemente elevada como para ser detectada directamente en un cromatograma, llevado acaso en condiciones normales.

S E B O R R E A (parte enferma)

ACIDOS GRASOS LIBRES Y ACIDOS GRASOS TOTALES DE LOS TRIGLICERIDOS.

	<u>Acidos grasos libres</u>	<u>Acidos grasos de Trig.</u>
La . . . .	1,1	1,4
M . . . .	10,0	9,9
C15 . . . .	6,5	5,2
A . . . .	3,2	1,8
P . . . .	25,8	25,4
Po . . . .	26,9	18,4
A2 . . . .	1,2	1,0
B . . . .	3,3	3,0
E . . . .	3,4	7,3
O . . . .	18,5	21,6
L . . . .	trazas	5,0

ESTRUCTURA DE LOS TRIGLICERIDOS EN LA SEBORREA.

LIPOLISIS PIEL NORMAL

	<u>ACIDOS GRASOS</u>						
	<u>M</u>	<u>C15</u>	<u>A1</u>	<u>P</u>	<u>Po</u>	<u>O</u>	<u>L</u>
Totales	9,1	6,2	1,2	27	21	25,8	1,5
Alfa	5,8	4	0,7	26,2	7,6	33,2	5,5
Beta(cal.)	15,7	10,6	2,22	28,6	47,8	11	0

Cal

TRIGLICERIDOS

Grupo AAA

P P P = 1,8  
PoPoPo = 1,08  
O O O = 0,5

Grupo ABA

P M P = 0,62      Po A Po = 0,55  
P PoP = 2,37      Po P Po = 0,83  
P O P = 1,48      Po O Po = 0,67

O P P = 0,63  
O Po O = 0,82

Grupo AAB

P P M = 1,38	Po Po M = 1,22	O O M = 0,66
P P C15 = 0,96	Po Po C15 = 0,84	O O P = 1,74
P P Po = 2,46	Po Po P = 3,20	O O Po = 1,16
P P O = 2,12	Po Po O = 1,86	

Grupo ABC

M Al P = 0,92	M P Po = 0,94	M Po P = 1,80
M Al Po = 0,62	M P O = 0,82	M Po O = 1,06
M Al O = 0,54		

M O P = 1,12	C15 Al P = 0,64	C15 P Po = 0,66
M O Po = 0,76	C15 Po P = 1,26	C15 P O = 0,58
	C15 Po O = 0,74	

C15 O P = 0,78	P Al M = 0,92	P M Po = 0,84
C15 O Po = 0,52	P Al C15 = 0,64	P M O = 0,74
		P C15 Po = 0,54

Po Al P = 1,64	Po O M = 0,76	Po C15 P = 0,54
Po Al O = 0,96	Po O C15 = 0,52	O Al P = 1,42
Po P M = 0,94	Po O P = 1,98	O Al Po = 0,98
Po P C15 = 0,64	Po M P = 0,78	O Po M = 1,06
Po P O = 1,42	Po Al M = 0,62	O Po C15 = 0,74

Grupo ABC

O P o P = 2,78  
O M P = 0,72  
O A l P = 0,54  
O A l P = 1,42  
O A l P o = 0,98  
L M O = 0,56  
L P o O = 1,74  
L P O = 1,04  
P P L = 0,82  
L P o P = 1,36





S E B O R R E A

LIPOLISIS PARTE ENFERMA

ACIDOS GRASOS

	<u>M</u>	<u>C15</u>	<u>A1</u>	<u>P</u>	<u>Po</u>	<u>O</u>
Totales	9,8	6,7	6,1	26,4	26,1	17,3
beta .	8,2	5,3	15,9	23,8	30,9	19,3
alfa .	10,6	7,4	1,2	27,7	18,7	16,3

TRIGLICERIDOS

Grupo AAA

$$P P P = 1,96$$

$$O O O = 1,21$$

Grupo ABA

$$P M P = 1,07$$

$$O M O = 1,73$$

$$P C15 P = 0,72$$

$$O C15 O = 1,16$$

$$P Po P = 3,26$$

$$O P O = 3,15$$

$$P O P = 0,75$$

$$O Po O = 5,26$$

Grupo AAB

$$M M O = 0,60$$

$$P P M = 0,86$$

$$PoPoP = 1,90$$

$$P P C15 = 0,58$$

$$PoPoO = 2,40$$

$$P P Po = 1,144$$

$$O O P = 1,90$$

$$P P O = 4,96$$

$$O O Po = 0,54$$

Grupo ABC

M Po P = 1,14	C15 PoP = 1,00	P M Po = 0,62
M Po O = 1,84	C15 PoO = 1,26	P M O = 2,72
M P O = 1,10		
C15 P O = 0,74		
Po P O = 1,44		
Po M P = 0,62		
Po M O = 0,78		
Po C15 O = 0,52	O M P = 2,6	
P C15 O = 1,8	O M Po = 0,78	
P Po M = 1,44	O C15 P = 1,80	
P Po C15 = 1,00	O C15Po = 0,52	
P Po O = 8,30		
O P M = 1,10	O Po M = 1,80	
O P C15 = 0,74	O Po C15 = 1,46	
O P Po = 1,44	O Po P = 8,2	

RESUMEN TRIGLICERIDOS POR INSATURACION

<u>parte sana</u>	<u>parte enferma</u>
7,88	5,19
28,93	29,43
25,75	38,18
9,05	9,41
1,74	--
<hr/> 73,35	<hr/> 82,21

D. ESTUDIO DE LOS LIPIDOS DEL ACNE JUVENIL.

Ya sabemos que el acné juvenil, es la complicación en piel lampiña de la seborrea, No sabemos que factores pueden influir en su aparición, puesto que en casos de piel seborreica aparece y en otros no. No vamos a buscar sus posibles teorías etiopatogénicas, pero si sabemos que algunos autores piensan que los ácidos grasos de cadena corta pudieran ser (2) los responsables del acné. Vamos a ver si existe alguna variación en los constituyentes lipídicos en comparación con los de la piel normal.

La extracción la realizamos de las zonas ya apuntadas en la seborrea. Lógico es de esperar que la cantidad de excreción lipídica es superior a la de la piel normal.

Area        70 cm<sup>2</sup>

Pesada     45 mg

Una vez extraídos los lípidos concentrados, realizamos una cromatografía de capa fina (CCF), obteniendo la que se detalla en la figura 7.

Se observa también la mancha intermedia de digliceril-éster-diéster entre los ésteres de colesterol y triglicéridos.

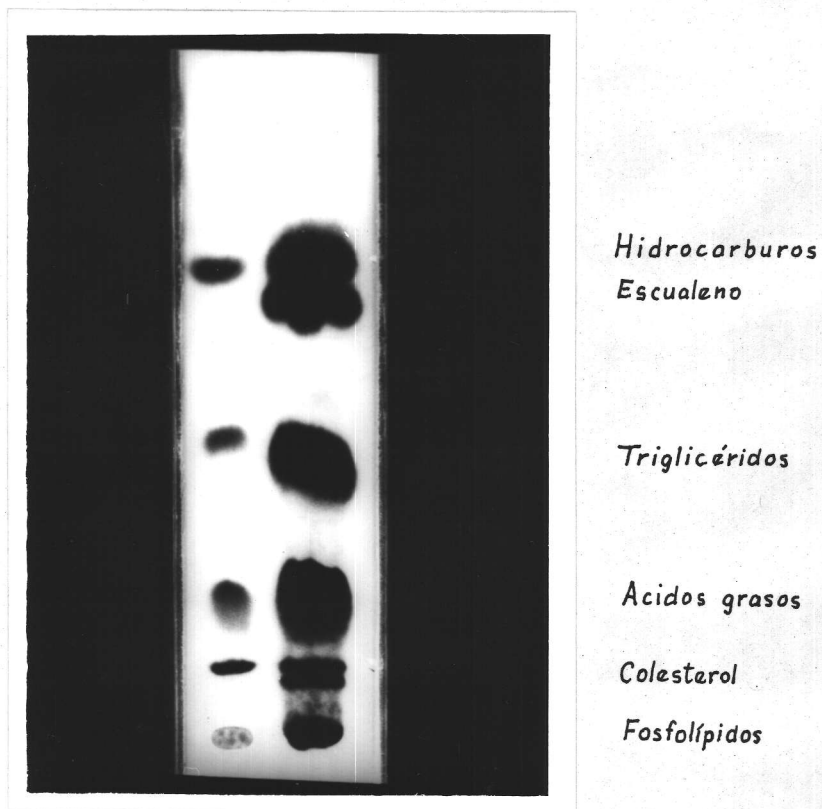


Figura 7

CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA, de Silica-Gel correspondiente al desarrollo de los lípidos del ACNE JUVENIL.

La banda izquierda corresponde a patrones. Desarrollado en éter/hexano al 20 % ( 1% de ácido fórmico).

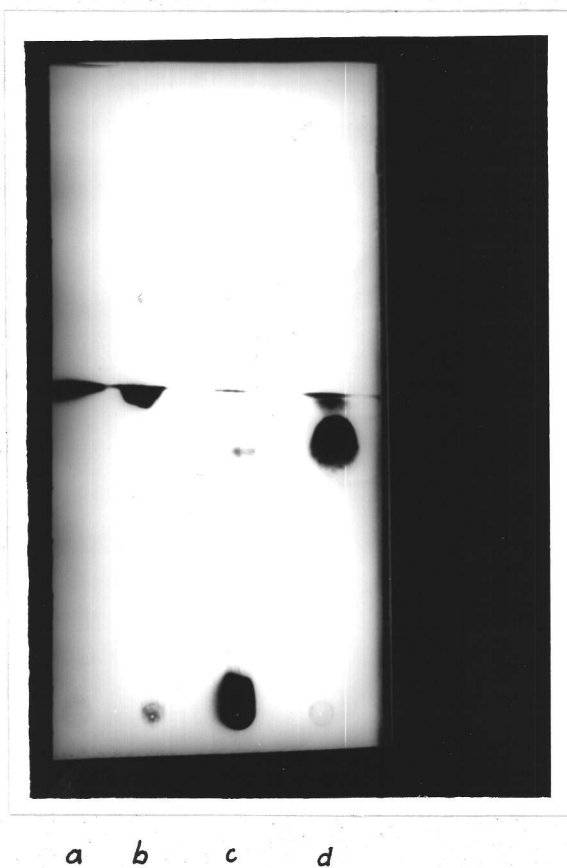


Figura 8

CROMATOGRAFIA DE CAPA FINA en Silica-Gel correspondiente a hidrocarburos y escualeno en el acné juvenil.

- a) Hidrocarburos patrones
- b) " de los lípidos de la piel (acné)
- c) Escualeno (aceite de oliva total)
- d) Escualeno, de lípidos en el acné,

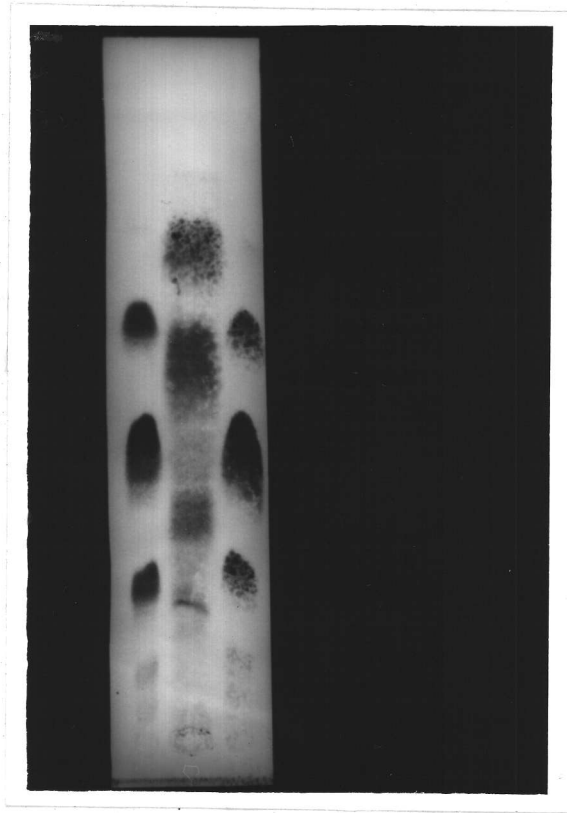


Figura .9

CROMATOGRAFIA EN PLACA FINA, de Silica-Gel con nitrato de plata, correspondiente a los triglicéridos del ACNE JUVENIL. Desarrollo en benceno.

Los lados corresponden a patrones de aceite de oliva.

En el centro los triglicéridos del acné.

Con respecto a las dos manchas superiores, hay que destacar que en este caso las proporciones de ésteres de colesterol ( b de la figura 7), es mayor que la de ceras e hidrocarburos (a, de la figura 7) invirtiéndose por ello sus proporciones con respecto a la piel normal.

Dentro de la mancha de hidrocarburos, se observan en otra cromatografía que la proporción de escualeno era muy elevada con respecto a otros compuestos. La identidad del escualeno se llevó a cabo separando los distintos componentes de la mancha, mediante CCF de Gel de sílice, recién activada a 110° C durante una hora con objeto de lograr la separación deseada. La figura 9, nos muestra la Cromatografía de las bandas obtenidas junto con los correspondientes patrones.

En el caso de los lípidos del acné no se ha llevado a cabo, debido a la pequeña cantidad de lípidos de que se disponían, su estudio completo de los triglicéridos presentes, pero si se ha hecho CCF en Gel de sílice impregnada en plata (nitrato) que se muestra en la figura 10.

La figura 10, nos muestra los cromatogramas de los ésteres de colesterol de los lípidos del Acné. Se observa que aparte de los ésteres saturados - mancha su-



perior más pequeña - existen proporciones casi iguales de ésteres unienicos y diénicos. Los patrones incluyen de arriba a abajo:

palmitato de colesterol

Oleato " "

Linoleato " "

Linolenato "

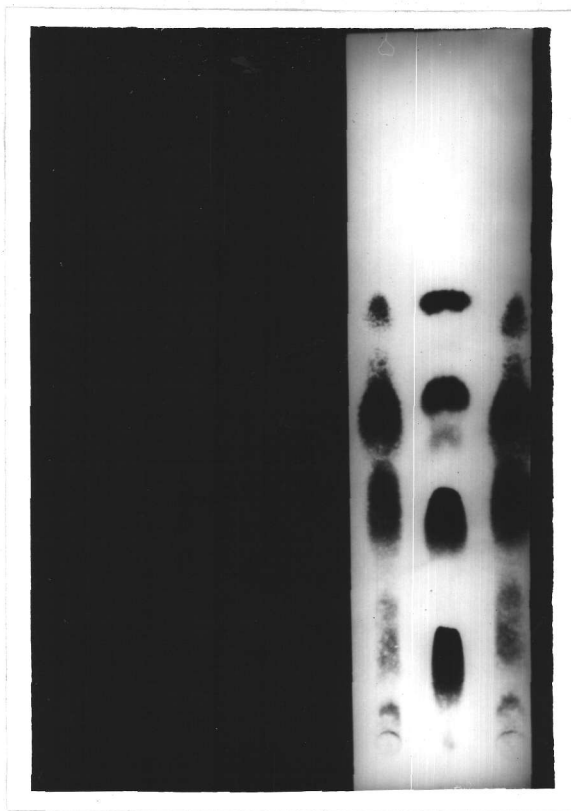


Figura 10

CROMATOGRAFIA EN PLACA FINA, en Silica-Gel y nitrato de plata, correspondiente a los esteres de colesterol, en el ACNE JUVENIL. El centro corresponde a patrones de esteres de colesterol.

Los lados a esteres de colesterol del Acné Juvenil.

Desarrollo en hexano/éter a 1/1.

ACNE JUVENIL

ACIDOS GRASOS LIBRES Y ACIDOS GRASOS TOTALES DE LOS  
TRIGLICERIDOS

	<u>Acidos grasos libre</u>	<u>Acidos grasos de Trig.</u>
La . . . .	2,2	5,4
M . . . .	8,8	11,7
C15 . . . .	8,7	8,2
A1 . . . .	2,4	3,0
P . . . .	31,6	27,8
Po . . . .	19,0	20,5
A2 . . . .	1,7	1,6
B . . . .	3,0	3,1
E . . . .	6,4	3,7
O . . . .	16,2	13,7
L . . . .	trazas	1,3
	<hr/>	<hr/>
	100	100

IDENTIFICACION DE LOS DISTINTOS ACIDOS GRASOS OBTENIDOS  
EN CROMATOGRAFIA GASEOSA.

Al mismo tiempo que son cromatografiadas las distintas muestras de ésteres metílicos problemas, se obtiene una cromatografía de una mezcla patrón que contiene los ésteres metílicos de los ácidos palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico, obtenidos artificialmente. Con ello se logra identificar estos ácidos cuanto están presentes en los problemas.

Esta misma mezcla nos da los suficientes datos para asignar un número de átomos de carbono a picos encontrados en los cromatogramas problemas y que no coinciden con los presentes en la mezcla patrón.

Es bien sabido que existe una relación lineal entre el número de átomos de carbono y el logaritmo de los volúmenes o tiempos de retención. De esta forma, como en la mezcla patrón están presentes los ácidos saturados palmítico (C16) y esteárico (C18), se puede obtener la recta que relaciona los parámetros antes indicados y mediante los tiempos de retención de los picos desconocidos (A1, A2 y B en nuestro caso) y se les puede asignar el número de átomos de carbono que teóricamente les corresponde si fueran saturados. Ver figura .

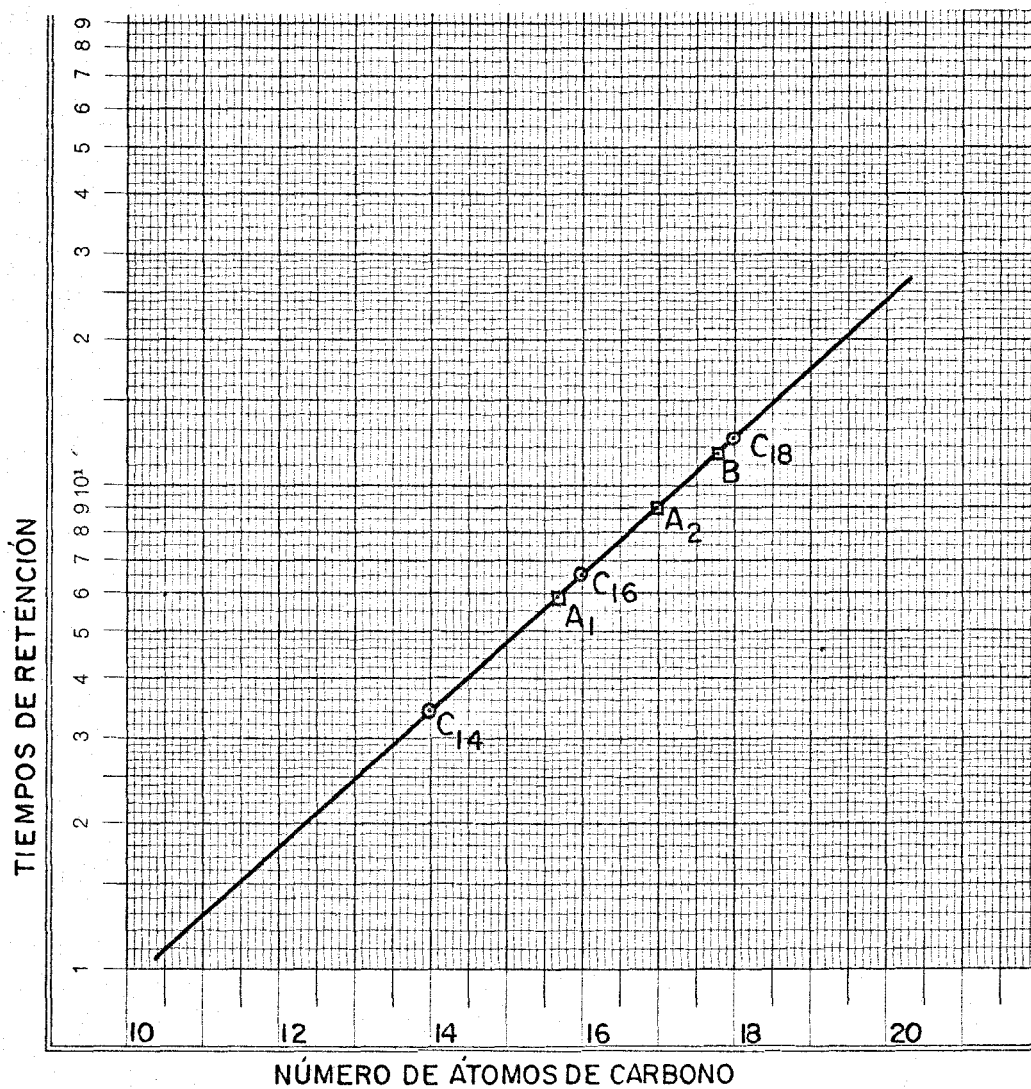


Gráfico 1

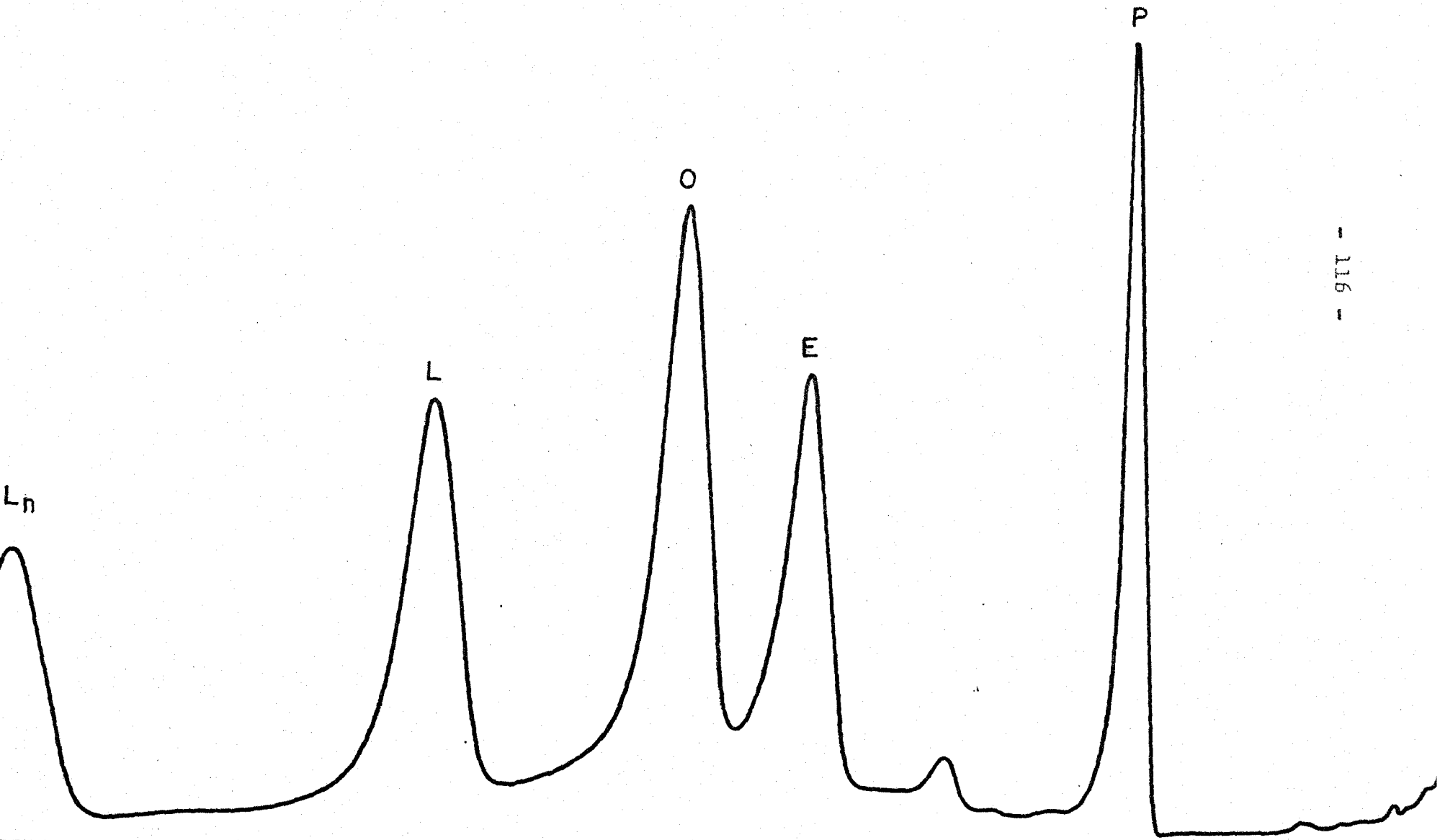
Se observará que tanto en el estudio estructural de los triglicéridos presentes en los lípidos, de la piel afectada de psoriasis como en los de la seborrea, no se hayan incluido algunos ácidos que se saben existen normalmente en la piel sana y afectada. En el primer caso, (psoriasis) no se detectaron los ácidos que no se incluyen debido a que la pequeña cantidad de lípidos extraídos, no permitió el repetir la cromatografía con cantidad suficiente para su determinación. No obstante, dado que tanto en la parte sana como en la afectada, los ácidos que se incluyen son los mismos, es más posible que todas las diferencias encontradas entre los distintos triglicéridos sean las realmente existentes en los triglicéridos presentes.

En el caso de la seborrea, los ácidos que se encuentran en proporciones muy pequeñas - aunque determinados cuantitativamente y cualitativamente - han sido eliminados de los cálculos ya que la proporción de los triglicéridos en que aquellos intervienen se encontraron en muy pequeña proporción.

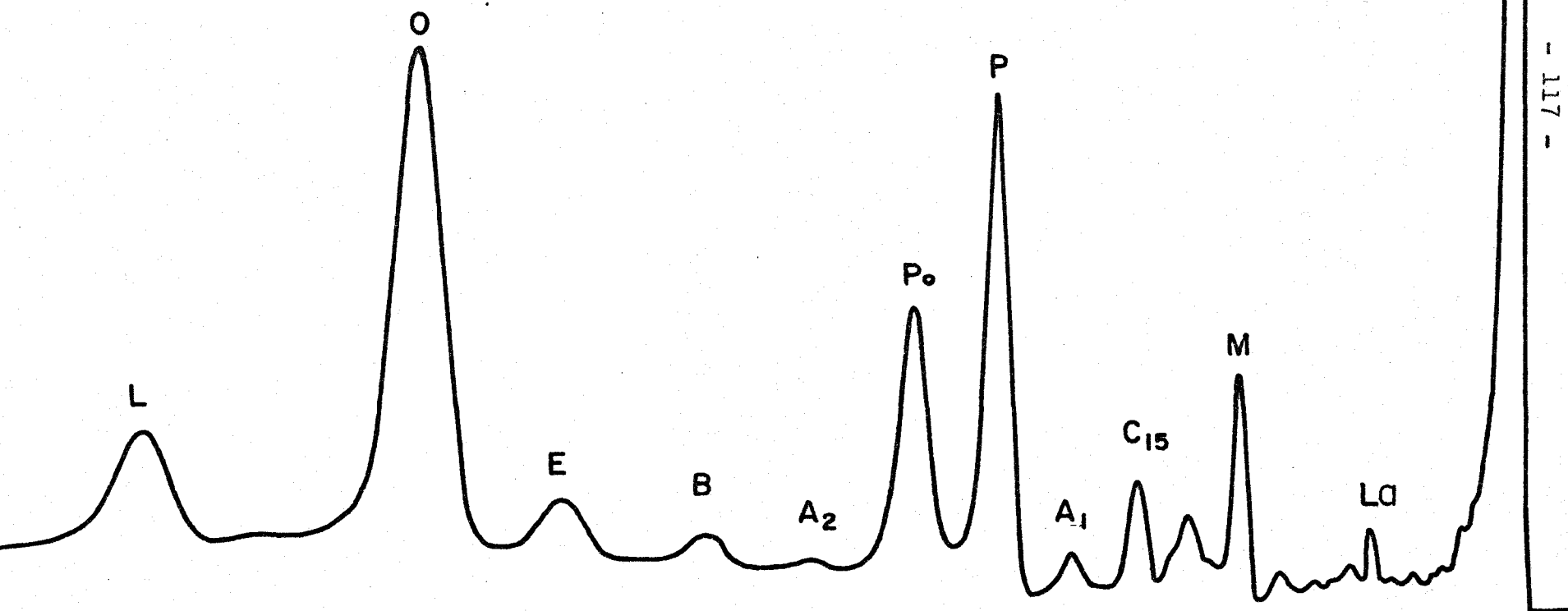
A continuación se incluyen cromatogramas de patrones de esteres metílicos, cuyo análisis se ha efectuado en idénticas condiciones que los distintos problemas, algunos de cuyos cromatogramas también se incluyen. (Laurato L, Miristato M, Palmitato P, Estearato E; Oleato O; Linoleato L; y Linolenato Ln).

PATRONES  
ESTERES METÁLICOS

D



PIEL NORMAL  
ACIDOS GRASOS TOTALES DE LOS TRIGLICÉRIDOS

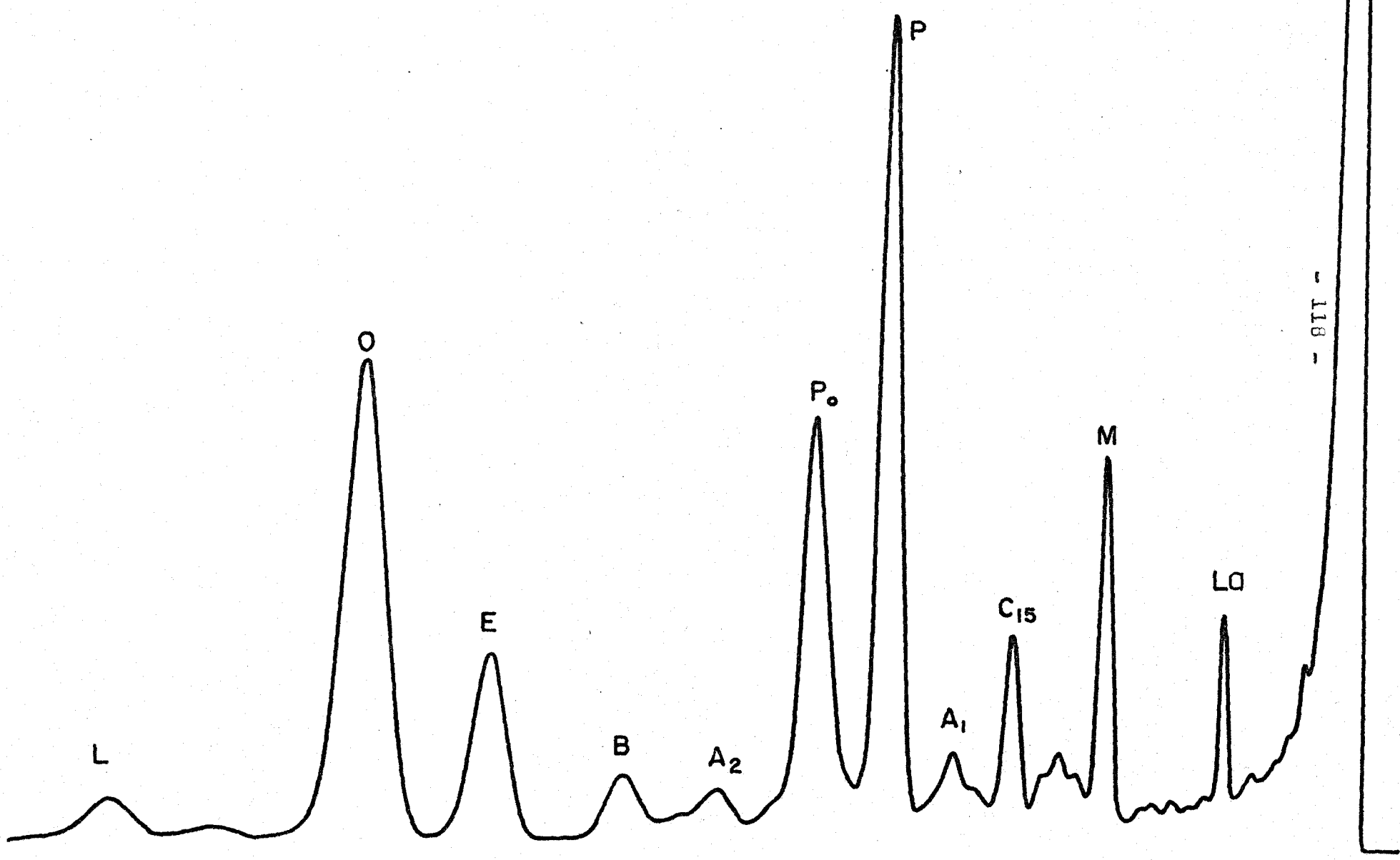


D

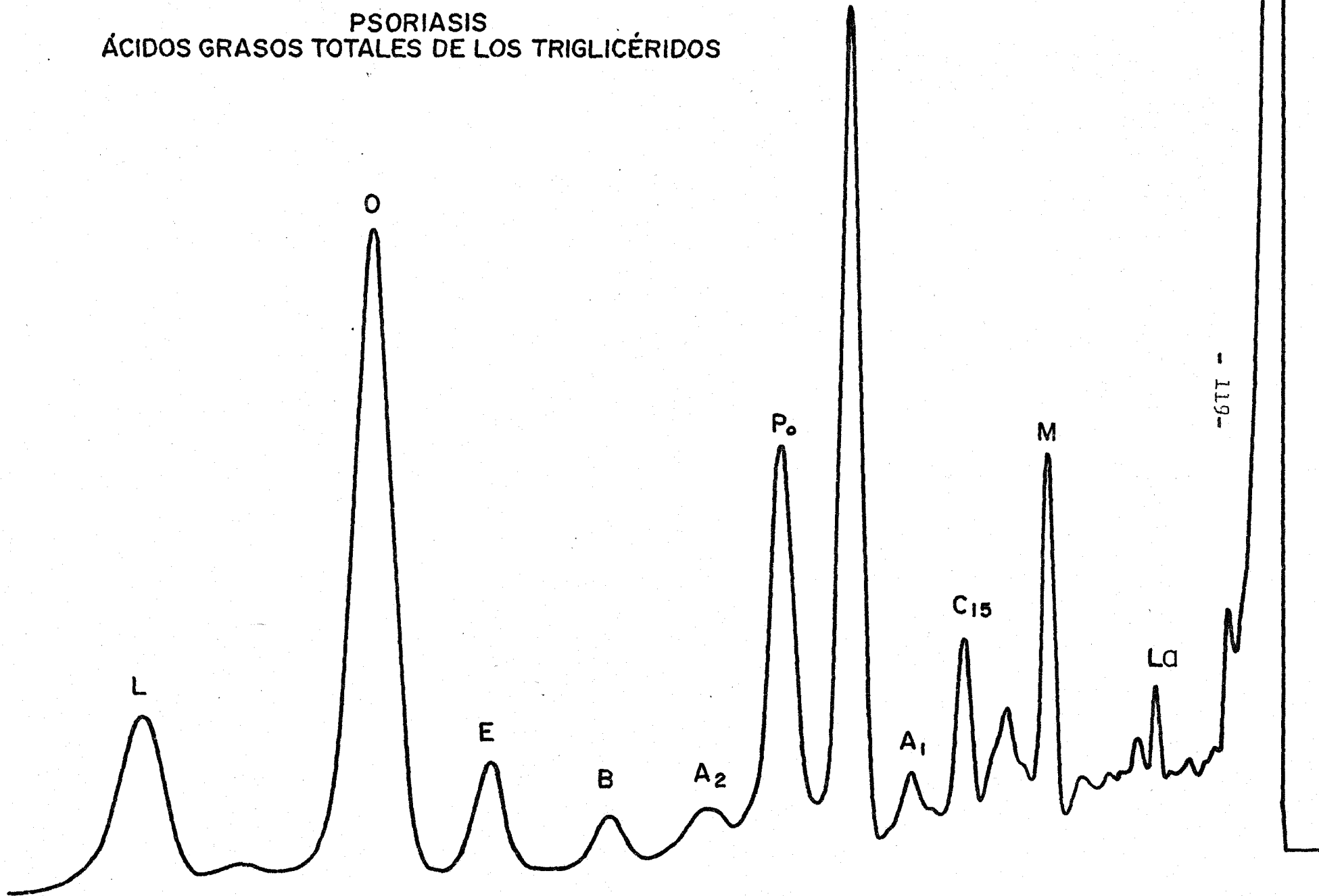
- 117 -



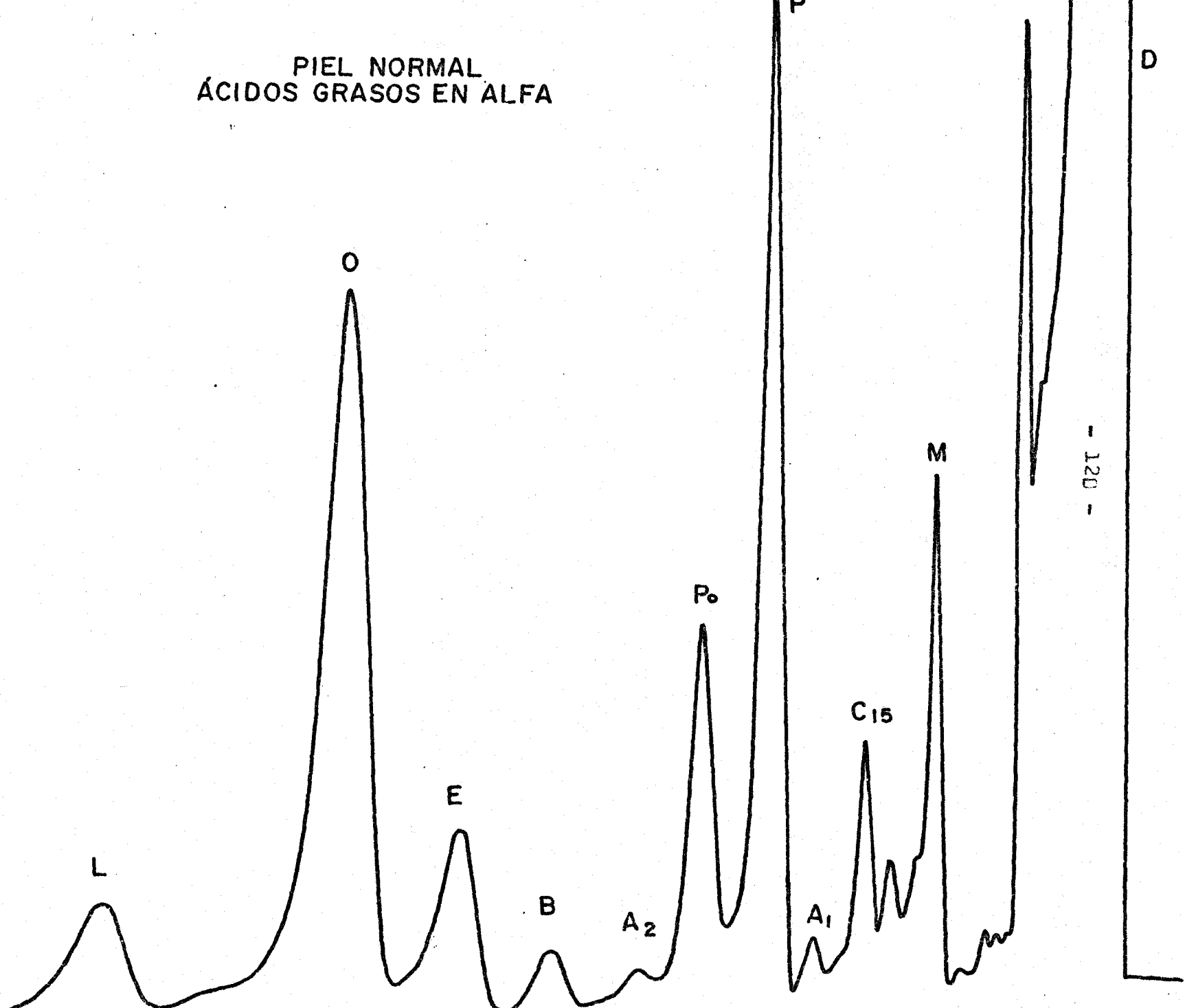
PSORIASIS  
ÁCIDOS GRASOS LIBRES DE LOS LÍPIDOS TOTALES



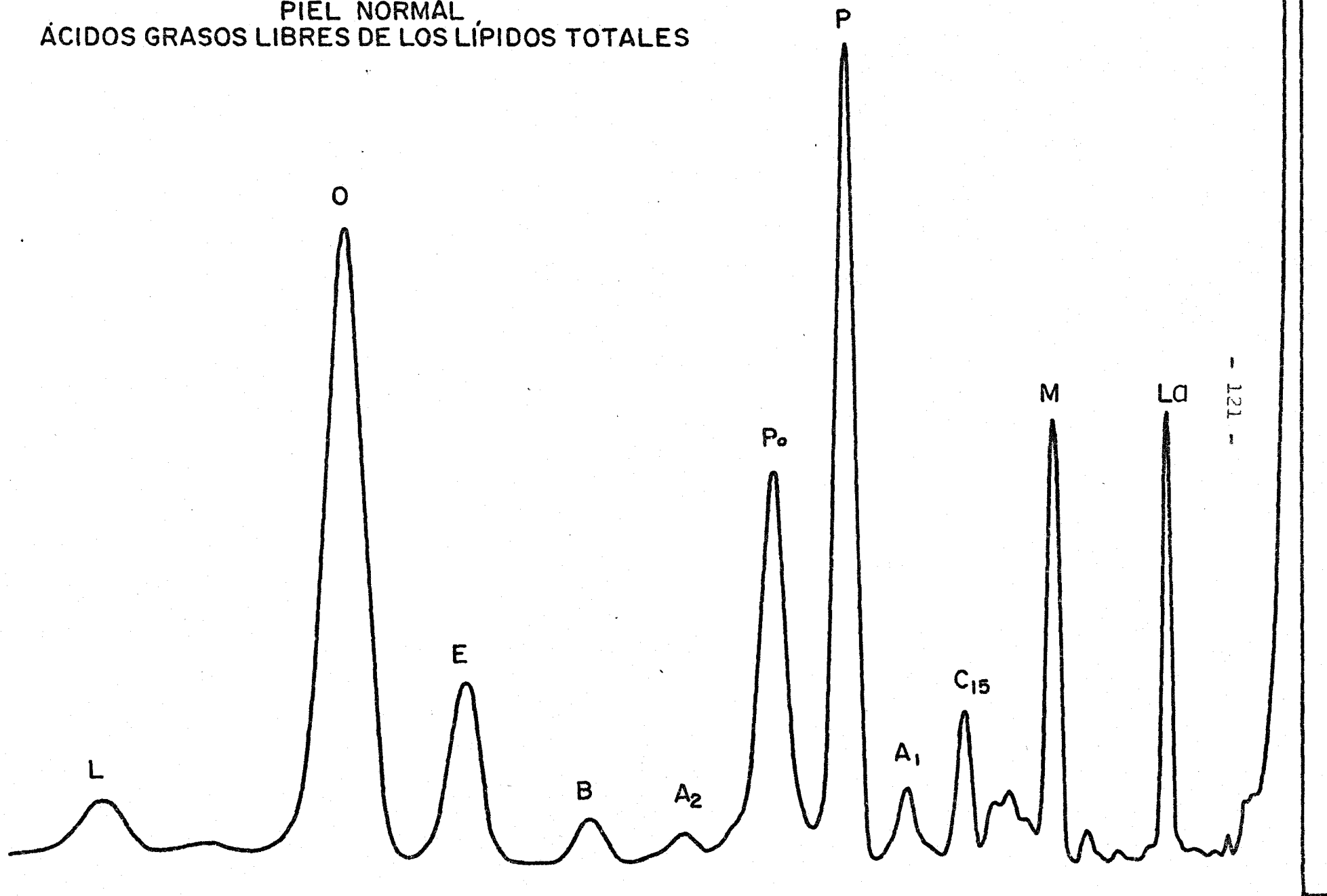
PSORIASIS  
ÁCIDOS GRASOS TOTALES DE LOS TRIGLICÉRIDOS



PIEL NORMAL  
ÁCIDOS GRASOS EN ALFA



PIEL NORMAL  
ÁCIDOS GRASOS LIBRES DE LOS LÍPIDOS TOTALES



E. ESTUDIOS DE LOS LIPIDOS CUTANEOS Y TIEMPO DE RECUPERACION DE LOS MISMOS, TRAS LAVADOS CON JABONES Y DETERGENTES.

Como en nuestra introducción advertimos, es de gran interés actual el estudio de los lípidos cutáneos tras lavados con jabones y detergentes.

Tres puntos nos interesan sobremanera :

- 1º) ¿ Existe algún cambio en los constituyentes de los lípidos cutáneos tras lavados con jabones y detergentes?
- 2º) ¿ Se recuperan todo los componentes del manto lípido de la piel tras lavados con esos agentes al mismo tiempo?
- 3º) ¿ Qué tiempo tarda en recuperarse el manto lípido?.

EXPERIENCIA : Obtenemos los lípidos con acetona de la piel de antebrazos sometidos a lavados con jabones y detergentes a los 10,30,60 y 120 minutos. Dejamos se evaporen a la temperatura ambiente y practicamos una primera cromatografía de placa fina, con las mismas cantidades de ( 15 microlitros) las extracciones realizadas en cada tiempo y como podemos observar en la fotografía 12, todos los componentes (hidrocarburos, esterés de colesterol, triglicéridos, ácidos grasos libres, colesterol y fosfolípidos) que existen en la piel normal se mantienen y todos se

recuperan al mismo tiempo.

Detalle curioso : Observamos una recuperación bastante grande en los dos primeros tiempos, mientras que en los restantes se produce una caída de la recuperación del manto lípido.

Como vemos no existe alteración de los constituyentes y sí en el tiempo de recuperación.

A continuación exponemos las experiencias con los diversos tiempos de extracción y sus determinaciones con el ácido hidroxámico.

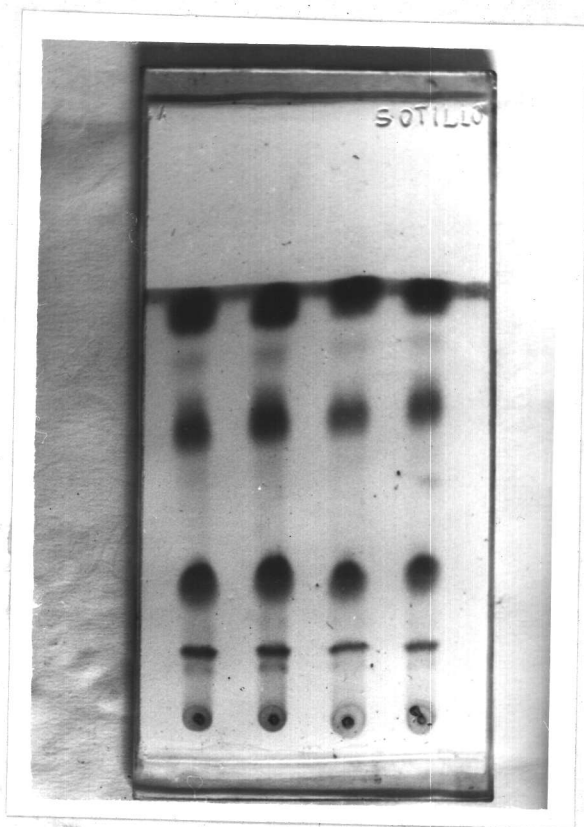


Figura 11

CROMATOGRAFIA DE CAPA FINA, en Silica-Gel correspondiente al desarrollo en E/H al 20% + 1 c.c. de HCl, de los lípidos totales de la piel, tras lavados con jabones y detergentes en cuatro tiempos.

ENSAYOS CON LOS JABONES L59, 150, P-10 Y NORMAL.

CON EL 159

Primer ensayo

<u>Curva de calibrado</u>		<u>Muestras</u>		
Absorbancia	Tiempos	Absorbancia	meq. éster	
10 $\mu$ l	0.168	16 min.	0.108	0.30
20 $\mu$ l	0.288	20 "	0.137	0.43
30 $\mu$ l	0.408	24 "	0.122	0.35
40 $\mu$ l	0.510	28 "	0.123	0.35
		32 "	0.175	0.57
		Blanco	0.185	0.63

Segundo ensayo

10 $\mu$ l	0.170	10 min.	0.167	0.52
20 $\mu$ l	0.292	20 "	0.125	0.30
30 $\mu$ l	0.402	30 "	0.135	0.34
40 $\mu$ l	0.510	40 "	0.130	0.32
		Blanco	0.242	0.86

Tercer ensayo

10 $\mu$ l	0.148	10 min.	0.107	0.31
20 $\mu$ l	0.262	20 "	0.092	0.28
30 $\mu$ l	0.365	30 "	0.094	0.29
40 $\mu$ l	0.470	40 "	0.112	0.32
		Blanco	0.248	0.96



Cuarto ensayo

10 $\mu$ l	0.175	10 min.	0.143	0.32
20 $\mu$ l	0.290	30 "	0.116	0.18
30 $\mu$ l.	0.405	55 "	0.122	0.26
40 $\mu$ l	0.470	65 "	0.164	0.42
		75 "	0.188	0.58
		Blanco derecho	0.253	0.82
		" izdo.	0.285	0.98

Detergente 150

Primer ensayo

10 $\mu$ l	0.188	10 min.	0.180	0.46
20 $\mu$ l	0.308	30 "	0.275	0.84
30 $\mu$ l	0.460	60 "	0.230	0.64
40 $\mu$ l	0.540	80 "	0.250	0.72
		120 "	0.200	0.54
		Blanco	0.255	0.72

Segundo ensayo

10 $\mu$ l	0.168	10 min.	0.093	0.20
20 $\mu$ l	0.308	30 "	0.120	0.26
30 $\mu$ l	0.420	60 "	0.085	0.18
40 $\mu$ l	0.495	80 "	0.148	0.42
		120 "	0.182	0.60
		Blanco izdo.	0.230	0.74

DETERGENTE P-10

Primer ensayo

10 $\mu$ l	0.200	10 min.	0.112	0.16
20 $\mu$ l	0.350	30 "	0.117	0.18
30 $\mu$ l	0.440	60 "	0.117	0.18
40 $\mu$ l	0.480	80 "	0.118	0.19
		120 "	0.175	0.40
		Blanco derecho	0.220	0.58
		Blanco izdo.	0.205	0.52

Segundo ensayo

10 $\mu$ l	0.180	10 min.	0.160	0.35
20 $\mu$ l	0.250	30 "	0.145	0.31
30 $\mu$ l	0.350	60 "	0.140	0.30
40 $\mu$ l	0.410	80 "	0.118	0.18
		120 "	0.190	0.45
		Blanco derecho	0.340	0.90
		" izdo.	0.410	1.10

DETERGENTE NORMAL

Primer ensayo

10 $\mu$ l	0.190	10 min.	0.085	0.02
20 $\mu$ l	0.320	30 "	0.080	0.02
30 $\mu$ l	0.410	60 "	0.075	0.01
40 $\mu$ l	0.510	80 "	0.070	0.01
		120 "	0.140	0.26
		Blanco	0.160	0.36

Segundo ensayo

10 $\mu$ l	0.192	10 min.	0.090	0.03
20 $\mu$ l	0.032	30 "	0.087	0.02
30 $\mu$ l	0.400	60 "	0.080	0.01
40 $\mu$ l	0.490	80 "	0.997	0.04
		120 "	0.158	0.35
		Blanco	0.165	0.42

En estos ensayos hemos realizado la curva de Calibrado para mayor seguridad. Como se indica en cada ensayo se toman 10,20,30 y 40  $\mu$ l de la solución de miristato de metilo que lleva 126,3 mg de ester en 10 ml de benceno. Como el peso meolecular del miristato de metilo es de 242.4, la solución patrón lleva 0.52 micromoles de éster por 10 microlitros.

A continuación exponemos una gráfica correspondiente a los valores medios obtenidos de los diversos jabones ensayados. Como se observará en los ensayos del primer jabon 159 hemos ido haciendo un tanteo de tiempo de ahí sus 4 ensayos, para luego determinar siempre los mismos tiempos.

Ver Gráfico II

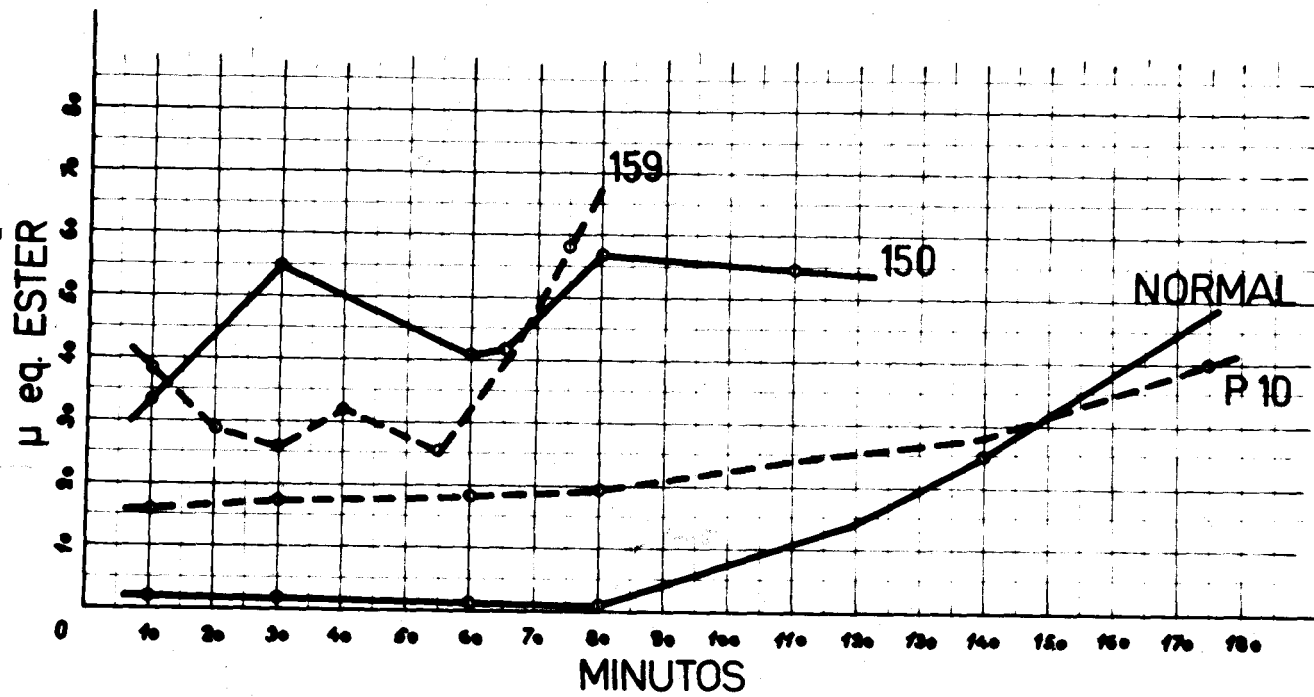


Gráfico 2

C O N C L U S I O N E S

- 1). En piel normal no hemos destacado diferencia alguna, con respecto a los hallazgos realizados anteriormente.
- 2). En la enfermedad de PSORIASIS, hemos observado menor cantidad de Lípidos Totales en parte enferma que en parte sana. Creemos que como en esta enfermedad existe un fenómeno de PARAQUERATOSIS, y teniendo en cuenta que el proceso de QUERATINIZACION normal, no se produce, los lípidos totales disminuyen al no producirse el desprendimiento de las células córneas, que como ya hemos indicado constituyen parte, por degeneración de los lípidos de la piel.
- 3). Cualitativamente, los lípidos de un enfermo de PSORIASIS, se manifiestan de la misma forma en piel sana y afectada.
- 4). Destacamos en cambio, un aumento de LIPIDOS TOTALES en la SEBORREA Y ACNE JUVENIL.

En cuanto a los ACIDOS GRASOS LIBRES, destacan las siguientes consideraciones :

- 5). El ácido palmitico-oleico, permanece prácticamente igual en el PSORIASIS.
- 6). El ácido esteárico, por el contrario aumenta en proporción en el PSORIASIS, pasando de 8,3 a 16,2%.
- 7). El ácido oléico, disminuye en el PSORIASIS, bajando de 31 % en piel normal a 20,5 %.

- 8). Es curioso que estas alteraciones en el PSORIASIS, las encontremos en los enfermos de hasta 30 años, ya que en las restantes edades no podemos pensar del mismo modo, pues aunque hay una disminución de ácido oleico, es menor y en cambio en personas afectadas de PSORIASIS de más de 50 años existe un aumento de éste ácido ( de 18,2 a 32,0 %)
- 9). En el ACNE Y SEBORREA, el ácido palmitico-oleico aumenta considerablemente con respecto a la piel sana; pasando de 10 a 19 y 26,9 % respectivamente.
- 10). En estas enfermedades, el ácido esteárico, no sufre alteración con respecto a la piel normal.
- 11). El ácido oléico, disminuye igual que en PSORIASIS, en las enfermedades anteriores, pasando de 31 a 16,2 y 21 % respectivamente.

En cuanto a los ACIDOS GRASOS TOTALES DE LOS TRIGLICERIDOS destaca :

- 12). En el PSORIASIS, permanecen prácticamente iguales en piel sana y enferma.
- 13). En el ACNE y SEBORREA, el ácido oleico de los triglicéridos, disminuye su contenido con respecto a piel normal.
- 14). Parece deducirse de las anteriores consideraciones que las alteraciones sufridas por los ácidos grasos son independientes de las sufridas por otros ácidos en los



triglicéridos; es lógico, si se piensa que aquellos juegan un papel bioquímico posiblemente diferentes al de la grasa neutra. (triglicéridos).

En cuanto a los TRIGLICERIDOS, observamos :

- 15). El estudio de la tabla que reúne los triglicéridos por grupos de dobles enlaces, nos indica que hay una clara disminución de los triglicéridos más insaturados en el PSORIASIS, e incluso llegan a desaparecer los que contienen 4,5 y 6 dobles enlaces en sus moléculas.
- 16). En el caso de la SEBORREA, sólo es digno de destacar la desaparición de los triglicéridos con cuatro dobles enlaces, habiendo por el contrario una elevación considerable de los que contienen dos dobles enlaces (del 25,75% pasa a 38,18%). Este aumento de los triglicéridos con dos dobles enlaces, así como los de un doble enlace ocurre ciertamente en el PSORIASIS, aunque en una proporción menor.
- 17). Es interesante resaltar la existencia de gliceril-éter-diéster en los lípidos del ACNE Y SEBORREA. Esta es la primera observación de la existencia de este producto en la SEBORREA.
- 18). Observamos sobre todo en el ACNE Y SEBORREA, la riqueza de los hidrocarburos en comparación con piel sana o normal, destacando la existencia de escualeno.

- 19). En la piel sometida a la acción de JABONES y DETERGENTES se observa que ningún constituyente del manto lípido se altera.
- 20). Que todos estos componentes se recuperan al mismo tiempo.
- 21). Que a los diez minutos de practicados los lavados, la piel recupera de un 40 a un 50 % del manto lípido, en respuesta fisiológica a la pérdida experimentada.
- 22). Posteriormente se produce una parada e incluso un descenso del manto lípido, que dura a veces hasta los 60-80 minutos.
- 23). Observamos que el manto lípido de un brazo y otro no es el mismo, comprobado con la prueba realizada con el blanco.
- 24). El tiempo de recuperación se realiza entre los 120 y 150 minutos.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- David I. Wilkinson y E. Farber.- The Journal of Investigative Dermatology 49 (1969) 526.
- 2.- Strauss, J. Kligman, A.M.- Archiv. Dermatol. 82 (1960) 791-98.
- 3.- W.F. Lever. Editorial Científico-Médica (1964) 13-27
- 4.- J. Morelle.- Perfumery, Cosmetic, Savons 5 (1962) 482-90.
- 5.- R.M.B. Mackenna, V.R. Wheatley y A. Wormall.- Bioquímica 7 (1952) 52-161
- 6.- Nicolaides y Kellum.- J. Am. Oil Chemists Soc. 42 (1965) 685.
- 7.- F. Zehender.- Hel. Chim. Acta 29 (1946) 973
- 8.- Rothéman.- Fisiología y Bioquímica de la piel. Prensa Universidad Chicago (1952) 52-54.
- 9.- Nicolaides, Reiss, Langdon.- Sociedad Química Americana 77 (1955) 1535.
- 10.- D.B. Windhorst y Foster.- Investigative Dermatology 29 (1957) 339.
- 11.- H. Sobel, J. Marmorston, E.T. Wright y E. Garcia.- Investigative Dermatology 29 (1957) 269.
- 12.- Grasas, Jabones y Pinturas 61 (1959) 188
- 13.- R.A. Brown, Young, Nicolaides.- Anal. Chem. 26 (1954) 1653.

- 14.- E. Haahti y T. Nikkari.- Acta Chem. Scan. 17 (1963) 536.
- 15.- Esben Kirk.- Journal of Gerontology 3 (1948) 251-65.
- 16.- J.E. Kirk, M.D. and M. Chieffi, M.D.- Journal of Investigative Dermatology 27 (1956) 15-17.
- 17.- Wilkinson y Farber.- The Journal of Investigative Dermatology 52 (1969) 339.
- 18.- Gara, Estrada, Rothman, Lorinz.- Journal of Investigative Dermatology 43 (1964) 559.
- 19.- E. Haahti, T. Nikkari.- Acta Chem. Scand. 18 (1964) 671-80.
- 20.- E. Kirk y H. Efferson, M.D. - Journal of Investigative Dermatology 22 (1954) 257.
- 21.- B. López.- Actas Dermo-Sifilográficas 38 (1947) 1261.
- 22.- D. Wilkinson, E. Farber.- The Journal Investigative Dermatology 49 (1967) 526-36.
- 23.- E. Haathi, y T, Nikkari.- Acta Chem. Scand. 17 (1963) 538.
- 24.- J. Vilella, - Archivos Facultad de Medicina de Zaragoza 1 (1961) 22.
- 25.- Nicolaidis y Kellum. - The Journal of the American Oil Chemists' Society 42 (1965) 74.
- 26.- F. Stahl.- Thin Layer Chromatography. A Laboratory Handbook, 2nd Edition, 1969.- Springer-Verlag, Berlin.

- 27.- F.H. Mattson y E.S. Lutton.- J. Biol. Chem. 233 (1958) 868.
- 28.- P. Desnuelle y P. Savory.- Rev. Franç. Corps Gras 5 (1958) 493 y J. Lipids 4 (1963) 369.
- 29.- E. Haahti y T. Nikkari.- Acta Chem. Scand. 17 (1963) 536.
- 30.- C.B. Barrett, M.S.J. Dallas y F.B.P. Padley.- Chem. Ind. (1962) 1050.

#### TEXTOS CONSULTADOS

- "Dermatologia" Robert Degos. Editions Medicales Flammarion.  
Tomo I.
- "Dermatologia" Prof. Gay Prieto. 6ª Edición.-Editorial Científico-Médica.
- "Enciclopedia Medico-Quirúrgica" Tomo de Dermatología.
- "Chromatography Methods". Chapman Hall 1963.- Stock R. y Rice C.B.F.
- "Cromatografía de Capa Fina". Kurt Randerath.-Ediciones Urmo.
- "Enciclopedia de la Química Industrial". Tomo 8.