

PRÁCTICO N° 5 COLESTEROL

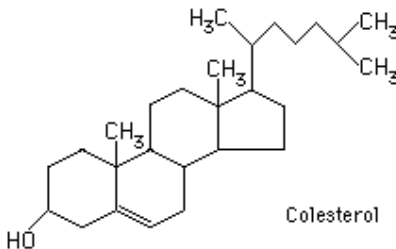
I. - INTRODUCCIÓN

Las grasas (o lípidos) son los compuestos con los que el cuerpo humano almacena energía para las épocas de carencia.

Evolutivamente, el cuerpo humano es "almacenador de energía", es decir, está diseñado para acumular parte de la energía que absorbe por los alimentos para épocas de ayuno. La forma más eficaz de almacenar esta energía es en forma de grasas, que son muy ligeras por lo que en poco peso de grasa se puede acumular mucha energía.

Los lípidos se clasifican en dos grupos principales: simples y complejos. Los lípidos simples más importantes son el **colesterol** y los **ácidos grasos**; dentro de los lípidos complejos se pueden mencionar los **fosfolípidos** y los **triglicéridos**.

El colesterol es una grasa presente en todas las células del organismo. Se presenta en altas concentraciones en la médula espinal, páncreas y cerebro pero se sintetiza principalmente en el hígado y en el intestino delgado. Aproximadamente el 50% de las necesidades de colesterol son sintetizadas en el hígado mientras que el resto se obtiene de los alimentos de origen animal presentes en la dieta.



En la molécula de colesterol se puede distinguir una cabeza polar constituida por el grupo hidroxilo y una cola o porción apolar formada por los distintos ciclos y los sustituyentes alifáticos. Así, el colesterol es una molécula hidrofóbica que al igual que otros lípidos es bastante soluble en disolventes apolares como el cloroformo, acetona y éter. Considerando lo anterior, cualquier método de extracción de lípidos requiere utilizar mezclas de solventes orgánicos que permitan solubilizar todos los lípidos y precipiten proteínas e hidratos de carbono para su mejor separación.

Los organismos mamíferos obtienen colesterol a través de dos vías:

- **Vía exógena** o absorción de colesterol contenido en los alimentos. El colesterol se encuentra exclusivamente en alimentos de origen animal, mayoritariamente en la yema de huevo, hígado, lácteos, cerebro (sesos) y músculo esquelético (carne roja).
- **Vía endógena** o síntesis de colesterol en las células animales a partir de su precursor, el acetato, en su forma activada acetil-coenzima A.

La producción de colesterol es regulada directamente por la concentración del colesterol presente en las células, habiendo una relación inversa con los niveles plasmáticos de colesterol. Una alta ingesta de colesterol en los alimentos conduce a una disminución neta de la producción endógena y viceversa.

Además del papel en la reserva energética que cumple el colesterol, es imprescindible para la vida por numerosas funciones:

- **Estructural:** es un componente muy importante de las membranas plasmáticas de los animales (en general, no existe en los vegetales).
- **Precursor de la vitamina D:** esencial en el metabolismo del calcio.
- **Precursor de hormonas sexuales:** progesterona, estrógenos y testosterona.
- **Precursor de las sales biliares:** esenciales en la absorción de algunos nutrientes lipídicos y vía principal para la excreción de colesterol corporal.

El mayor inconveniente que tiene la grasa es que no se disuelve en agua, y por lo tanto, no puede transportarse como tal por el torrente sanguíneo. Para poder transportar las partículas de grasa, el cuerpo utiliza unas moléculas más complejas llamadas **lipoproteínas**, que están formadas por una parte proteica y una parte lipídica compuesta por distintos tipos de grasas.

Existen varios tipos de lipoproteínas en función del contenido proteico y lipídico que contienen. Los dos tipos de lipoproteínas que contienen colesterol son:

- **LDL:** compuestas principalmente por colesterol y una proteína llamada apoB. Es la forma en que el organismo recoge el colesterol del hígado (donde lo sintetiza) y lo distribuye a los tejidos. El 70% del colesterol que circula por la sangre lo hace en forma de LDL-colesterol. Éste es el **colesterol malo**, responsable de la aterosclerosis, o acumulación del colesterol en la pared de las arterias.
- **HDL:** compuestas principalmente por colesterol y una proteína llamada apoA. Estas partículas contienen el denominado **colesterol bueno**, porque transportan el exceso de colesterol desde los tejidos hasta el hígado.

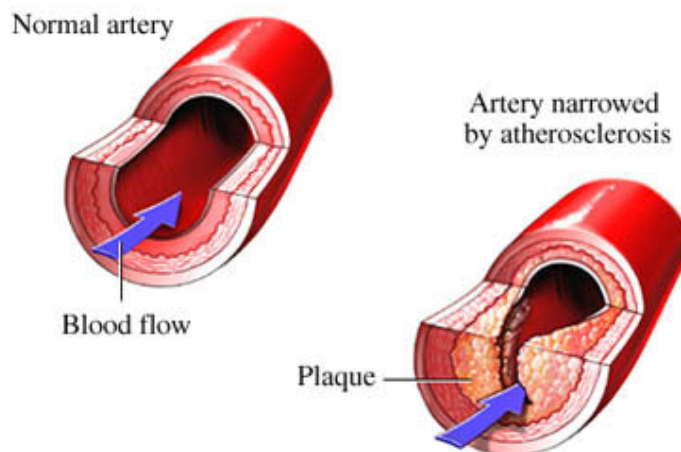
Actualmente se reconoce ampliamente el papel causal del colesterol presente en las lipoproteínas de baja densidad (LDL) en la patogenia de la aterosclerosis. De esta manera, la existencia sostenida de niveles elevados de colesterol LDL (popularmente conocido como "colesterol malo") por encima de los valores recomendados, incrementa el riesgo de sufrir eventos cardiovasculares (principalmente infarto de miocardio agudo). De manera interesante, el colesterol presente en las lipoproteínas de alta densidad (HDL) ejercería un rol protector del sistema cardiovascular, que por ello se conoce como "colesterol bueno".

La concentración actualmente aceptada como normal de colesterol en el plasma sanguíneo llamada **colesterolemia** de individuos sanos es de 150 a 200 mg/100 ml.

Se ha definido clínicamente que los niveles de colesterol plasmático total (suma de colesterol presente en todas las clases de lipoproteínas) recomendados por la Sociedad Norteamericana de Cardiología (AHA) son:

- **Colesterolemia por debajo de 200 mg/dL:** es la concentración deseable para la población general, pues por lo general correlaciona con un bajo riesgo de enfermedad cardiovascular.
- **Colesterolemia entre 200 y 239 mg/dL:** existe un riesgo intermedio en la población general, pero es elevado en personas con otros factores de riesgo como diabetes.
- **Colesterolemia mayor de 240 mg/dL:** puede determinar un alto riesgo cardiovascular y se recomienda iniciar un cambio en el estilo de vida, sobre todo en lo concerniente a la dieta y al ejercicio físico.

La aterosclerosis es un fenómeno muy complejo, que comienza en las primeras etapas del desarrollo y se prolonga durante años. Consiste en el depósito de células cargadas de partículas de LDL-colesterol en las paredes de las arterias. Esta pared responde a la agresión induciendo una respuesta protectora, que finalmente conduce a la formación de una placa. Con el paso del tiempo, la placa aumenta de tamaño, hasta que estrecha la arteria dificultando la circulación de la sangre. Por otra parte, la placa también se puede romper, originando un trombo que puede obstruir completamente la arteria. Al final del proceso el corazón se ve privado de oxígeno y nutrientes por lo que se produce una angina o infarto de miocardio.



La aterosclerosis está directamente relacionada con la concentración de partículas de LDL-colesterol presentes en la sangre, por lo que la prevención pasa por disminuir al máximo el nivel de LDL y aumentar el HDL-colesterol, que es el que retira el colesterol circulante y lo devuelve al hígado.

La forma de conseguir estos objetivos es adoptar hábitos de alimentación adecuada, realizar ejercicio físico habitualmente y cuando esto no es suficiente, se debe recurrir a fármacos específicos.

En este trabajo práctico estudiaremos el contenido de colesterol contenido en la yema de huevo de gallina. La yema representa entre el 30 - 40% del peso total del huevo y la cantidad de colesterol aproximada (por yema de huevo) es de 250 mg.

- Masa de la yema de huevo: _____
- Masa del huevo entero: _____

II. - Objetivos

- Conocer un método efectivo de extracción de lípidos con solventes orgánicos.
- Determinación de colesterol presente en la yema de huevo.

III. - PARTE EXPERIMENTAL

1. Curva de Calibración (ó Curva Estándar)

Objetivo:

- Desarrollar una curva de calibración que permita relacionar la cantidad de sustrato (colesterol) con la Absorbancia.

Procedimiento:

a) Desarrolle el siguiente protocolo:

- A partir de distintas soluciones patrón de colesterol de concentraciones conocidas realice las diluciones indicadas en la siguiente tabla:

Reactivos	TUBOS					
	1	2	3	4	5	6
	Blanco	Patrón 1	Patrón 2	Patrón 3	Patrón 4	Patrón 5
Patrón Colesterol	-----	6,0 mL	6,0 mL	6,0 mL	6,0 mL	6,0 mL
Ác. sulfúrico H ₂ SO ₄	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL

- b) Tape los tubos con tapa y parafilm.
- c) Homogenice las soluciones por inversión suave.
- d) Desarrolle el color durante 25 minutos a temperatura ambiente.
- e) Determine la Absorbancia de cada tubo, leyendo en espectrofotómetro a 540 nm de longitud de onda (utilice el tubo N° 1 (blanco) para calibrar el equipo a cero.

f) Anote las lecturas en la siguiente tabla:

	Blanco	Patrón 1	Patrón 2	Patrón 3	Patrón 4	Patrón 5
Absorbancia (540 nm)	0,00					

g) Con los datos anteriores complete la siguiente tabla:

CURVA DE CALIBRACIÓN	Patrón 1	Patrón 2	Patrón 3	Patrón 4	Patrón 5
Colesterol (mg)	0,75	1,5	2,25	3,0	3,75
Absorbancia					

h) Realice un gráfico (curva de calibración) de Absorbancia versus concentración de colesterol.

2. Extracción de colesterol con solventes orgánicos

1. Mase aproximadamente entre 0,1 - 0,15 g de yema de huevo en un vaso precipitado de 100 mL.
2. Agregue 10 mL de una mezcla acetona/éter (1:1) y agite con la varilla de vidrio por 10 minutos.
3. Trasvasije el contenido a un tubo de centrifuga y centrifugue por 5 minutos a 3000 rpm.

3. Determinación de colesterol total

1. Prepare un tubo blanco adicionando 6 mL de $FeCl_3$.
2. Rotule otros dos tubos de ensayo (1 y 2) y adicione a cada uno de ellos 0,5 mL del sobrenadante proveniente de la extracción de la yema de huevo.
3. Evapore a sequedad en un baño de agua termorregulado a $60^\circ C$.
4. Agregue 6 mL de solución de $FeCl_3$ a cada tubo (1 y 2) y caliente en baño de agua a ebullición por 5 minutos, incluya el tubo blanco.
5. Enfríe y agregue 2 mL de H_2SO_4 concentrado por la pared de cada tubo.
6. Tapar los tubos con tapa y parafilm.
7. Homogenice las soluciones por inversión suave.
8. Desarrolle el color durante 25 minutos a temperatura ambiente.

9. Determine la Absorbancia de cada tubo, leyendo en espectrofotómetro a 540 nm de longitud de onda, utilice el tubo blanco para calibrar el equipo a cero.

Tubo N°	1	2
Absorbancia 540 (nm)		

10. Con los datos anteriores, interpole los valores de Absorbancia en la curva de calibración para obtener la concentración de colesterol y complete la siguiente tabla:

	1	2
Colesterol (mg)		

11. A continuación desarrolle los siguientes cálculos:

- a) Sabiendo que el volumen de sobrenadante en total es de aproximadamente 10 mL, determine los mg de colesterol en el volumen total de muestra.
- b) Considerando la masa promedio de una yema de huevo, determine los mg de colesterol por 100 mg de yema de huevo.
- c) Determine el % de colesterol presente en el huevo, tomando en cuenta una masa total promedio de huevo.