



CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

BIOQUÍMICA II

LABORATORIO

PRACTICA:

CARACTERIZACION PARCIAL DE LIPIDOS I

ALUMNO:

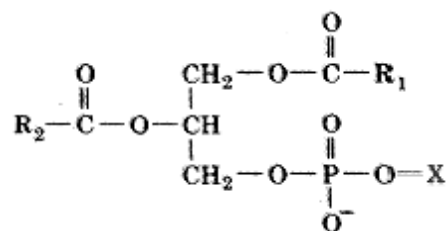
GRUPO

09 – JUN– 2002

INTRODUCCION

Los **fosfolípidos** comprenden los siguientes grupos:

Estructura General



- **Ácido Fosfatídico y fosfatidilgliceroles.** El ácido fosfatídico es importante como intermediario en la síntesis de triacilgliceroles y fosfolípidos, pero no se encuentra en grandes cantidades en los tejidos.

(estructura general +)– H

- **Fosfatidilcolina** (Lecitina). Las lecitinas contienen glicerol y ácidos grasos como las grasas simples, pero además poseen ácido fosforito y colina. Las lecitinas se hallan ampliamente distribuidas en las células del organismo, en donde tienen funciones metabólicas y estructurales en las membranas.

(estructura general +) – $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$

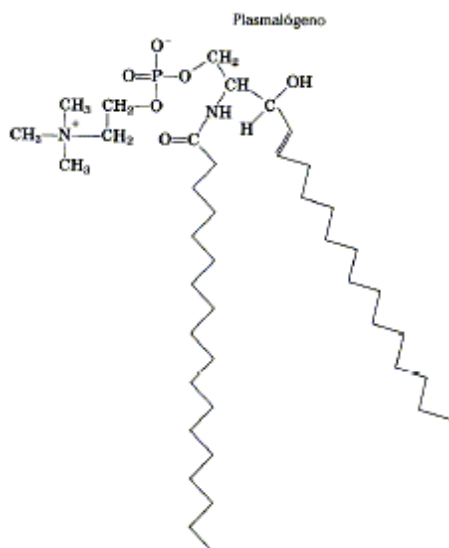
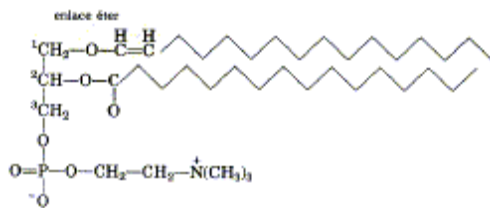
- **Fosfatidiletanolamina** (Cefalina). Las cefalinas difieren de las lecitinas solo en que la etanolamina reemplaza a la colina.

(estructura general +) – $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$

- **Fosfatidilinositol**. El inositol se halla como el estereoisomero mioinositol.
- **Fosfatidilserina**. En los tejidos se ha encontrado un fosfolípido semejante a la cefalina, la fosfatidilserina, que en vez de etanolamina, contiene el aminoácido serina. además se han aislado fosfolípidos que contienen treonina.

(estructura general +) – $\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_3^+)\text{COO}^-$

- **Lisofosfolípidos**. Estos fosfoacilgliceroles contienen solo un radical acilo, por ejemplo, lisolecitina, es importante en el metabolismo de los fosfolípidos.
- **Plasmalogenos**. Estos compuestos llegan a constituir hasta un 10% de los fosfolípidos del encéfalo y del músculo.
- **Esfingomielinas**. Estas se encuentran en grandes cantidades en el encéfalo y tejido nervioso. Por hidrólisis de las esfingomielinas se obtiene un ácido graso, ácido fosfórico, colina y un amino alcohol complejo.

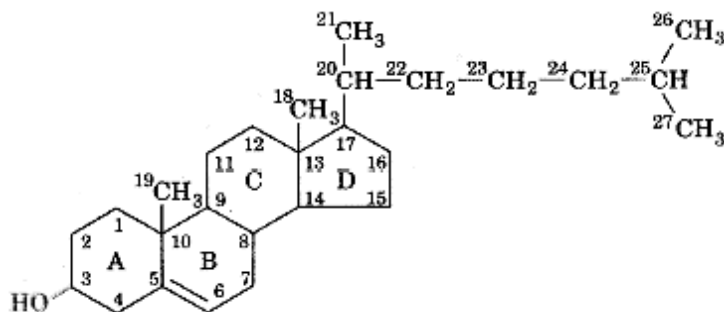


Esfingomielina

El **Colesterol** se encuentra ampliamente distribuido en todas las células del organismo pero especialmente en las del tejido nervioso. Es un constituyente principal de la membrana celular y de las lipoproteínas plasmáticas. A menudo se encuentra combinado con ácidos grasos, como ester de colesterol y es el compuesto precursor de todos los esteroides sintetizados en el cuerpo. El control y transporte de colesterol

deben ser regulados estrechamente. Existen tres vías en las que se mantiene el suministro del colesterol, tres vías que mantienen el suministro del colesterol celular.

- Por regulación de la actividad de la HMG-CoA reductasa
- Por regulación de la velocidad de síntesis del receptor LDL



La notable constancia de la composición lipídica del cerebro adulto ha sugerido un recambio relativamente bajo de los lípidos. El colesterol, cerebrósidos, Fosfatidiletanolamina y esfingomielina son solamente metabolizados lentamente en el cerebro. Sin embargo, la Fosfatidilcolina presenta un recambio rápido y los fosfatidilinositiósidos exhiben una velocidad más rápida; ambos se sintetizan a partir de glucosa y ácidos grasos. El colesterol se sintetiza en el cerebro de animales jóvenes durante el crecimiento. Con el aumento de la edad el nivel de hidroximetilglutaril CoA reductasa decrece bruscamente, y el cerebro de mamíferos llega a ser menos capaz de sintetizar colesterol, aunque en el adulto puede demostrarse un nivel bajo de actividad.

Mientras que la mayoría del colesterol del cerebro adulto no está esterificado, se encuentran ésteres del colesterol a concentración relativamente alta en lugares de activa mielinización. Los fosfoglicéridos son sintetizados en el cerebro por rutas similares a otros órganos. Los ácidos grasos provienen de la glucosa, pero alguna síntesis procede del acetoacetato, citrato e incluso acetilaspártato.

OBJETIVO

Identificar, mediante reacciones específicas, los diferentes tipos de lípidos extraídos del cerebro.

MATERIAL

15 tubos de ensayo

1 vaso de precipitados de 600 ml

5 pipetas graduadas de 1 ml

5 pipetas de 5 ml

5 pipetas graduadas de 10 ml

1 pipeta de 2 ml

gradilla

parrilla

espectrofotómetro y celdas

baño de aceite

termómetro

papel aluminio

piceta

Material Biológico:

Fracciones I, II y III

Reactivos:

Éter Etanol al 95%

Cloroformo H₂SO₄ concentrado

Anhídrido acético Disolución Patrón de colesterol 10 mg/ml

H₂SO₄ 10N Disolución de Molibdato de amonio al 6.6% en H₂SO₄, 7.5 N

Disolución de Sulfato Ferroso al 10%, 10g FeSO₄, 2.5 ml H₂SO₄ 7.5N, aforar a 100 ml con agua.

Disolución patrón de KH₂PO₄ : 1 micromola/ml 0.0136g de KH₂PO₄ en 100 ml de agua.

METODOLOGIA

• COLESTEROL.

- ◆ Resuspenda en 10 ml de cloroformo la Fracción I
- ◆ Tomar una alícuota de 0.5 ml
- ◆ Disponer una serie de tubo según la tabla siguiente.

Reactivo

Tubo #

1

2

3

Cloroformo

3

—

2.5

Patrón de Colesterol

—

3

—

Fracción I

—

—

0.5

- ◆ Agregar 3 ml de anhídrido acético
- ◆ Agregar 0.1 ml de [H₂SO₄]
- ◆ Dejar en la oscuridad 30 minutos
- ◆ Leer 680 nm.

• FOSFOLÍPIDOS

- ◆ Agregar 2 ml de éter a la Fracción II
- ◆ Tomar 0.5 ml y poner en baño de agua
- ◆ Calentar y evaporar
- ◆ Agregar 0.5 ml H₂SO₄ 10n
- ◆ Calentar baño de agua 30 minutos
- ◆ Enfriar y agregar 2 ml de agua
- ◆ Calentar 10 minutos
- ◆ Disponer una serie de tubos según la tabla.

Reactivos	1	2	3	4	5	6
Patrón	0	0.3	0.6	1.0	—	—
H ₂ O	2	1.7	1.4	1.0	—	—
H ₂ SO ₄	0.5	0.5	0.5	0.5	—	—
Fracción II	—	—	—	—	2	2

- ◆ Agregar a los tubos 1 ml de molibdato de amonio
- ◆ Agregar 1 ml de sulfato ferroso
- ◆ Agitar y dejar 10 minutos a temperatura ambiente
- ◆ Leer absorbancia a 660 nm

RESULTADOS

• COLESTEROL

- ◆ Calcular la cantidad de colesterol presente en la muestra de tejido.
- ◆ Como al tomar las absorbancias estas tuvieron lecturas muy altas, se hizo la siguiente dilución: **5 ml de colesterol : 5 ml de cloroformo**

Tabla 1.

Tubo #	Absorbancia
1	<i>blanco</i>
2	0.539
3	0.636

- ◆ Para obtener las concentraciones de los tubos 2 y 3 utilizamos la siguiente formula de titulación:
- ◆ En la tabla 2 se muestran las concentraciones obtenidas de los cálculos anteriores.

Tabla 2.

Tubo #	[%]f de Colesterol (mg/ml)
2	10
3	1.666

- FOSFOLÍPIDOS

- ◆ En la tabla 3 se muestran las lecturas de absorbancias y la media de ambas.

Tabla 3.

Tubo	Absorbancia	Duplicado	Media
1	0	0	0
2	1.196	1.024	1.11
3	1.285	1.236	1.26
4	2.695	2.189	2.442
5 fosfolípidos	0.189	--	0.189
6 fosfolípidos	0.196	--	0.196

- ◆ Los cálculos siguiente determinan las concentraciones de fosfolípidos de cada tubo, utilizando la formula :
- ◆ La tabla 4 muestra los datos que utilizaremos para hacer la curva patrón de fósforo.

Tabla 4.

Tubo	Absorbancia	[%] por tubo
1	0	0
2	1.11	1.2
3	1.26	2.4
4	2.442	4
5	0.189	8
6	0.196	8

- ♦ Con la ayuda de la ecuación obtenida al ajustar la curva patrón, obtendremos las concentraciones definitivas de fosfolípidos presentes en el tejido de nuestra practica: $y = -0.0172x + 0.9263$, se sustituye la X con las absorbancias.
- ♦ La tabla 5 muestra los resultados de las concentraciones de fosfolípidos por tubo. Estos son los resultados definitivos.

Tabla 5.

Tubo	[Fosfolípidos] final
1	0
2	0.9072
3	0.90462
4	0.88429
5	0.92304
6	0.92292

DISCUSION

Como se puede ver en los resultados el valor obtenido mediante absorbancia y la concentración de esta, nos puede llevar a diversas conclusiones, pues, quizá no se disolvió bien el colesterol en el cloroformo, por lo que al tomar la alícuota, la solución no estaba perfectamente mezclada. Otro posible error esta en el momento de tomar los volúmenes, creemos que las diferencias no deben ser muy grandes; quizá puede ser por la presencia de otros compuestos, los cuales aumentaron la masa total obtenida y por alguna razón elevo demasiado la concentración de fosfolípidos, estas partículas ajenas quizá pudieron haber sido nulas de haber centrifugado por mas tiempo (en la practica 3).

Cabe señalar que la lectura de absorbancia no se realiza de forma inmediata ya que primero se tuvo que hacer reaccionar el colesterol obtenido en disolución con anhídrido acético y ácido sulfúrico, en esta reacción el ácido sulfúrico actúa como un catalizador ácido. El colesterol se reduce adicionándole un grupo ceto, el cual originalmente se observa de color azul y posteriormente se ve de color verde (forma reducida); debido a que la reacción es reversible y a que basta la presencia de luz para regresar las reacciones.

colesterol

Debido a que los fosfolípidos se componen de un fosfato y un lípido, al realizar la hidrólisis de la molécula de fosfolípido y obtener sus partes que lo comprenden, se puede observar la presencia de lípidos en la mezcla después de la hidrólisis. Su presencia es notoria ya que al contener grupos no polares en su molécula no permite la solubilidad con el agua. Por tal razón, suponemos que al haber lípidos, debe haber grupos fosfato, siendo posible la cuantificación de los mismos.

Al haber tomado las lecturas de absorbancia y notar que en las muestras de fosfolípidos se obtienen dichos resultados, se podría pensar que se debió a la alta concentración de fosfolípidos.

CONCLUSION

Podemos concluir que los objetivos propuestos en la practica se cumplieron ya que, se logro la identificación de los lípidos que se encuentran presentes en el tejido cerebral. Aunque no se tuvo un éxito total al hacer la cuantificación de fosfolípidos, gracias que contábamos con un extracto demasiado concentrado, que impidió una buena lectura. Estas lecturas se fueron demasiado arriba de lo que nosotros podríamos llamar normal. Pero esto se soluciona diluyendo el extracto aun más, cosa que no se realizo, pues, se trabajaron por duplicado

las muestras de fosfolípidos. Además estuvimos ayudados por la elaboración de la curva patrón.

Al igual que con las muestras de fosfolípidos, el colesterol estuvo muy concentrado, en este caso si se tuvo que hacer una disolución extra, esto con el fin de que las lecturas fueran mejores y mas precisas, ya que en esta parte de la practica no trabajaríamos por duplicado.

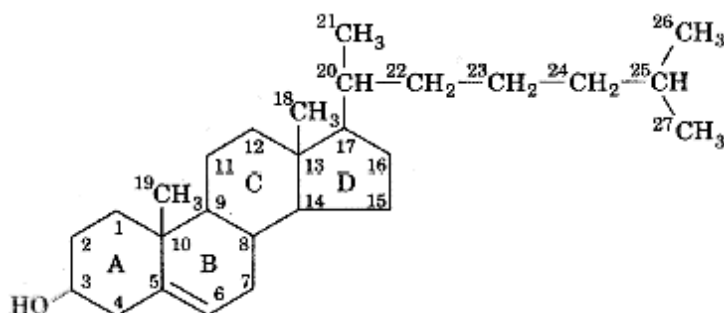
La técnica utilizada en esta práctica para la determinación de los fosfolípidos es eficaz, ya que se baso en separar al fosfolípidos de su grupo fosfato, así como los lípidos, caracterizándose por cuantificar solamente la concentración de los grupos fosfato, mediante un espectrofotómetro.

Concluimos que en nuestra práctica realizada, a pesar de que es una buena técnica, no fue posible notar la presencia de los grupos fosfato en nuestras muestras problema por la alta concentración de fosfato con la que se comparo. Para que en esta parte de la práctica tuviéramos éxito, se tendría que tener una muestra con una menor concentración.

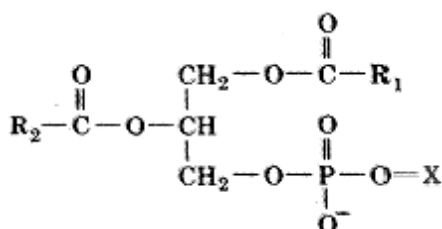
Si se logro la separación de la molécula de fosfolípido a fosfato y lípido por hidrólisis, pero no se pudo cuantificar con mayor exactitud los fosfolípidos.

CUESTIONARIO

- **DESCRIBA LA FORMULA GENERAL DE CADA UNO DE LOS COMPONENTES IDENTIFICADOS EN LA PRACTICA.**



colesterol fosfolípido



- **EN LOS ORGANISMOS VIVOS ¿COMO SE LLEVA A CABO LA HIDRÓLISIS DE LOS FOSFOLÍPIDOS?**

Por la acción de las fosfolipasas. La fosfolipasa A1 ataca el enlace éster en la posición 1 de los fosfolípidos, la fosfolipasa C ataca el enlace éster en la posición 3 liberando 1,2-diacilglicerol mas una base fosforilo, la fosfolipasa D es una enzima descrita principalmente en los vegetales que hidroliza la base nitrogenada de los fosfolípidos.

La crotoxina es una enzima que cataliza la hidrólisis de los fosfolípidos que son los principales componentes estructurales de las membranas celulares, la crotoxina B es la portadora de la actividad de la fosfolipasa.

• **INVESTIGUE SI HAY OTRO METODO PARA CUANTIFICAR LOS ESTEROLES.**

Otra forma de separación de los esteroides debido a que estos son ácidos grasos insaturados es por medio de cristalización fraccional de sus derivados de bromo, además de procesos cromatográficos como el papel y la cromatografía de gas-líquido.

BIBLIOGRAFIA

MATHEWS Y VAN HOLDE. Bioquímica. Edit. McGraw Hill– Interamericana, 2a. edición, 2001.

VOET, D. Y VOET, J., Bioquímica. Omega, España, 1992.

WHITE, A., HANDLER, P., SMITH, E., HILL, R., LEHMAN, R. Principios de Bioquímica. McGraw Hill, 1989.

MICROSOFT® EXCEL 2002 (10.2614.2625)

CAMBRIDGESOFT, ChemDraw Ultra 7.0.1, 2001 (estructuras)