

Química Biológica

FCEN UNCuyo 2018

Tema 6: Métodos de estudios de los lípidos

Docente Responsable: Dra. María Belén Hapon

Cuando decidimos estudiar la composición de lípidos a partir de muestras biológicas podemos encontrar numerosos procedimientos descritos en libros o artículos científicos que permiten aislar estas moléculas a partir de cualquier tipo de organismos, tejidos o células. Esta guía resume las técnicas más utilizadas así como también los procedimientos y precauciones que debemos tener para su correcto manejo.

Extracción de lípidos y manejo de los extractos

El objetivo del procedimiento es separar los lípidos presentes en los fluidos o células de otros constituyentes, como proteínas, polisacáridos, aminoácidos, azúcares, pero también de preservar los lípidos para análisis ulteriores.

La sensibilidad de la extracción de lípidos depende del uso de solventes puros y la utilización de material de vidrio limpio. Además, es importante tener en cuenta que todos los lípidos deben protegerse de la degradación por oxidación a partir de solventes, oxígeno, enzimas, temperatura y luz.

Procedimiento general:

Método de Folch

El proceso de extracción más utilizado es el desarrollado por Folch (1957).

- 1- Con el método de Folch, el tejido es homogenizado con cloroformo/metanol (2:1) a un volumen final de 20 veces el volumen de la muestra (1g en 20 ml de mezcla de solventes). Luego de la dispersión, la mezcla es agitada durante 15-20 min. en un agitador orbital a temperatura ambiente.
 - a- El homogenato de tejido puede ser filtrado o separado mediante centrifugación para recuperar la fase líquida.
 - b- La mezcla de solventes es lavada con 0,2 volúmenes de agua o solución fisiológica (ClNa 0.9%). Se vortexea algunos segundos, y la mezcla es centrifugada a 2000 rpm para separar las dos fases. Se descarta la fase superior acuosa (contiene gangliosidos y otras moléculas orgánicas polares).
 - c- La fase inferior cloroformica que contiene los lípidos es evaporada al vacío o bajo corriente de nitrógeno.

Método de Bligh y Dyer (1959)

Es un método más indicado para separar lípidos a partir de medios de incubación, homogenatos de tejidos y suspensiones de células y tiene la ventaja de poder separar las proteínas precipitadas al mismo tiempo entre las dos fases líquidas.

- 1- A 1 ml de muestra (suspensión de células, homogenatos de tejidos, plasma, etc.) agregar 3.75 ml de cloroformo/metanol (2:1) y vortexear 10-15 min.
- 2- Agregar 1,25 ml de cloroformo y mezclar 1 min. y luego agregar 1,25 ml de agua mezclando durante otro minuto antes de la centrifugación.
- 3- Descartar la fase superior y coleccionar con un pipeta pasteur la fase inferior sin tocar la interfase de proteínas y secar bajo corriente de nitrógeno.

Precauciones a tener en cuenta:

Solventes:

Los lípidos neutros o de almacenamiento por lo general son extraídos con solventes no polares como el éter di etílico o el cloroformo, pero los lípidos de membrana son mas polares y requieren de solventes polares como el etanol o metanol para romper los puentes hidrógeno o fuerzas electrostáticas.

Para evitar la peroxidación de los extractos de lípidos , durante los procedimientos, todos los solventes deben ser libres de peróxidos. Lo mas conveniente es utilizar calidad para HPLC o comprar de a pequeños volúmenes.

El éter di etílico, dioxano y otros solventes suelen formar peróxidos durante su almacenamiento por lo tanto se recomienda que sean almacenados en recipientes oscuros y en áreas oscuras.

Material de vidrio

Todas las operaciones deben realizarse en material de vidrio y sin ángulos. Los solventes pueden extraer el material de los contenedores o aparatos utilizados.

Almacenamiento

Los lípidos no deben se almacenados secos sino mas bien en un solvente inerte no- alcohólico como el cloroformo. Se debe evitar la luz y las corrientes de aire. Las mejores condiciones de almacenamiento es en freezer de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (hasta 1 año) disuelto en cloroformo metanol en un vial de vidrio es conveniente agregarles nitrógeno al vial antes de cerrar para mantener una atmósfera tal que prevenga a oxidación.

2- Fraccionamiento de los extractos lipídicos

Después de la extracción de lípidos a partir de muestras biológicas, la próxima etapa involucra el fraccionamiento de la mezcla compleja en las distintas clases de lípidos. Posteriormente, según el propósito cada fracción lipídica es aislada y analizada. El procedimiento que se utilizará depende de las clases de lípidos presentes en el extracto. En las muestras de lípidos de origen animal entre el 50 – 80

% son lípidos polares (fosfolípidos y glicolípidos) pero en plantas existe una mayor proporción de lípidos no polares y glicolípidos, las semillas contienen una abundante cantidad de triglicéridos. Aunque algunos tejidos animales como el tejido adiposo, contiene 98% de triglicéridos.

La forma más frecuente de separación es por cromatografía en columna o capa fina. Con estas técnicas los lípidos neutros son separados de los lípidos complejos pero también es posible separar los lípidos complejos como las fracciones de fosfolípidos y glicolípidos.

La técnica utilizada también depende de la escala de separación (analítica o preparativa). Para fines preparativos, se utilizan columnas cromatográficas donde se produce el enriquecimiento de la fracción deseada.

Fraccionamiento por solventes

A Separación de lípidos polares:

Se utiliza la precipitación con acetona para separar los lípidos polares (fosfolípidos y glicolípidos) de las demás fracciones de lípidos no polares (triglicéridos, colesterol y algunos pigmentos)

B Partición con solventes:

Este procedimiento es eficiente para separar extractos lipídicos ricos en glicéridos (semillas, tejido adiposo, cremas cosméticas) o pigmentos (plantas). Se utiliza para enriquecer la muestra en fosfolípidos, glicoesfingolípidos y gangliósidos. Para ello se utilizan mezclas de etanol y hexano o éter de petróleo.

Fraccionamiento por cromatografía

A Cromatografía en columna:

Se basa en la separación de una mezcla compleja de lípidos a través de su pasaje por una columna cromatográfica cuya fase sólida es un material inerte como la sílica gel y cuya fase móvil es un solvente polar o no-polar. Se la utiliza principalmente para fines preparativos. De este modo se siembra en la porción superior de la columna una mezcla compleja y se eluye la columna con hexano y éter para recorrer la fracción de lípidos no polares y posteriormente se eluye con cloroformo-metanol-agua para eluir las fracciones polares como los fosfolípidos.

Otro tipo de columnas son las columnas intercambiadoras de aniones como las que contienen grupos aminopropilos. Estas columnas según el solvente de elución utilizado pueden separar, lípidos simples, ácidos grasos libres, glucolípidos, fosfolípidos zwitterionicos (fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina) y fosfolípidos acídicos.

B Cromatografía en capa fina:

En este tipo de cromatografía la fase sólida (estacionaria) puede ser sílica gel o alumina distribuida uniformemente sobre una placa de vidrio o aluminio. Esta se debe dejar secar en un horno para eliminar todo resto de humedad (activación). Una vez fría la placa es moteada con la mezcla de lípidos contenida

en un solvente adecuado. Una vez evaporado el solvente, se sumerge en placa en una cuba o tanque cromatográfico de modo que la fase móvil (mezcla de solventes) quede en contacto con la porción inferior de la placa sin tocar la línea de siembra. Por capilaridad la fase móvil se desplazará por la placa arrastrando la mezcla compleja de lípidos cuya movilidad dependerá de su solubilidad en el solvente (fase móvil) y su adsorción sobre la fase estacionaria.

La placa es retirada de la cuba cuando el solvente llega a 1 cm del borde superior de la placa y se evapora el solvente. La posición de las manchas producidas por los lípidos se puede revelar por carbonización (rociando con ac. sulfúrico y posterior calentamiento) detectando cualquier material orgánico, por fluorescencia (con diclorofluoresceína) o por acción con vapores de Iodo que tiñe en general los lípidos saturados e insaturados ya que disuelven Iodo por simple difusión.

Las manchas pueden ser eluidas a partir de la sílica gel como por ejemplo los lípidos simples son eluidos con cloroformo, mientras que los fosfolípidos requieren una mezcla de cloroformo-metanol-agua.

C Cromatografía gaseosa:

En cromatografía de gases, la fase móvil es un gas que transporta al soluto, que debe encontrarse en estado gaseoso. La técnica más utilizada, cromatografía de reparto gas-líquido, emplea como fase estacionaria un líquido no volátil que recubre el interior de la columna. En cambio, la cromatografía de adsorción gas-sólido utiliza como fase estacionaria partículas sólidas sobre las que el soluto puede adsorberse.

Cuando el soluto a determinar no es volátil, suele transformarse previamente en otro compuesto volátil que permite la utilización de la técnica. En el caso de los ácidos grasos se realiza una esterificación con AC. metílico. La cromatografía de gases permite, además de la separación, la determinación cuantitativa de los componentes de la muestra, obteniéndose rectas de calibrado que ponen de manifiesto que el área de los picos es proporcional a la cantidad de componente de la muestra.

D Cromatografía líquida:

En este tipo de cromatografía la fase estacionaria es un líquido adsorbido por un sólido, contenido en una columna y como fase móvil, un líquido que actúa como eluyente. La cromatografía líquida evolucionó en su desarrollo hacia la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), basada en una mejora en la resolución de la técnica al disminuir el tamaño de las partículas de la fase estacionaria (se pasó de tamaños de partícula de 150-200 μm a tamaños de 5-10 μm).

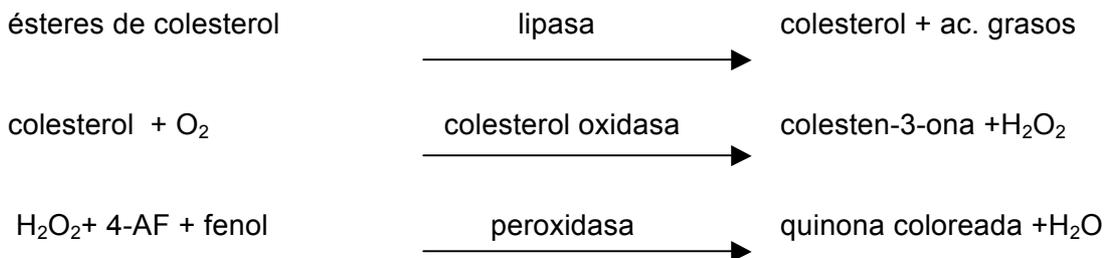
Determinación colorimétrica de grupos éster de extractos lipídicos (Antonis, 1960)

La determinación de grupos éster de extractos lipídicos mediante la hidroxilaminólisis alcalina de ésteres para formar ácidos hidroxamínicos, que en presencia de iones férricos en solución ácida forman un complejo quelado con Fe^{+3} de color.

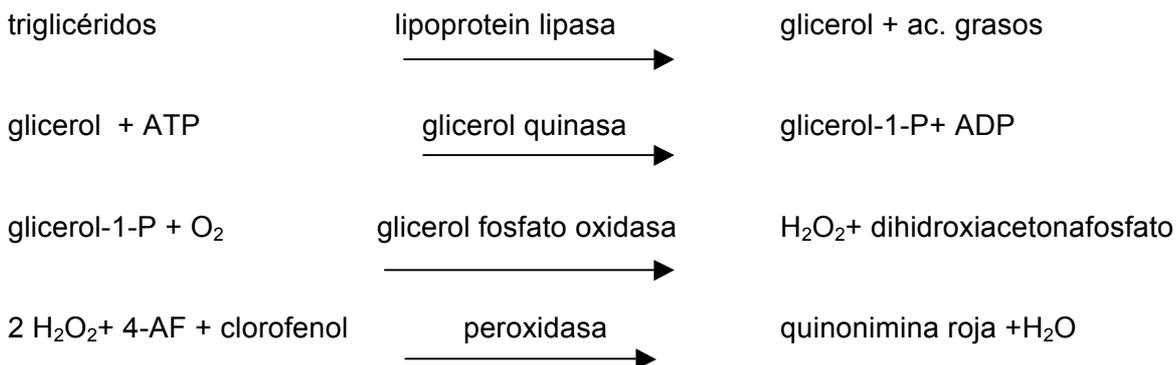
Determinación enzimática de las distintas fracciones de lípidos

En la actualidad existen numerosas formas de determinar en forma cuantitativa la concentración de las distintas fracciones lipídicas de una muestra biológica. La mayoría de estas metodologías están estandarizadas y se obtienen en forma de kits comerciales.

Fundamento del método enzimático para la determinación de colesterol:



Fundamento del método enzimático para la determinación de triglicéridos :



Los kits comerciales cuentan con estándares de concentración conocida que se utilizan como referencia para hacer las cuantificaciones de las concentraciones de lípidos a partir de ellos. Ambos el estándar como las muestras luego de sufrir la reacción enzimática dan como resultado una solución de color que es directamente proporcional a la concentración de lípidos encontrada en la muestra. Esta coloración se puede estimar espectrofotométricamente para obtener valores que serán contrastados utilizando cálculos matemáticos simples usando como referencia el valor del estándar.