

EXPERIMENTO 11

EXTRACCION Y PURIFICACION DE LIPIDOS COMPLEJOS

REQUISITOS

Repasar los conceptos vistos en teoría sobre los lípidos complejos, función, nomenclatura, propiedades químicas y físicas, distribución en nuestro organismo

OBJETIVOS

Comprobar la presencia de los lípidos complejos en cerebro de res o de ratas una vez efectuada su extracción por diferentes solvente y posterior fraccionamiento de los extractos.

1. FUNDAMENTOS

El tejido adiposo esta constituido principalmente por las grasas neutras, pero el cerebro contiene relativamente pocas, los constituyentes lipídicos de estos tejidos son los lípidos complejos como: fosfolípidos y colesterol.

Basados en la solubilidad de los lípidos en solventes orgánicos, es posible extraer y purificar lípidos del cerebro por sucesivas extracciones con diferentes solventes y posterior fraccionamiento de los extractos para obtener fracciones ricas en: esteroides, glicerofosfolípidos y esfingolípidos. El esquema se basa en los siguientes hechos:

- Los esteroides son solubles en acetona, al contrario de lo que sucede con otros lípidos complejos.
- Algunos glicerofosfolípidos, como las lecitinas, la fosfatidiletanolamina y la fosfatidilserina, son solubles en éter e insolubles en acetona.
- Los fosfátidos y glucósidos de esfingosina, se disuelven en alcohol caliente y son insolubles en acetona y éter.

Los productos finales de éste experimento son sustancias de una pureza relativa, y serán identificados una vez efectuadas las extracciones.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

Homogeneizador (o una licuadora)	Alcohol de 95 %
Sistema de destilación.	Cloroformo-metanol (1:1)
Plancha eléctrica o mechero.	Ácido sulfúrico.
Balanza.	α -Naftol al 5 % en etanol.
Matraz.	Anhídrido acético.
Pipetas.	Ácido nítrico.
Embudo de Büchner.	Molibdato de amonio,
Balones.	Carbonato de sodio al 2 %.
50 g de cerebro de res o de rata.	Nitrato de potasio al 2 %.
Éter etílico.	
Acetona.	

2.2 Métodos

PRECAUCION: Muchos de los disolventes utilizados en las operaciones siguientes son muy inflamables. NO PUEDE USARSE, bajo ningún concepto una llama directa de mechero, emplee baño de vapor.

2.2.1 Extracciones y obtención de las fracciones

2.2.1.1 Preparación de la fracción 1: Colesterol.

1. Pese 50 g aproximadamente de cerebro y coloque en el homogeneizador con 200 ml de acetona.
2. Homogeneice por 1 min. y transfiera a un vaso de precipitado, lavando el recipiente del homogeneizador con 25 ml de acetona vertiendo el lavado en el vaso con la suspensión.
3. Deje en reposo 5 min. agitando ocasionalmente.
4. Filtre en un embudo de Büchner y homogeneice el residuo durante 1 min. con 100 ml de acetona, lave con 50 ml de acetona que verterá sobre el residuo, esto constituye la fracción 1.
5. Guarde los residuos de la filtración para preparar las fracciones 2 y 3.
6. Evapore la acetona en un matraz de fondo redondo calentando a vapor y con la cabeza de destilación conectada a la trompa de agua.
7. Enfríe la solución al chorro y recoja el colesterol bruto en un embudo de Büchner.

8. Recristalice el colesterol disolviéndolo en una mínima cantidad de etanol caliente, filtrando la solución todavía caliente y dejando enfriar el filtrado, la filtración se efectúa sobre un filtro plegado colocado sobre un embudo encima de una fiola, la fiola debe estar a BM.
9. Deje hervir el filtrado hasta que el alcohol se evapore.
11. Seque el colesterol cristalizado al aire, pese y guarde para su posterior identificación.

2.2.1.2 Preparación de la fracción 2: Lecitina y Cefalina

1. Transfiera el residuo que queda sobre el papel de filtro (insoluble en acetona) a un vaso de 400 ml y extraiga tres veces con éter, utilizando 200 ml cada vez.
2. Para hacer las extracciones, se deja el producto sólido en éter 4-5 min., agitando de vez en cuando.
3. Se filtra el producto al vacío y se guarda el residuo para el aislar la fracción 3.
4. Concentre los extractos etéreos, hasta un volumen de 50 ml, a presión reducida.
5. Vierta el extracto concentrado sobre 50 ml de acetona y agite.
6. Recoja el precipitado sobre un embudo de Büchner (fracción 2).
7. Descarte el filtrado y pese el precipitado en un vaso de precipitado de 50 ml, previamente tarado, calcule el peso en mg.
8. Disuelva el precipitado en una mezcla acetona-metanol (3:1).
9. Tape el frasco, para evitar la oxidación y guarde para posterior caracterización.

2.2.1.3 Preparación de la fracción 3: Fosfátidos de Esfingosina y Glucósidos de esfingosina.

1. Extraer el residuo insoluble en éter, obtenido al preparar la fracción 2, con 50 ml de etanol hirviendo.
2. Filtre la suspensión aún caliente y descarte el precipitado.
3. Enfríe el filtrado y recoja el precipitado resultante por filtración al vacío (fracción 3).
4. Coloque el precipitado en un vaso de 50 ml previamente tarado y calcule el peso con precisión de mg.
5. Disuelva el precipitado en cloroformo-etanol (3:1) y tape el frasco para posterior caracterización.

2.2.2 Identificación de lípidos:

a. **Colesterol:** Prueba de Lieberman: Las sustancias que tienen como núcleo el ciclopentano perhidrofenantreno, como el colesterol, dan una coloración verde característica, la prueba es la muestra la siguiente tabla:

Tabla 1 Identificación del colesterol mediante la prueba de Lieberman

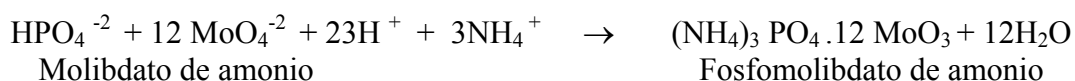
1. Tome tres tubos secos y coloque:

Tubo	Cloroformo	Colesterol certificado	Fracción 1
1	1 ml	0 mg	0 mg
2	1 ml	5 mg	0 mg
3	1 ml	0 mg	5 mg

2. Mezcle los tubos 2 y 3 para disolver.
3. Añada 1 ml de anhídrido acético a cada tubo y agite.
4. Añada 0,5 ml de H₂SO₄ concentrado a cada tubo y mezcle suavemente.
5. Observe los cambios de coloración y anote.

2.2.2.1 Lecitinas y Cefalinas mediante la prueba de Fusión:

Esta prueba sirve para investigar fósforo inorgánico, las sustancias orgánicas también dan positiva la reacción si se efectúa una hidrólisis previa. La reacción positiva se manifiesta por un precipitado amarillo de fosfomolibdato de amonio, la reacción es la siguiente:



1. Tome dos tubos y proceda de la siguiente manera:
2. Coloque 0,5 g de la fracción 2 en el tubo rotulado 2, el tubo rotulado 1 no coloque muestra, ese tubo servirá de blanco.
3. Añada a cada tubo: 1 ml de una mezcla de carbonato de sodio al 2 % y nitrato de potasio al 2 % (2:1), recientemente preparada.
4. 1 ml de agua caliente ± 80°C.
5. Mezcle y deje en reposo durante 10 min.
6. Añada 0,5 ml de ácido nítrico conc.

7. Mezcle y caliente suavemente a la llama SIN DEJAR HERVIR.
8. Añada 0,5 ml de Molibdato de amonio, mezcle y observe.

2.2.2.2 Fosfátidos de esfingosina y glucósidos de esfingosina:

Para identificar la presencia de carbohidratos se puede practicar la prueba de Molish y se procede de la manera siguiente:

1. Añada en un tubo de ensayo 0,5 g de la fracción 3, use otro tubo como blanco (sin muestra).
2. Agregue a ambos tubos, 0,5 ml de α -Naftol al 5 % en etanol y agite.
3. Deje caer lentamente por las paredes del tubo 1 ml de H_2SO_4 concentrado, tenga cuidado de NO AGITAR.
4. Observe la aparición de un anillo rosado. Anote sus resultados.

3. AUTO-EVALUACIÓN.

1. En la literatura apropiada, consulte tres pruebas que sirvan para identificar y cuantificar los lípidos complejos estudiados.
2. Por qué se usan diferentes solventes para separar lípidos.
3. Escriba las fórmulas general de los lípidos que Ud. separó en cada fracción y ubíquelos en la Clasificación de lípidos.
4. Explique por qué cree Ud. que identificamos los triglicéridos.

4. INFORME 11 (EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS)

Apellidos

Grupo de prácticas

Fecha

Calificaciones

Nombres

N° del mesón

N° del estudiante

Entrada		Desarrollo		Informe		Definitiva	
---------	--	------------	--	---------	--	-------------------	--

1. Complete el siguiente cuadro con la información deseada. Expresar el peso en seco de cada fracción en término de % de peso fresco de tejido cerebral que usó.

FRACCION	LIPIDO	%	PRUEBA +

2. Efectúe los cálculos en el siguiente espacio

3. Clasifique y anote la composición de los siguientes lípidos:

LIPIDO	CLASIFICACION	COMPOSICION

Nota: El informe debe ser entregado al finalizar la práctica, sin anexar hojas.