EXTRACCION DE LIPIDOS

INTRODUCCION

Los lípidos son sustancias no polares, prácticamente insolubles en agua, pero solubles en disolventes grasos no polares como el cloroformo, benceno, etanol, metanol, etc.

Este grupo de biomoléculas han recibido poco interés por parte de los investigadores, quizás en los problemas en su manejo atribuibles a la insolubilidad en agua; pero desempeñan una variedad de funciones de gran importancia.

Los lípidos simples como los triglicéridos, funcionan como sustancias de reserva; y las ceras realizan actividades de protección. Los lípidos compuestos como las lecitinas, cefalinas, étc; se combinan con proteínas para constituir la estructura de todas las membranas biológicas. Lípidos derivados como el colesterol es de gran importancia clínica para el hombre, en cambio otros se desempeñan como hormonas, sales biliares, vitaminas, étc.

Otro papel de importancia realizado por los lípidos, es el de proporcionar aislamiento físico y térmico a los diferentes organos del cuerpo.

La yema de huevo, el tejido cerebral y ciertas semillas son fuentes ricas en fosfolípidos y otros materiales lípidicos.

OBJETIVO

Utilizar como fuente de lípidos a la yema de huevo, y proceder a su extracción y separación considerando sus propiedades fisicoquímicas.

FUNDAMENTO

Los lípidos generalmente se encuentran enlazados a proteínas y polisacáridos de los tejidos, formando complejos con diferentes grados de estabilidad, por lo que para poder romper estos complejos se requiere el empleo de condiciones de extracción capaces de desnaturalizar ó separar las proteínas ó carbohidratos asociados con ellos. El etanol,por ejemplo, desnaturaliza proteínas y separa los complejos de lipoproteínas.

Para realizar la extracción total de los lípidos, es común el empleo de metanol al 95%, etanol al 95% ó de mezclas metanol:cloroformo (3:1) ó etanol: éter (2:1). Es conveniente adaptar las condiciones de extracción tanto al tipo de tejido empleado, así como a la cantidad y naturaleza del lípido deseado.

La separación de los lípidos basada en sus diferencias de solubilidad,son desafortunadamente casi siempre, parcialmente satisfactoria, debido a que la solubilidad de los constituyentes de las mezclas de lípidos son bastante diferentes a las de los lípidos puros.

Para la separación de las lecitinas de la solución eterea, se utilizará acetona, ya que las lecitinas, cefalinas y esfingolípidos son solubles en éter, etanol ó cloroformo, pero insolubles en acetona, y por este motivo precipitan de la solución.

Otros lípidos simples se separarán por saponificación con hidróxido de potasio, formando JABONES. En la porción eterea resultante se va a separar el COLESTEROL, ya que éste no es material saponificable. Para su aislamiento se eliminará el eter por evaporación.

La identificación del colesterol se hace generalmente realizando las Pruebas de Salkowski y la de Lieberman-Burchard, cuyo fundamentos son los siguientes:

PRUEBA DE SALKOWSKI: Cuando a las soluciones clorofórmicas de colesterol se les adiciona un volumen igual de acido sulfúrico concentrado, y se mezclan suavemente, se desarrolla un color rojo característico en la capa clorofórmica. Aunque el mecanismo exacto de la reacción y la naturaleza del producto coloreado no se han precisado, se propone que el color resulta de la formación de dobles enlaces adicionales o bien a partir de la condensación de 2 moléculas de colesterol para formar biesteroides.

PRUEBA DE LIEBERMAN-BURCHARD: El anhídrido acético puede condensarse con los grupos hidróxilo de la posición 3 del colesterol ó esteroides relacionados, produciendo el éster correspondiente. Si el esterol contiene una insaturación en la posición 5, ocurrirá una epimerización a la forma 3 y una deshidratación, con la formación de un color característico. La reacción sirve como una prueba específica para los 3-hidroxiesteroides con una insaturación en la posición 5.

MATERIAL POR EQUIPO DE 4 PERSONAS

4 vasos de precipitados de 400 ml
1 embudo de filtración rápida
1 agitador de vidrio
1 probeta graduada
1 parrilla eléctrica con agitación y una barra magnética
4 tubos de ensaye de 18 x 150 ,
1 gradilla
2 pipetas de 10 ml
Papel filtro
Bolsas de papel celofán
2 huevos

REACTIVOS:

1.-Acido sulfúrico concentrado
2.-Etanol
3.-Acetona
4.-Eter etílico
5.-Anhídrido acético
6.-Cloroformo
7.-Disolución Alcohólica de Hidróxido de Potasio al 5.6%: Disuelva 56 gramos de hidróxido de potasio en etanol frío, agite continuamente empleando un agitador magnético, y luego afore a un litro con etanol, procurando obtener una solución cristalina.

PARTE EXPERIMENTAL:

1.-Pese en la balanza granataria un vaso de precipitado de 400 ml completamente limpio y seco.

2.-Rompa cuidadosamente dos huevos, y transfiera las yemas al vaso de precipitados. Pese nuevamente y determine el peso de las yemas de huevo.

3.-Adicione 70 ml de etanol y 35 ml de éter y agite continuamente durante 10 minutos para extraer todos los lípidos.

4.-Filtre la suspensión a través de una gasa adaptada a un embudo de filtración rápida, recogiendo el filtrado en un vaso de precipitados de 400 ml bien seco, LEJOS DE TODA FLAMA.

5.-El filtrado, se filtra nuevamente en un embudo de filtración rápida cubierto con papel filtro humedecido previamente con etanol.

6.-Este filtrado se evapora hasta casi sequedad utilizando una base magnética con agitación. Obtendrá una suspensión pastosa amarillenta.

7.-Enfriar el vaso al chorro de agua, procurando que no caigan gotas de agua sobre el residuo.

8.-Una vez enfriado el vaso, resuspenda el residuo en 10 ml de éter.

9.-Adicione 30 ml de acetona, agitando continuamente la solución. El precipitado que se forma son las LECITINAS.

10.-Filtre recogiendo el filtrado en un vaso limpio y seco. El precipitado obtenido se pesa y se guarda en una bolsa de celofán. Entregelo con su informe.

11.-Evapore el filtrado hasta obtener una pasta viscosa de color café amarillento, utilice para ello la parrilla eléctrica con agitación constante.

12.-Enfrie el vaso de precipitados al chorro de agua.

13.-Añada al residuo 30 ml de disolución alcohólica de hidróxido de potasio, y agite para resuspenderlo homogeneamente.

14.-Caliente la solución durante 5 minutos, con agitación constante.

15.-Enfrie, y añada 50 ml de éter agitando continuamente. Todo el material saponificado, sedimenta. Es un JABON.

16.-Filtre a través de un embudo de filtración rápida acondicionado con papel filtro humedecido con alcohol. Pese el jabón. El filtrado contiene el material no saponificable, principalmente colesterol.

17.-Evapore a sequedad el filtrado. Con una varilla de vidrio raspe el residuo formado de manera que obtenga un polvo fino, recupérelo y péselo. Tome una pequeña cantidad para realizar las siguientes pruebas cualitativas, y el restante guárdelo en una bolsa de celofán y adjúntelo a su reporte.