

COMUNICACION CORTA

Determinación microanalítica de colesterol total en tejidos

Miriam Odette Cora Medina y Luis González Bravo.

Centro de Productos Naturales, Calle 198 s/n entre 19 y 21, Siboney, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 28 de septiembre de 1999. Aceptado: 1ro de octubre de 1999.

Palabras clave: colesterol total, determinación, micrométodo, ultrasonido.
Key words: total cholesterol, determination, micromethode, ultrasonic.

En los estudios clínicos de drogas hipolipemiantes y en otros, se describe^{1,2} que los incrementos de colesterol total y el asociado a las LDL-C constituyen factores de riesgo principales para padecer de aterosclerosis y enfermedades asociadas a ellas, tales como infarto cardíaco, accidentes vasculares encefálicos, etc.

El colesterol ($C_{27}H_{46}O$) tiene importantes funciones en el organismo, como la de formar parte de la estructura de las membranas celulares y subcelulares, y principalmente, la de servir como sustrato para la síntesis de las hormonas sexuales y adrenales, la vitamina D y los ácidos biliares.³ La determinación del colesterol total en fluidos biológicos y en tejidos empleando diferentes métodos⁴⁻⁶ resulta de gran interés en los estudios de la farmacocinética y el metabolismo del policosanol, nueva droga que reduce las concentraciones séricas de colesterol y que presenta un efecto antiagregante plaquetario.^{7,8} Existen diferentes procedimientos para la determinación del colesterol total en fluidos biológicos, los cuales incluyen métodos y técnicas analíticas. Entre los primeros se encuentran aquellos que se realizan por vías química (hidrólisis básica) o enzimática⁹ y entre las segundas, se tiene la cromatografía gaseosa acoplada a la espectrometría de masas¹⁰ y la electroforesis,¹¹ las cuales presentan la desventaja de ser muy costosas, a diferencia del micrométodo que resulta preciso, de bajo costo y de fácil manipulación.¹² Este mé-

todo se recomienda por el pequeño volumen de muestra requerido y el bajo consumo de reactivos.

El presente trabajo se propuso desarrollar una variante microanalítica para la posible determinación cuantitativa del colesterol total en tejido hepático, basada en una reacción de saponificación, seguida de una extracción con n-hexano y su posterior determinación, empleando ultravioleta visible a 620 nm. Se realizaron varias modificaciones metodológicas al método microanalítico propuesto para la determinación del colesterol total en plasma con lo cual, se logró adaptar dicho método al caso de muestras de tejido hepático.

Fueron empleados reactivos de grado analítico: hidróxido de potasio y n-hexano (Fluka, Suiza); metanol absoluto y anhídrido acético (Merck, Alemania); ácido acético glacial (BDH, Analar, Inglaterra); colesterol (Sigma, USA) y ácido sulfúrico concentrado. Se preparó una disolución del reactivo desarrollador de color Liebermann-Burchard mezclando 20 volúmenes de anhídrido acético frío, un volumen de ácido sulfúrico concentrado y 10 volúmenes de ácido acético glacial. Esta disolución fue utilizada dentro de la hora posterior a su preparación.¹³ Se tomaron alícuotas correspondientes a 0,1 mL de homogenato de hígado, se introdujeron en tubos de ensayo y se añadieron 0,05 mL de hidróxido de potasio 33 % y 1 mL de metanol absoluto. Las muestras fueron agitadas en un equipo *vortex* por espacio de

10 s. La hidrólisis en medio básico fue realizada en baño María a 80 °C durante 1 h. La extracción de la fase orgánica se realizó añadiendo 1,5 mL de n-hexano y 0,5 mL de agua destilada, agitando en cada caso por espacio de 10 s. Las muestras fueron centrifugadas a 3 500 r/min y se dejaron reposar hasta separación de las fases. Se tomaron alícuotas de 1 mL de la fase orgánica y se concentraron a sequedad en un vial a 100 °C. Se añadieron alícuotas de 3 mL del reactivo Liebermann-Burchard. El color se desarrolló completamente 30 min después y la absorbancia se determinó a 620 nm a muestras y patrones medidos con referencia a un blanco que fue el mismo reactivo de color, en un espectrofotómetro UV Visible. Las modificaciones del micrométodo consideraron las condiciones siguientes: 80 °C, empleo de sistema cerrado, ultrasonido y tiempo de extracción de la fase orgánica en 2, 4, 6 y 7 h. Se desarrollaron seis ensayos (Tabla 1).

Las disoluciones patrones fueron preparadas disolviendo 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5 y 4 mg de colesterol en 25 mL de n-hexano (matraces aforados de 25 mL), $C_{col} = 0,06; 0,08; 0,10; 0,12$ y $0,14$ (mg/mL).

Se tomaron alícuotas de 1 mL de estas disoluciones patrones y se trasvasaron a tubos de ensayo. Se añadieron 0,05 mL de una disolución de hidróxido de potasio 33 % y 0,1 mL de agua destilada. Los patrones fueron sometidos al mismo procedimiento que las muestras.

Tabla 1. Condiciones de trabajo en cada uno de los ensayos desarrollados, para 1 h de saponificación.

Ensayo	Condiciones de reacción			
	Temperatura (°C)	Sistema	Tiempo de extracción	Ultrasonido (30 min)
A	37	abierto	10 s	no
B	80	cerrado	10 s	no
C	80	cerrado	10 s	sí
D	80	cerrado	2 h	sí
E	80	cerrado	4 h	sí
F	80	cerrado	6 h	sí
G	80	cerrado	7 h	sí

Tabla 2. Concentración promedio de colesterol total (C_{col}), determinada por el micrométodo convencional (Ensayo A) y por el modificado (Ensayos B-G).

Ensayo	$C_{col} \pm DE$ (mg/g)
A	1,430 5 \pm 0,17
B	1,627 0 \pm 0,10
C	3,151 1 \pm 0,26
D	3,560 2 \pm 0,11
E	4,110 1 \pm 0,06
F	4,665 0 \pm 0,24
G	4,914 5 \pm 0,13

n = 4.

Tabla 3. Valores experimentales de la prueba de Lord (U), al comparar los experimentos entre sí.

Ensayos	U_{exp}
A y B	0,288 7
B y C	1,878 8*
C y D	0,671 7*
D y E	3,968 0*
E y F	0,772 9*
F y G	0,312 2

n = 4, $U_{tab.} = 0,406$.

* Diferencias significativas.

bajó a 80 °C con sistema cerrado para evitar la evaporación del metanol absoluto (Tabla 2, ensayo B). No se observaron diferencias significativas con los cambios anteriormente mencionados (Tabla 3), por lo que se incorporó el empleo del ultrasonido para lograr una extracción cuantitativa del colesterol total (Ensayo C), lo cual condujo a incrementarlo (Tabla 3). Esto se debe a que ocurre una interacción mucho mejor de los reaccionantes en la saponificación a nivel molecular que da lugar a una mejor homogenización del tejido.

A continuación, se procedió a buscar el mejor tiempo de extracción usando baño ultrasónico (Tabla 1). Se observó un incremento de la concentración del colesterol total C_{col} con el tiempo de extracción. El tiempo apropiado fue de 6 a 7 h. Se observó que entre las experiencias F y G no existían diferencias significativas, indicador de que el tiempo de extracción seleccionado es realmente el requerido para alcanzar el reparto del soluto entre ambas fases (Fig. 1).

Se comprobó que el empleo del ultrasonido en la extracción del colesterol total, mejora de una forma significativa el rendimiento de colesterol que se extrae del tejido en comparación con el micrométodo convencional. No obstante, las mejoras se hacen significativas también, cuando se aumenta el tiempo de extracción de la muestra, resultando óptimo entre las 6 y 7 h de tratamiento. Se corroboró la importancia del control estricto de las condiciones experimentales para evitar errores en la determinación del colesterol total.

BIBLIOGRAFIA

1. Shepherd J., Cobbe S.M., Christopher G., Lorimer A.R., Mcfarlane P.V., McKillap J.H. and Packard C. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. *New Engl. J. Med.*, **333**, 1300, 1995.
2. Sacks F.M., Pfeffer M.A. and Moye L.A. The effects of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. *New Engl. J. Med.*, **35**, 1001, 1996.
3. Ross R. y Fuster V. The Pathogenesis of Atherosclerosis, Chapter 25, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 25-26, 1996.
4. Aufenanger J., Haux P, Weber V. and Kattermann R. A specific method for direct determination of lipoprotein cholesterol in electroforetic patterns. *Clinica Chimica Acta*, **177**, 197, 1988.
5. Christie William W. Gas Chromatography and Lipids, A Practical Guide, Chapter 10, Ayr, Scotland, 269-270, 1989.

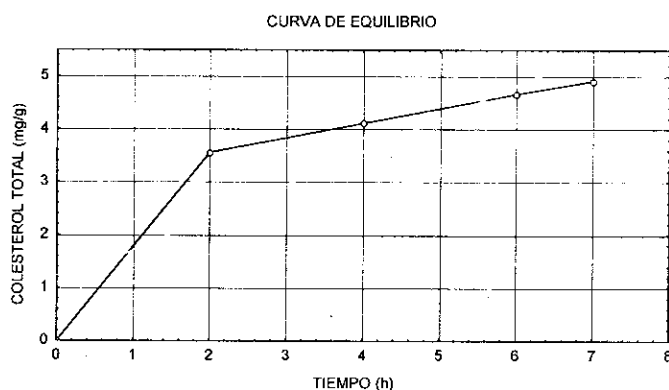


Fig. 1. Curva de equilibrio correspondiente a la extracción del colesterol total en tejido hepático en el tiempo.

El análisis estadístico fue realizado para determinar si existían diferencias significativas entre los ensayos (Prueba de Lord). La fórmula utilizada fue la siguiente:

$$U = \frac{x_a - x_b}{R_a + R_b}$$

donde:
 \bar{x}_a y \bar{x}_b Valores promedio de colesterol total.

R_a y R_b Magnitud mayor y menor de cada ensayo.

Para $n_a = n_b$.
 n Número de réplicas.

Mediante el micrométodo convencional no se logra extraer cuantitativamente el colesterol total del tejido hepático (Tabla 2, ensayo A), por lo cual se realizaron algunas modificaciones con vistas a mejorar la extracción, motivo por el cual se tra-