

127
20j



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**"DESARROLLO DE UN METODO RAPIDO
PARA CUANTIFICAR COLESTEROL
EN ALIMENTOS MEXICANOS"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

MONICA ISABEL SERRANO SANCHEZ

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1991



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

INTRODUCCION.....	1
ANTECEDENTES.....	2
Química del colesterol	2
Funciones metabólicas	2
Digestión, absorción y excreción del colesterol exógeno.....	4
Biosíntesis de colesterol endógeno.....	6
Regulación de la biosíntesis del colesterol.....	9
Colesterol plasmático y aterosclerosis.....	10
Dieta y colesterol.....	14
Tablas de composición de alimentos.....	20
Métodos para cuantificar colesterol.....	21
MATERIALES Y METODOS.....	25
Evaluación en precisión y exactitud del método propuesto.....	25
Cuantificación de colesterol en 16 alimentos.....	26
RESULTADOS Y DISCUSION.....	30
Precisión y exactitud del método propuesto.....	30
Cuantificación de colesterol en los alimentos ensayados.....	31
-Procedimientos.....	31
-Alimentos: carnicos, lácteos, grasas, cereales, huevos, alimentos típicos.....	33
CONCLUSIONES.....	39
BIBLIOGRAFIA.....	41

INTRODUCCION:

Existen evidencias que consideran al colesterol como uno de los principales factores de riesgo en las enfermedades cardiovasculares, por lo que es recomendable que las personas con este tipo de padecimientos controlen su ingesta de colesterol. Para esto es necesario conocer el contenido de colesterol de los alimentos más comunmente ingeridos. Al respecto no existen tablas que incluyan el contenido de colesterol de alimentos típicamente mexicanos.

La cuantificación de colesterol en sangre se hace usualmente por métodos colorimétricos, pero se ha demostrado que estos métodos son en general poco eficientes cuando el análisis se efectúa en alimentos, debido a interferencias por otros esteroides presentes. Los métodos cromatográficos han dado buenos resultados en la cuantificación de colesterol en alimentos, pero el método cromatográfico tradicional utiliza una excesiva cantidad de solventes tóxicos y costosos, además de que involucra una extracción lipídica que puede resultar ineficiente ya que algunos lípidos se asocian a proteínas y carbohidratos, formando complejos que suelen ser insolubles en los solventes empleados o sólo se disuelven parcialmente.

En base a lo anterior el objetivo principal de este trabajo es el desarrollo de un método cromatográfico sencillo, rápido y confiable para cuantificar colesterol en alimentos. Por lo que en el método propuesto en este trabajo se realiza una saponificación directa sobre la muestra, eliminándose las complicaciones antes citadas que involucra la extracción lipídica.

ANTECEDENTES

Química del colesterol

El colesterol cuya fórmula aparece en la figura 1 es el compuesto más importante entre los que tienen como estructura base al cicloperhidrofenantreno ya que tiene importantes funciones metabólicas y estructurales en el organismo humano.

En cuanto a su solubilidad este compuesto tiene una parte hidrofílica que es la parte de la molécula donde se sitúa el OH, en el carbono 3 y el resto de la molécula tiene características hidrofóbicas.

Las reacciones químicas del colesterol se deben principalmente al grupo OH; formación de ésteres, oxidación y otras reacciones típicas de este grupo, y al doble enlace situado entre los carbonos 5 y 6 que da lugar a reacciones de halogenación, entre otras.

Funciones metabólicas

Sin duda la más importante de sus funciones metabólicas es la formación de ácidos biliares que son indispensables en la digestión y absorción de lípidos ya que emulsifican las grasas, activan las lipasas, permiten la absorción de vitaminas liposolubles y son un canal de excreción para muchas sustancias incluyendo drogas, toxinas, metales pesados y calcio. Otra función del colesterol es intervenir en la síntesis de hormonas.

El colesterol es un componente estructural de las membranas celulares y de las lipoproteínas del plasma (figura 2), no está clara su función pero

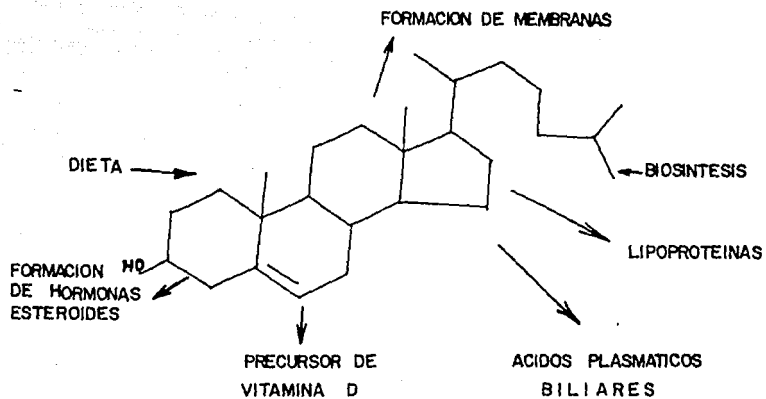


fig. 1 - Funciones del Colesterol

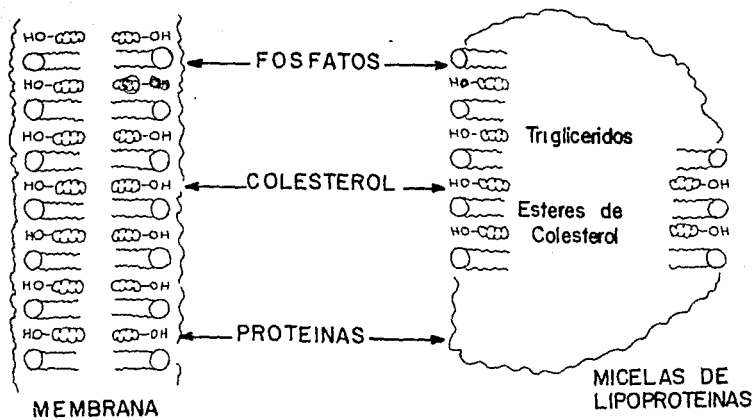


fig. 2- Colesterol en membrana y lipoproteinas

es probable que debido al carácter anfipático de la molécula, que tiene a la vez una parte hidrofílica y una parte hidrofóbica, establece la orientación de las cadenas de ácidos grasos. En la estructura celular el grupo hidroxil del colesterol se halla orientado hacia la parte proteica y hacia la cabeza polar de los fosfolípidos.

Las lipoproteínas presentan una estructura micelar en la que el colesterol libre está presente en la superficie y el colesterol esterificado está dentro del complejo (figura 2) Aquí también el grupo hidroxil interactúa con la proteína, la parte polar de los fosfolípidos, y la fase acuosa circundante mientras que el núcleo del esteroide se orienta hacia el centro del complejo e interactúa con sustancias no polares como los triglicéridos. De esta forma el colesterol presente en la superficie de las lipoproteínas tiende a solubilizar a los lípidos menos polares que se transportan dentro de estas micelas.

Un adulto típico tiene 130g de colesterol (0.2% de su peso), de los cuales 30g se encuentran en el cerebro y la espina dorsal. El colesterol del cerebro a diferencia del colesterol presente en el resto del cuerpo no se sintetiza, no se destruye, y tampoco se intercambia bioquímicamente con el del resto del organismo. (Cal, 1987).

El colesterol presente en el organismo tiene dos orígenes:

1) El colesterol endógeno es sintetizado en diferentes partes del organismo, principalmente en el hígado, la mayor parte del colesterol presente en el organismo tiene este origen, se ha demostrado que si se excluye totalmente el colesterol de la dieta (colesterol exógeno) el cuerpo es capaz de biosintetizar de 800 a 1500 mg por día para satisfacer sus necesidades. (Martin, 1989)

2) Por otro lado el colesterol exógeno entra al organismo mediante la dieta, de esta forma el organismo obtiene aproximadamente 300mg de colesterol por día, el colesterol es un producto del metabolismo animal por lo que está presente principalmente en alimento de este origen como en carne, leche, hígado, sesos y huevo. Excepcionalmente también está presente en algunos vegetales, en el aceite de oliva y de soya se encuentran trazas de colesterol, y constituye el 0.7% de la manteca de cacao (Belitz and Grosh, 1987)

Digestión, absorción y excreción del colesterol exógeno.

La mayor parte del colesterol ingerido en la dieta se encuentra en forma esterificada, aunque existen casos en que se encuentra en forma libre, así por ejemplo en la leche el colesterol se encuentra generalmente en su forma libre, aunque también están presentes otros compuestos como el ergosterol y el 7-dehidrocolesterol. (Byron, 1983).

El colesterol esterificado ingerido en la dieta es hidrolizado en el lumen intestinal por una colesterasa secretada en el jugo pancreático.

Todo el colesterol ingerido en la dieta es emulsificado por ácidos biliares y fosfolípidos formando micelas, esto es necesario debido a la baja solubilidad del colesterol en el medio acuoso del intestino. La emulsificación facilita la acción enzimática y proporciona un medio adecuado para que el colesterol se transporte en una forma fácilmente asimilable por el intestino.

El colesterol es absorbido en el intestino por difusión de las micelas; posteriormente a la absorción, del 80 al 90% del colesterol es esterificado en la linfa con ácidos grasos de cadena larga, generalmente

con cadenas de 16 a 20 átomos de carbono con una o varias insaturaciones; la esterificación también puede ocurrir en la mucosa intestinal.

Tanto los ésteres de colesterol como el colesterol no esterificado son incorporados a moléculas lipoproteicas que los transportan a través del plasma. Estas partículas son llamadas quilomicrones y se forman en el intestino, el colesterol transportado por los quilomicrones se deposita en los tejidos, principalmente en el hígado para ser después dispuesto en la bilis, ya sea como colesterol no esterificado o como ácidos biliares.

En el ser humano la absorción del colesterol es poco eficiente sólo se absorbe del 10 al 50% del colesterol total ingerido (Montgomery, 1974). El porcentaje de absorción del colesterol varía en forma inversa a la cantidad de colesterol ingerido (entre mayor sea la ingesta menor será la absorción), así tenemos que si un adulto ingiere de 600 a 1200mg por día (que es lo que generalmente se ingiere en la sociedades occidentales) absorberá de 300 a 400mg, en contraste cuando el consumo es de aproximadamente 500mg se absorberá del 30 al 35% de lo consumido.

Es recomendable que la ingesta de colesterol sea baja, menos de 300mg por día lo que implica grandes restricciones en la dieta si se tiene en cuenta que una persona promedio ingiere esta cantidad tan solo en su consumo de carne.

El colesterol es eliminado del organismo por dos vías:

- 1) Hay una pequeña proporción de colesterol que junto con las sales biliares es arrastrada por las heces, aunque la mayor parte del colesterol y de los ácidos biliares son reabsorbidos en el intestino y enviados nuevamente al hígado para su reutilización en lo que se denomina

circulación enterohepática.

2) En el intestino grueso el colesterol presente es transformado a coprosterol (coprostanol) por acción bacteriana. Además del coprostanol se excretan en las heces otros esteroides neutros productos del metabolismo interno del colesterol y que son la colestano y el colestanol.

Todo el proceso de digestión, absorción y excreción del colesterol exógeno se esquematiza en la figura 3.

Biosíntesis del colesterol endógeno.

Casi todos los tejidos son capaces de sintetizar colesterol, pero este se sintetiza en el ser humano particularmente en el hígado, corteza suprarrenal, piel, intestino, testículos y aorta.

La biosíntesis del colesterol tiene origen en la acetilCoA y se puede resumir en tres etapas:

- a) formación del mevalonato
- b) formación del escualeno.
- c) formación del colesterol

Acetil-CoA → Mevalonato → Escualeno → Colesterol

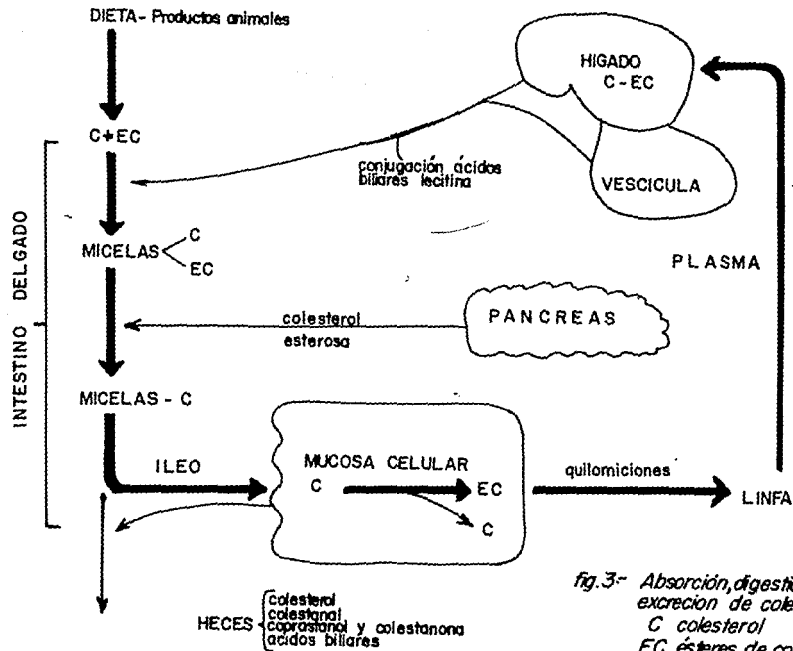


fig.3- Absorción, digestión y excreción de colestero. C colestero EC ésteres de colestero

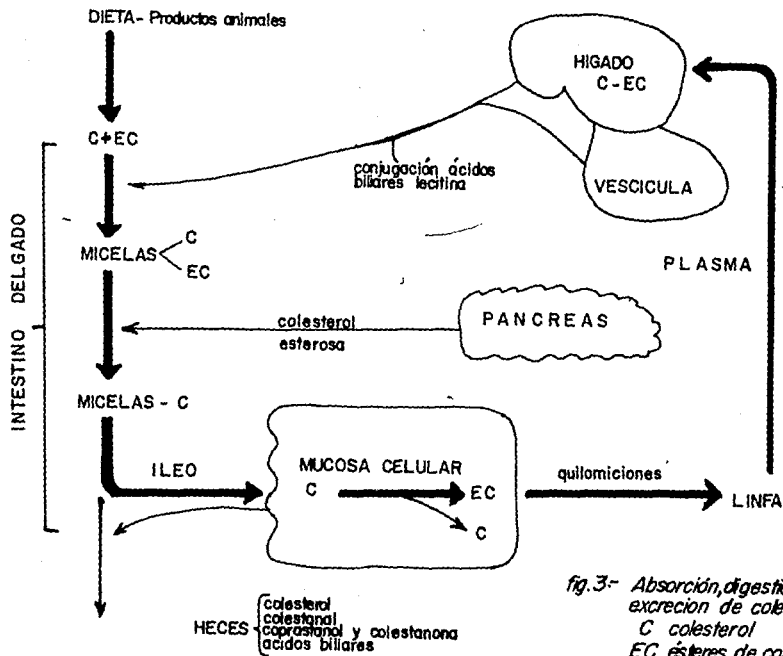


fig.3- Absorción, digestión y excreción de colesterol.
 C colesterol
 EC ésteres de colesterol

Los lípidos y el colesterol son transportados de un tejido a otro a través del plasma sanguíneo. Debido al medio acuoso del sistema circulatorio las sustancias lipídicas requieren asociarse a macromoléculas (lipoproteínas del plasma) para su transporte. Estas macromoléculas son una combinación física de lípidos y proteínas complejas, la composición de las 4 principales lipoproteínas se enlista en la tabla 1.

Quilomicrones. Son lipoproteínas micelares que se sintetizan en el intestino y están compuestas principalmente por triglicéridos y aproximadamente el 98% de su peso seco es de lípidos. Su principal función es transportar dentro del cuerpo a las grasas ingeridas en la dieta. Presentan una densidad muy baja (< 1.006).

Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). El 90% de su composición corresponde a lípidos, de los cuales del 55% al 65% son triglicéridos. Las VLDLs se sintetizan principalmente en el hígado y sirven para transportar los triglicéridos del hígado a otros tejidos. También pueden ser sintetizadas en la mucosa intestinal e intervenir en el transporte de las grasas de la dieta del intestino a la linfa. Su densidad es menor a 1.006.

Lipoproteínas de baja densidad (LDL). Son las moléculas que tiene más alto contenido de colesterol en el plasma, aproximadamente el 60% de colesterol presente en estas lipoproteínas está esterificado. Son sintetizadas en el hígado y en el intestino como parte integral de las VLDLs y se liberan dentro del plasma cuando las VLDLs han sido degradadas. Presentan una densidad de 1.006 - 1.063

Lipoproteínas de alta densidad (HDL). Se sintetizan en el hígado. Cerca del 50% de su composición son proteínas y sus principales lípidos son, fosfolípidos y ésteres de colesterol. Tiene una densidad de 1.063-1.21.

El transporte del colesterol del hígado a los tejidos extrahepáticos se realiza primordialmente a través de lipoproteínas de baja densidad (LDL).

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) también transportan colesterol y son el principal vehículo de transporte de los tejidos al hígado.

TABLA No 1 Composición de las lipoproteínas

COMPONENTE	quilomicrones %	VLDL %	LDL %	HDL %
triglicéridos	90	60	10	3
proteína	1	10	25	50
colesterol	3	10	7	2
ésteres de colesterol	4	5	37	14
fosfolípidos	2	14	20	30
carbohidratos	trazas	1	1	1

Montgomery, 1974.

Regulación de la biosíntesis del colesterol.

La biosíntesis del colesterol está regulada por varios factores entre ellos, por el colesterol ingerido en la dieta, las calorías ingeridas, ciertas hormonas y los ácidos biliares.

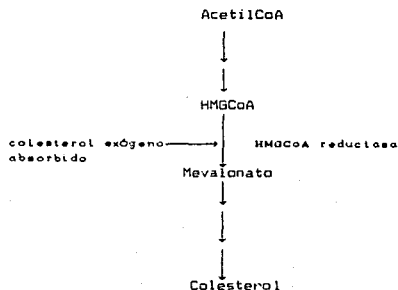
Los estrógenos, hormonas sexuales femeninas regulan la biosíntesis porque reducen la síntesis de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMGCoA reductasa).

El ayuno también disminuye la síntesis de colesterol ya que disminuye la disponibilidad de Acetil CoA, ATP y NADPH.

Los ácidos biliares tienen una acción inhibitoria directa sobre la síntesis de colesterol en la mucosa intestinal pero inhiben solo de manera indirecta la biosíntesis en el hígado.

El colesterol ingerido en la dieta (colesterol exógeno) no inhibe la síntesis de colesterol en el intestino pero tiene un fuerte efecto inhibitorio por retroalimentación (feedback) sobre el mecanismo de síntesis en el hígado (figura 4). La inhibición es a través de la enzima HMGCoA reductasa, no se sabe exactamente si la acción del colesterol exógeno es inhibir la síntesis de la enzima o su actividad.

Figura No 4. Regulación de la síntesis hepática del colesterol



Colesterol plasmático y aterosclerosis.

La aterosclerosis es una enfermedad que consiste en una alteración de las membranas internas de las arterias, en general hay una acumulación de esteres de colesterol, colesterol libre, y fosfolípidos; a medida que la acumulación avanza se producen lesiones degenerativas, la pared arterial se espesa y pierde elasticidad. Hay una disminución del lumen arterial que puede ocasionar el bloqueo u oclusión de la arteria, lo que puede concluir en la formación de un trombo que conduce a una interrupción en la irrigación sanguínea (Cueto, et al 1987)

Hacia 1960 las enfermedades cardiovasculares, específicamente la aterosclerosis, adquirieron una gran importancia ya que eran una causa alta de mortalidad en los países industrializados, llegando a alcanzar hasta un 25% de la mortalidad total (Nussel, 1984), fué por esta razón que se empezaron a realizar numerosos estudios epidemiológicos al respecto para conocer los factores causales de estas enfermedades.

Actualmente hay evidencias de que altas concentraciones de colesterol en plasma son un factor causal de las enfermedades cardiovasculares (Frick et al, 1987; Lewis, 1980)

Las causas de las enfermedades cardiovasculares son multifactoriales pues además del nivel de colesterol plasmático, existen otro factores de riesgo como son, el tabaquismo, la obesidad, los hábitos alimenticios, niveles altos de triglicéridos en el plasma (hiperlipidemia), edad, sexo y actividad física (Kannel and Gordon, 1982).

Un grupo de investigadores hizo estudios comparativos entre el nivel de colesterol plasmático de los habitantes del Mediterráneo, Norteamérica, Medio Oriente y Latinoamérica, los resultados mostraron que mientras en Estados Unidos se encontraron valores de 220 a 275 mg/dl en la región del Mediterráneo los valores fueron de 150 a 165 mg/dl dichos valores están relacionados con bajos riesgos de aterosclerosis y bajas tasas de mortalidad por enfermedades cardiovasculares por lo que concluyeron que estos niveles de colesterol plasmático son adecuados para todas las poblaciones. (Elliot, 1979).

Aunque muchos médicos coinciden en decir que valores de colesterol plasmático menores de 220 mg/dl son valores sin riesgo; de 220-260 se está en una zona sospechosa y cuando los valores son mayores de 260 mg/dl se requiere tratamiento médico. (Assman, 1983).

En estudios realizados en la Ciudad de México se han tomado como hipercolesterolémicas a las personas que presentan valores plasmáticos de colesterol por arriba de 240 mg/dl. (López et al, 1988).

Los padecimientos cardiovasculares están relacionados con la edad por lo que se han sugerido como valores ideales de colesterol plasmático de 200 mg/dl para un adulto y 180 mg/dl para personas jóvenes, donde los riesgos de padecer enfermedades coronarias son bajos. (Hegsted and Nicolsi, 1987)

Se ha demostrado que bajos niveles de colesterol en plasma sanguíneo tienen efectos positivos sobre las lesiones coronarias, e incluso estas se pueden eliminar. Es por esto que la Asociación Americana del Corazón sugiere niveles plasmáticos de colesterol entre 185-200 mg/dl. (Roberts, 1987)

Por otro lado, se ha argumentado que tiene consecuencias indeseables mantener los niveles plasmáticos de colesterol tan bajos como sea posible (Kannel and Gordon, 1982). En un estudio realizado en 7 países (Finlandia, Grecia, Italia, Japón, Holanda, Estados Unidos, y Yugoslavia) se observó que había un incremento en la mortalidad por cáncer cuando los valores plasmáticos de colesterol eran menores a 170mg/dl (Keys A etal, 1985); también hay evidencias de que en

grupos con niveles de colesterol plasmático menores a 160 mg/dl se incrementa la velocidad de muerte por apoplejia (Cheaskin and Ringsdorf, 1980).

Por todo lo anterior podemos decir que los niveles muy bajos de colesterol plasmático (140-160mg/dl) no son convenientes, pero que en contraste los niveles altos (arriba de 200mg/dl) están estrechamente relacionados con padecimientos cardiovasculares.

Las enfermedades cardiovasculares fueron un problema de salud inicialmente solo en países industrializados, donde los índices de consumo de alimentos de origen animal, así como la incidencia de obesidad entre la población son elevados. No obstante en los últimos años estos problemas se han presentado en países como el nuestro.

En 1971 las enfermedades aterosclerosas ocupaban el segundo lugar como causa de muerte en algunas series de autopsias realizadas en hospitales generales de la Ciudad de México (Marquez et al, 1971) y en 1985 murieron en la Cd. de México 12 917 personas por infarto al miocárdio.

En 1977, en un estudio hecho en la ciudad de México con un grupo de obreros sanos que laboraban normalmente en una empresa de la ciudad (Zorrilla et al, 1977) se concluyó que un gran porcentaje de la población urbana está sometida a un riesgo elevado de desarrollar aterosclerosis coronaria; no obstante que la población mexicana consume mayoritariamente carbohidratos, por el alto costo de grasas y proteínas, las personas entrevistadas para este estudio consumían altas cantidades de colesterol y grasas saturadas (cerca de 750mg de colesterol por día).

En un trabajo más reciente (López et al, 1988), se evaluaron niveles de colesterol plasmático en personas de diferentes edades, en los resultados de la muestra ensayada se observó que no se presentó ningún caso de hipercolesterolemia (niveles de colesterol plasmático mayores de 240mg/dl) en personas menores de 20 años, se presentó el 11% en las de 20 a 29 años y el porcentaje de hipercolesterolemia se incrementó hasta un 37% de los 30 a 39 años con una mayor tendencia a presentarse en el sexo masculino.

Un estudio realizado en 1990, aún no publicado (Villalobos, comunicación personal) muestra que en nuestra ciudad son más comunes las hiperlipidemias (niveles elevados de triglicéridos en plasma) que las hipercolesterolemias, esto es opuesto a lo encontrado en el norte del país, donde prevalecen las hipercolesterolemias, debido a las grandes diferencias en los hábitos alimenticios.

Dieta, colesterol y aterosclerosis

El colesterol acumulado en las arterias, el que forma el ateroma, proviene principalmente de las lipoproteínas plasmáticas específicamente del colesterol contenido en las lipoproteínas de baja densidad (VLD) por lo que un alto contenido de colesterol en estas lipoproteínas es considerado como un importante factor de riesgo en las enfermedades cardiovasculares. Por otro lado las HDL impiden la fijación del colesterol proveniente de las LDL en las células de la íntima vascular y son capaces de acarrear el colesterol de las células y transportarlo al hígado, por lo que alto contenido de colesterol en las lipoproteínas HDL se traduce en un menor riesgo coronario.

Hay una íntima relación entre el nivel de colesterol plasmático y el colesterol ingerido en la dieta, esto no se demuestra fácilmente ya que los individuos responden de distintas formas a los cambios en la cantidad de colesterol ingerido. Así por ejemplo un estudio realizado con tarahumaras del norte de México (McMurry et al, 1985) muestra que estos individuos presentan una respuesta mínima a altas concentraciones de colesterol en su dieta. Durante ese estudio se administraron 900mg/día de colesterol en la dieta y se observó que el nivel de colesterol plasmático sólo se incrementaba 10mg debido a que el organismo disminuía la biosíntesis y absorción del colesterol y aumentaba su excreción.

Además del colesterol presente en los alimentos ingeridos otros componentes de la dieta influyen en el nivel de colesterol plasmático, como son la presencia en la dieta de ácidos grasos saturados y poliinsaturados, fibra, y proteínas (Steinberg, 1989).

Al igual que el colesterol, las grasas saturadas son aterogénicas; un estudio realizado en países de Europa, Norte América y Japón muestran una correlación entre la grasa saturada ingerida en la dieta y el nivel plasmático de colesterol y entre éste y la mortalidad debida a enfermedades cardiovasculares. (Martin, 1985).

Conjuntamente al decremento en las enfermedades cardiovasculares en Estados Unidos se observó una disminución en el consumo de grasas saturadas y un incremento en el uso de aceites vegetales altos en ácidos grasos poliinsaturados (Goor et al, 1985).

Está bien establecido que dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados reducen los niveles de colesterol plasmático, minimizando la formación de ateromas en las arterias. (Hornstra et al, 1973). Sin embargo, el mecanismo de dichos efectos, hipocolesterolémicos no está bien entendido.

Un grupo de investigadores (Byenen et al, 1985) sugiere que los ácidos grasos poliinsaturados disminuyen la producción de lipoproteínas, ya que muestran poca eficiencia para ser utilizados por el hígado en la síntesis de triglicéridos. Esto evita que participen en la formación de lipoproteínas VLDL, provocando una disminución de lipoproteínas LDL (que son las principales transportadoras de colesterol), lo que finalmente se traduce en una disminución en los niveles de colesterol plasmático.

Por otro lado, debido a que en la dieta diaria se consumen tanto ácidos grasos saturados (S), como poliinsaturados (P), es importante la relación de concentración entre ambos (P/S). Valores altos de P/S en la dieta disminuyen el nivel de colesterol plasmático mientras que valores bajos tienden a incrementar el colesterol plasmático (Oh y Sand Monaco, 1985).

Dietas ricas en grasas y con valores de P/S de 0.3-0.5 son causa de obesidad, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, disminuyen la acción de lipasas-lipoproteicas, e incrementan la relación del colesterol transportado en LDL/HDL.

Cuando se disminuye la ingesta de grasas y se aumenta el P/S por arriba de 0.5, las consecuencias antes señaladas se disminuyen o no se presentan.

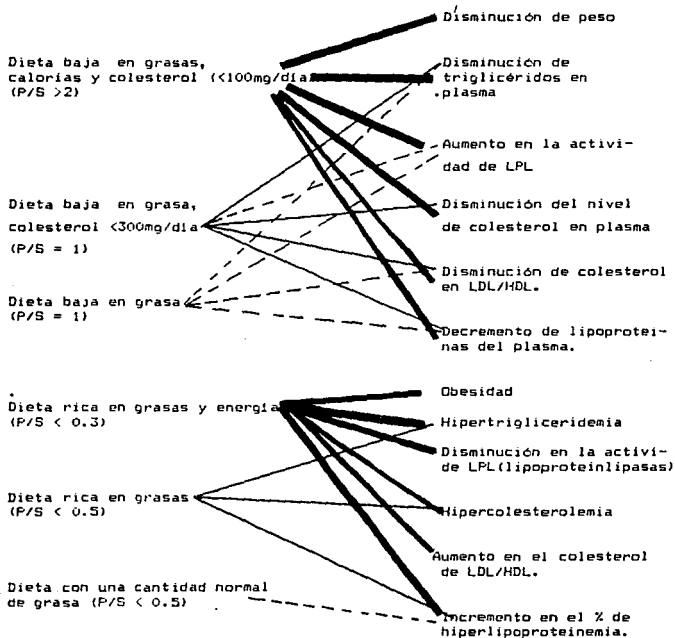
En contraste con lo anterior dietas bajas en grasas y menos de 100g de colesterol por día, tienen los siguientes efectos sobre el metabolismo de los lípidos; aumento en la actividad de las lipasas-lipoproteicas y una disminución de los triglicéridos y de la relación LDL/HDL en el plasma sanguíneo (Biró and Romics, 1983).

Los efectos de la dieta sobre el metabolismo de los lípidos se resumen en la figura 5.

Una dieta alta en ácidos grasos poliinsaturados está bien justificada en personas con problemas cardiovasculares no obstante se han realizado estudios que muestran cierta relación entre una ingesta alta de ácidos grasos poliinsaturados y la incidencia de cáncer, esto no es de ninguna manera concluyente pero la controversia al respecto existe. (Pearce and Dayton, 1977).

Generalmente para disminuir la concentración de colesterol en el plasma se recomienda la sustitución parcial de ácidos grasos saturados por ácidos grasos poliinsaturados, aunque también se han efectuado estudios para saber la influencia de otros componentes de la dieta sobre los niveles de colesterol plasmático.

Figura No 5 Efecto de la dieta sobre el metabolismo de los lípidos



EL GRUESO DE LAS LINEAS INDICA LA INTENSIDAD DE LOS EFECTOS.

En tratamientos de hiperlipidemias e hipercolesterolemias se ha sugerido la sustitución de la grasa de la dieta por poliesteres de sacarosa, que proporcionan la lubricación y las características organolepticas de las grasas sin los problemas que estas presentan en dichas enfermedades (Mellies et al, 1985).

Existe controversia acerca de los efectos de la ingesta de fibra sobre el nivel de colesterol plasmático; algunos investigadores piensan que la fibra retiene al colesterol ingerido en la dieta por lo que aumenta su excreción en las heces y disminuye por lo tanto el nivel de colesterol en plasma (Mahalko, et al 1984). Lo anterior ha sido rebatido, e investigaciones hechas al respecto sugieren que la fibra dietética mejora la función intestinal y aumenta la cantidad de grasa excretada en las heces pero no disminuye el nivel de colesterol plasmático (Hillman et al, 1985; Mongeau et al, 1990).

Las proteínas ingeridas en la dieta también influyen en el metabolismo de las grasas; las proteínas animales son más aterogénicas que las proteínas vegetales, al igual que las proteínas hidrolizadas lo son menos que las proteínas intactas. Se ha sugerido que la relación lisina / arginina (L/A) de las proteínas está relacionada con el metabolismo de los lípidos; entre mayor sea esta relación, la proteína es más aterogénica. Valores altos de L/A disminuyen la excreción de esteroides en conejos y aumentan la unión de moléculas de colesterol que facilitan la formación del ateroma. (Kritchevsky et al, 1987).

Tablas de composición de alimentos.

En las personas con problemas cardiovasculares o como medida preventiva en aquellas que presentan factores de riesgo de estos padecimientos es necesario controlar la cantidad de colesterol ingerido en la dieta; para este fin se requieren tablas de composición de alimentos que contengan el valor de colesterol de los alimentos comunes en la dieta.

Las tablas publicadas por el Instituto Nacional de la Nutrición (Burges et al, 1977) no incluye el valor correspondiente a la cantidad de colesterol presente en los alimentos analizados, por otra parte las tablas del INCAP (Leung, 1961), para alimentos de consumo en América Latina, contienen datos de concentraciones de colesterol que corresponden a determinaciones efectuadas en 1957 por investigadores del Departamento de Nutrición de Harvard (Haye and Rose, 1957).

Existen varias tablas de composición de alimentos que incluyen valores de colesterol, estas tablas fueron realizadas en Estados Unidos por lo que los alimentos que incluyen son los consumidos en ese país, algunos de estos alimentos coinciden con los consumidos en nuestro país, pero hay muchos otros que no se encuentran ya que son típicamente mexicanos o latinoamericanos. Además de que alimentos como la mantequilla o la crema tienen en México diferentes procesos de elaboración y diferentes formulaciones por lo que tienen distintos contenidos de colesterol.

Es sorprendente que algunos estudios hechos en Estados Unidos con personas mexicanas usen todavía como referencia para medir colesterol en la dieta las tablas del INCAP como es el caso del "San Antonio Heart Study" (Knapp et al, 1985 y Haffner et al, 1985).

Lo anterior nos hace pensar en lo conveniente que sería contar con tablas de composición de alimentos de consumo generalizado en nuestro país que incluyera la cuantificación de colesterol.

Metología para cuantificar colesterol.

Los métodos más empleados para cuantificar colesterol tanto en plasma sanguíneo como en alimentos caen dentro de los métodos de separación por cromatografía así como en los métodos espectrofotométricos visibles. Existen métodos enzimáticos pero su uso es limitado debido a su alto costo (Bohac et al, 1988).

Métodos colorimétricos:

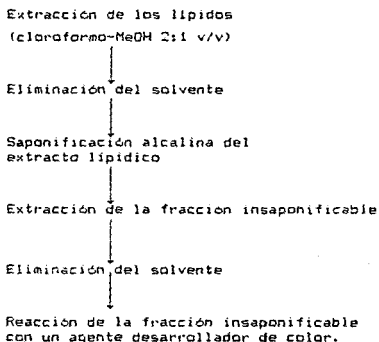
Estos métodos han dado muy buenos resultados en la cuantificación de colesterol en plasma sanguíneo por lo que son los más usados en este sustrato. En la cuantificación de colesterol en alimentos no han tenido la misma aceptación debido a que generalmente hay interferencias por la presencia de otros esteroides. Sin embargo en algunos alimentos como la carne, no se ha encontrado diferencias entre métodos colorimétricos y cromatográficos (Bohac et al, 1988).

La cuantificación de colesterol en alimentos usando un método colorimétrico se esquematiza en la figura 6.

Anteriormente era muy usado separar los esteroides precipitándolos con digitonina para después ser cuantificados por los métodos colorimétricos (Kritchevsky and DeHoff, 1978) pero en ciertos alimentos se presentan problemas ya que la digitonina no solo

precipita al colesterol sino a todos los esteroides presentes en la muestra. En la cuantificación de colesterol plasmático se usó mucho tiempo la digitonina, pero actualmente se prefiere hacer la extracción de los esteroides con solventes (cloroformo-metanol).

FIG No 6. Cuantificación de colesterol en alimentos por colorimetría.

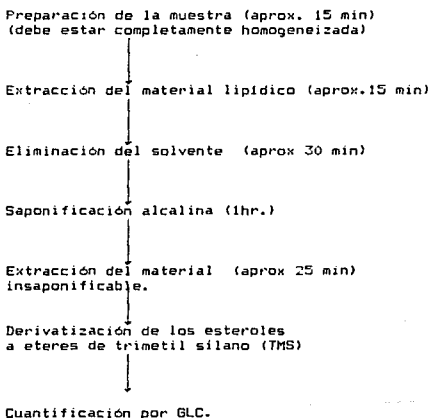


Cuando se cuantifica colesterol en sangre siguiendo este método se pueden hacer ciertas variaciones como por ejemplo, desarrollar el color directamente en el plasma, eliminar el proceso de saponificación o saponificar sin hacer una previa extracción de los lípidos, obteniéndose en algunos casos buenos resultados. Sin embargo cuando se trata de cuantificar colesterol en alimentos es preciso seguir todos los pasos descritos (fig 6) para obtener resultados satisfactorios (Kinney et al 1990; Bohac et al 1988).

Métodos cromatográficos (GLC):

Estos métodos son muy usados para cuantificar colesterol en alimentos. Con pequeñas diferencias entre ellos, como los solventes usados, los estándares internos, las condiciones del cromatógrafo entre otras se ha propuesto el siguiente procedimiento para cuantificar colesterol por métodos cromatográficos, (Bean et al 1984; Hubbard et al, 1977; Ibrahim et al, 1990; Slover et al, 1983) que se esquematiza en la figura 7.

Fig No 7 Secuencia del método cromatográfico para cuantificar colesterol en alimentos.



La extracción generalmente se hace con una mezcla de cloroformo-metanol (2:1 v/v) (Folch et al 1957; Hubbard et al 1977) aunque el AOAC recomienda utilizar Cloroformo-MeOH-Agua. (JAOAC, 1976).

Otros investigadores han propuesto cambios al método antes descrito, Shepard et al 1977, proponen derivatizar los esteroides a ésteres butíricos en lugar de derivatizar a ésteres de trimetil silano (TMS) y Kaneda et al (1980) sugiere eliminar la derivatización con TMS u otro agente de derivatización, este grupo efectuó pruebas comparativas en muestras derivatizadas y sin derivatización y establecieron que este procedimiento no es esencial ya que los métodos cromatográficos permiten una buena separación del colesterol de las impurezas que puedan estar presentes, además de que se reduce el tiempo del análisis.

Cabe señalar por otro lado, que la extracción de los lípidos de tejidos biológicos suele complicarse por una serie de factores, que se pueden resumir en (Chapman, 1970; Kovacs et al, 1979):

- algunos lípidos están unidos a las proteínas o carbohidratos formando complejos que suelen ser insolubles en los solventes empleados en la extracción de los lípidos tales como cloroformo, metanol y éter.
- Algunos lípidos se disuelven sólo parcialmente en estos solventes, sobre todo lípidos que tienen una estructura compleja como las lipoproteínas.
- Otros constituyentes no lipídicos son solubles en estos compuestos.

Con estos antecedentes en la última década se reportan algunos estudios (Kovacs et al, 1979; Slover et al, 1983), que proponen la cuantificación del colesterol directamente sobre la muestra, eliminando la operación de extracción de los lípidos.

MATERIALES Y METODOS.

Los métodos tradicionales para cuantificar colesterol incluyen una etapa de extracción del material lipídico del sustrato. La cual complica el análisis ya que en muchos alimentos el colesterol se encuentra formando complejos con fosfolípidos y proteínas, que son difícilmente extraíbles con los solventes usualmente utilizados. Por lo que en el presente trabajo se propone un método en el que se elimina la extracción de los lípidos efectuando una saponificación directa sobre el sustrato.

En el método propuesto se sustituye el tradicional sistema de reflujo por tubos de ensaye herméticamente cerrados lo que reduce significativamente el tiempo de análisis ya que se pueden saponificar simultáneamente varias muestras.

Para el desarrollo del método se planteó el siguiente diseño experimental, que se puede resumir en dos partes:

- 1) Evaluación de precisión y exactitud del método propuesto.
- 2) Cuantificación de colesterol en diversos alimentos.

1) Precisión y exactitud del método propuesto

Para evaluar la precisión de este método se cuantificó el colesterol presente en 9 muestras de un mismo alimento (crema vendida a granel).

Para conocer la exactitud del método propuesto se añadió una cantidad conocida de colesterol a muestras de crema cuyo contenido de colesterol estaba ya determinado por análisis previos. Se cuantificó el colesterol total presente en la muestra y la diferencia entre éste y el contenido de colesterol inicial en el alimento es el colesterol añadido.

Lo anterior se realizó en cuatro muestras de un mismo alimento por los dos métodos.

2) Cuantificación de colesterol en 16 alimentos

Los alimentos fueron elegidos de acuerdo a los siguientes criterios:

-Alimentos de origen animal, que son la principal fuente de colesterol en la dieta.

-Alimentos de consumo popular en la Cd. de Mexico, preferentemente de bajo costo.

La cuantificación se realizó por dos métodos cuyos procedimientos se esquematizan en la fig. 8. El método 1 es el tradicionalmente utilizado que conlleva una previa extracción de la grasa y el método 2 es la cuantificación directa propuesta en este estudio.

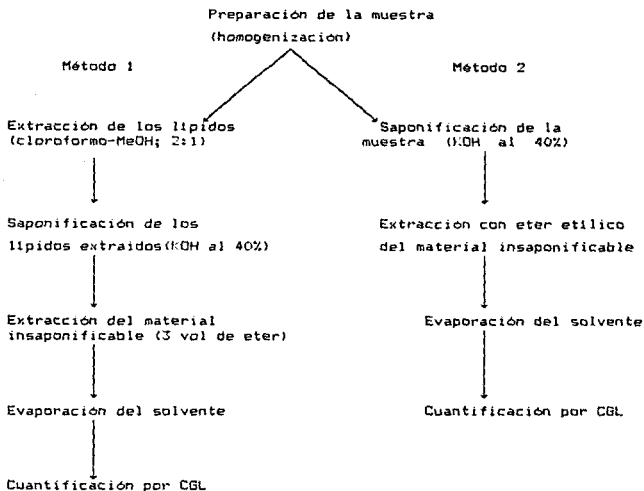
Preparación de la muestra:

Las muestras sólidas (carne, jamón, salchicha, pan, garnacha, tamal) fueron molidas en una picadora Molinex; en el caso del jamón y la salchicha se secaron previamente al análisis. El secado se realizó en una estufa a aproximadamente 60°C durante una hora, midiendo la humedad residual al finalizar este, la humedad se determinó en una termobalanza antes y después del secado. Los resultados finales se expresaron en mg de colesterol/ 100g de porción comestible (base húmeda).

En el caso de la leche entera y fluida (Boreal) fue necesario concentrar (calentando con agitación) hasta un volumen aproximado de 5ml para evitar la dilución de la potasa en la saponificación (Met 2) y para poder hacer adecuadamente la extracción de los lípidos (Met 1).

Las demás muestras solo se homogeneizaron previamente al análisis.

Fig.8 Métodos empleados en la cuantificación de colesterol.



Extracción de los lípidos (método 1).

A la muestra previamente preparada se le añade un volumen de cloroformo-MeOH (2:1) de 20 veces su peso. La mezcla de muestra-solvente se homogeniza durante aproximadamente 10 min con agitación, posteriormente se filtra esta mezcla, y el extracto lipídico se lava con 0.2 veces su volumen de agua destilada, se separa la fase cloroformo-MeOH. La fase acuosa se lava 2 veces con la mezcla de solventes, juntándose las 3 fracciones de cloroformo-MeOH. Se

evapora el solvente, en una parrilla de calentamiento con agitación y bajo una campana con extracción de aire. La evaporación se efectúa hasta tener un volumen aproximado de 3ml que se transfieren a un tubo de ensaye (Hubbard et al, 1977).

Saponificación (Métodos 1 y 2)

En tubos de ensaye con tapon de rosca, se coloca la muestra o el extracto lipidico (en el caso del metodo 1), se adicionan 2ml de KOH al 40% y 10ml de EtOH, se calienta en baño María a aproximadamente 85°C durante una hora, agitando ocasionalmente.

Extracción del material insaponificable (Métodos 1 y 2)

Posteriormente a la saponificación se añade al tubo de ensaye 10ml de agua destilada y se realiza la extracción con 3 porciones de éter etílico de 10ml cada una. Las fracciones etereas se juntan y se lavan con agua destilada hasta que la fase acuosa no presente color al reaccionar con la fenoltaleína, cada lavado se hace con porciones de 10 ml de agua destilada, si despues de varios lavados (3 ó 4) aun hay reacción positiva con la fenoltaleína se pueden hacer lavados con agua acidulada (20ml de HCl 0.01N en 100ml de agua destilada), usando también volúmenes de 10ml intercalando entre estos, lavados con agua destilada.

El extracto etéreo se seca con sulfato de sodio anhidro filtrando posteriormente con papel filtro Whatman No 1.

El extracto se concentra a sequedad utilizando primero una placa de calentamiento con agitación hasta un volumen aproximado de 3ml y despues una corriente de nitrogeno. Los extractos secos se conservan en refrigeración hasta el momento de hacer el análisis cromatográfico,

cuando este se realiza, los extractos se disuelven en 1ml de éter etílico y se inyectan al cromatógrafo 2 μ l del extracto.

Análisis cromatográfico.

Se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890, equipado con un detector de ionización de flama y con una columna de acero inoxidable de 1m de longitud que tiene un diámetro externo de 1/8 in e interno de 2.3mm empacada con Chromosorb WAP como soporte y OV-17 como fase líquida.

Las condiciones cromatográficas empleadas para la cuantificación del colesterol fueron las siguientes:

Temperatura del detector: 325°C

Temperatura del inyector: 325°C

Temperatura del horno: 300°C

Flujo del gas portador (nitrógeno): 20ml/min

Flujo del aire: 400 ml/min

Flujo del hidrógeno: 30ml/min.

Para el análisis de las áreas de los picos se utilizó un integrador Hewlett Packard 3396 A.

Curva de calibración.

Para la cuantificación del colesterol en los alimentos analizados se elaboró una curva de calibración que consta de 7 concentraciones de colesterol contra el área de los picos obtenidos. Se preparó una curva para cada día en el que se efectuaban análisis y cada punto de la curva se realizó por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSION.

Precisión y exactitud

Precisión. Para la evaluación de la precisión del método propuesto se utilizo crema por ser un alimento cuyo contenido de colesterol usualmente se reporta en tablas nacionales e internacionales . Por lo tanto es factible comparar los resultados obtenidos con los reportados en la literatura.

Al repetir el mismo análisis 8 veces sobre una misma muestra utilizando el metodo 2 obtuvimos una desviación estandar de 1.67 y un coeficiente de variación de 1.92%, lo que sugiere que este método es altamente reproducible y por lo tanto confiable. En metodologías para cuantificar colesterol se han obtenido coeficientes de variación de 1.8% (Sheppard et al, 1977).

Exactitud. Cuando añadimos una cantidad conocida de colesterol a la crema obtuvimos una recuperación del 94.0 con el metodo 1 y del 94.75% con el metodo 2 (tabla 3). Con esto se puede establecer que ambos metodos ofrecen la misma exactitud, es decir no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al hacer una prueba de t de student. Lo anterior da más elementos a favor del método propuesto en este estudio que además de ser rápido y sencillo ofrece la misma exactitud del metodo usado tradicionalmente.

TABLA 3. % DE COLESTEROL RECUPERADO.

METODO 1	METODO 2
95	94
94	92
90	95
97	98
X = 94	X = 94.75
S = 2.94	S = 2.49

2) Cuantificación de colesterol en alimentos.

Algunas de las observaciones hechas a los procedimientos seguidos para cuantificar colesterol en los alimentos ensayados, se mencionan a continuación.

Preparación de la muestra. Este procedimiento es sencillo y no se presentaron problemas, aunque alimentos como la leche, donde es necesario concentrar la muestra, aumentan el tiempo de análisis en 15 ó 20min por muestra.

Extracción de los lípidos (método 1). En general la extracción del material lipídico se llevo acabo de manera eficiente, a excepción del huevo entero donde los valores encontrados fueron siempre muy bajos. Por esta razón se optó por trabajar unicamente con la yema, el análisis se repitió numerosas veces sobre este sustrato hasta obtener resultados satisfactorios (semejantes a los reportados en la literatura). Lo anterior se debe a que el colesterol en el huevo se encuentra formando complejos biológicos con fosfolípidos lo que dificulta la extracción. También se presentaron problemas al efectuar la extracción lipídica de los tamales, debido a la consistencia pastosa de este sustrato. El tiempo que se utiliza en este

procedimiento es de 30 a 40 min/muestra lo que hace que el método 1 sea más largo que el método propuesto (Método 2).

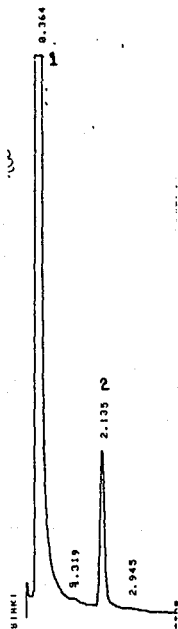
Saponificación. Es posible saponificar varias muestras a la vez, lo que se traduce en una reducción en el tiempo total del análisis. En este trabajo se sustituyó el sistema tradicional de reflujo por tubos de ensayo cerrados herméticamente. Se presentaron problemas con los alimentos típicos ya que se sedimentaban en el fondo del tubo impidiendo la saponificación total de la muestra.

Extracción del material insaponificable. En la mantequilla se presentaron ciertos problemas en este procedimiento que se discutirán más adelante. Los extractos etéreos fueron secados con sulfato de sodio anhidro, se hicieron pruebas comparativas entre muestras secadas con y sin sulfato de sodio, llegando a la conclusión de que el secado es eficiente para remover la humedad presente en el extracto, y no altera el análisis. Es recomendable lavar el sulfato con un poco de éter al finalizar el secado ya que así aseguramos que no se pierda colesterol durante esta operación.

Análisis Cromatográfico. En las condiciones cromatográficas ensayadas se obtuvieron cromatogramas donde el pico correspondiente al colesterol tiene un tiempo de retención de 2.1 minutos. En la figura 9 se muestra el cromatograma correspondiente al colesterol utilizado en la elaboración de la curva de calibración y en la figura 10 el correspondiente a la crema, donde podemos observar la presencia de 2 picos; uno del colesterol y otro en menor proporción, no identificado que aparece con un tiempo de

FIG 9. Cromatograma del colesterol usado en la curva de calibración

1 FRENTE DE SOLVENTE
2 COLESTEROL

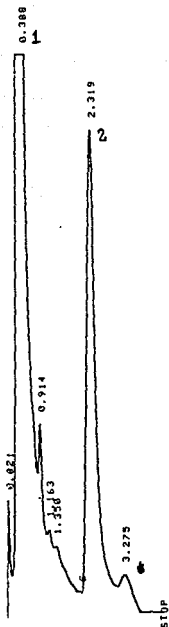


CONDICIONES:
COLUMNA CHROMOSORB WAP/OV17
TEMP. DETECTOR 325 C
TEMP. INYECTOR 325 C
TEMP HORNO 300 C

FLUJO DEL NITROGENO 20ML/MIN
FLUJO DEL AIRE 400ML/MIN
FLUJO DEL HIDROGENO 30ML/MIN

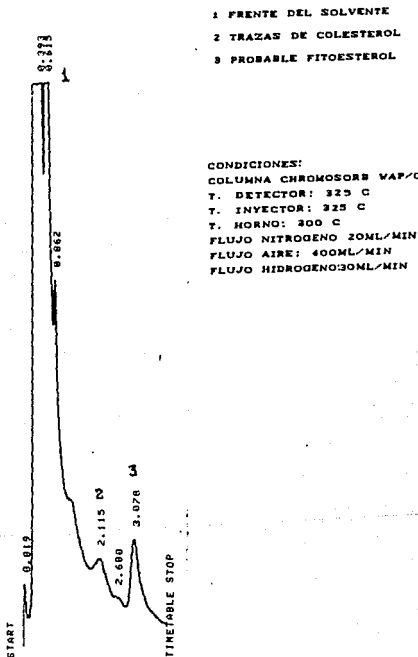
Fig 10. Cromatograma de los esteroides presentes en crema.

1 FRENTE DE SOLVENTE
2 COLESTEROL
• POSIBLE FITOESTEROL



CONDICIONES
COLUMNA CHROMOSORB WAP/OV17
T. DETECTOR: 325 C
T. INYECTOR: 325 C
T. HORNO: 300 C
FLUJO NITROGENO 20ML/MIN
FLUJO AIRE 400ML/MIN
FLUJO HIDROGENO 30ML/MIN

Fig 11 Cromatograma de los esteroides presentes en el aguacate



retención de 3.2min y que probablemente corresponda a algún tipo de fitoesterol.

La figura 11 muestra el cromatograma obtenido con el aguacate, el principal pico que se observa en este cromatograma tiene un tiempo de retención de 3.1 min que corresponde muy probablemente a los fitoesteroles presentes en la muestra

Curva de calibración. En la gráfica 1 se muestra la curva obtenida junto con la desviación estandar para cada punto. El coeficiente de regresión de la curva es de 0.987.

Los valores de contenido de colesterol obtenidos de los alimentos ensayados así como los reportados en la literatura se resumen en la tabla 2 y se discuten a continuación

Productos carnicos

Se encontró similitud entre los dos metodos al cuantificar colesterol en este tipo de productos.

La carne utilizada tiene poco tejido adiposo, de modo que el colesterol está en el tejido muscular, distribuido en el citoplasma (54%) y en la membrana celular (46%), en contraste en el tejido adiposo el colesterol se encuentra principalmente en el citoplasma y en pocas cantidades en la membrana del adiposito (Kinney et al, 1990).

Parte del colesterol presente en el tejido cárnico se encuentra formando complejos con fosfolípidos y proteínas lo que pudiera dificultar la extracción, no obstante se han obtenido resultados satisfactorios cuando se realiza la extracción con cloroformo-MeOH (Bohac et al, 1988).

CURVA DE CALIBRACION

COLESTEROL

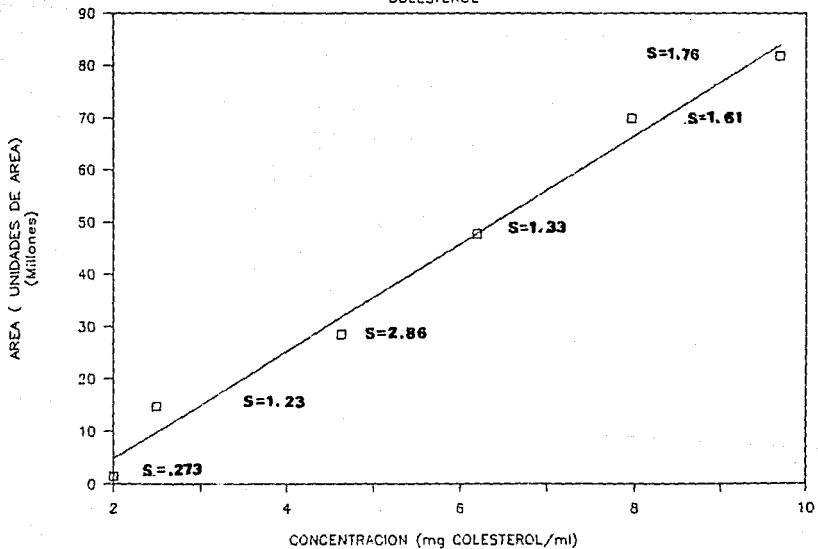


Tabla 2. Contenido de colesterol en los alimentos analizados.

Tipo de alimento	METODOS		Valor reportado en la literatura
	1	2	
mg de colesterol/100g de alimento			
PRODUCTOS CARNICOS			
Jamón	50	57	53 ^c
Salchicha	92	87	58 ^c
Carne cocida de res	169	165	125 ^b
LACTEOS			
Crema a granel	87	86	80 ^b
Leche en polvo entera	101	109	120 ^d
Leche Dalica light	2	4	3 ^d
Leche entera pasteurizada	17	21	14 ^d
Crema "Los Volcanes"	38	40	66 ^d
GRASAS			
Manteca de cerdo	258	241	220 ^a
Mantequilla Nacional	117	125	284 ^b
Mantequilla importada	239	248	284 ^b
CEREALES			
Pan dulce	16	22	26 ^b
HUEVOS			
Yema de gallina	923	1230	1019 ^c
Yema de codorniz	383	378	128 ^a

...continuación de los resultados

Tipo de alimento	METODOS		Valor reportado en la literatura
	1	2	
ALIMENTOS TIPICOS			
Garnacha (tortilla frita en manteca de cerdo, con carne de res)	19	13	—
Tamales	11	15	—

EL VALOR PRESENTADO ES EL PROMEDIO DE TRES DETERMINACIONES. CUANDO LA DIFERENCIA ENTRE LAS DETERMINACIONES FUE MAYOR AL 10% SE REALIZO UNA NUEVA CORRIDA.

- a) Cal A, 1987
- b) Mubbari et al, 1977
- c) Leung WT, 1961
- d) Mc Cance and Widdowson's, 1978
- e) Bilman and Wood, 1983

La cantidad de colesterol varía en las distintas partes del cuerpo del animal, así por ejemplo en el cerdo el contenido de colesterol (mg/100g) es de 95 en la pierna, 90 para el lomo; 114 para la paletilla; 121 para el cuello y 97.1 para las costillas (Cal, 1987). Por lo que el contenido de colesterol de los distintos productos cárnicos (salchichas, salamis, jamón, etc.,) depende de la parte del cuerpo del animal utilizada para la elaboración de los productos.

Los valores de colesterol que encontramos en la salchicha y el jamón utilizando el método propuesto de saponificación fueron semejantes a los presentados en la literatura.

En el caso del jamón, el colesterol aportado es debido principalmente por la carne de cerdo (pierna) por lo que se podría pensar que es difícilmente extraíble, no obstante durante su elaboración el jamón sufre un proceso de calentamiento que posiblemente destruye los complejos dejando al colesterol relativamente más libre (el calentamiento depende del tipo de jamón elaborado).

Las salchichas son elaboradas con carne de res, cerdo, y manteca de cerdo ingredientes que aportan colesterol al producto.

Productos lácteos

El colesterol se encuentra principalmente asociado a los lípidos es por esto que se piensa que entre mayor sea la cantidad de lípidos en la leche, mayor es el contenido de colesterol, esto no es necesariamente cierto ya que el 18 % del colesterol se halla asociado a las proteínas a través de fosfolípidos. La mayor parte del colesterol se

encuentra en su forma libre aunque del 10 al 15 % del total está esterificado.

Como se observa en la tabla 2, en los productos lácteos no se encontró diferencia entre los dos métodos utilizados para cuantificar colesterol. Sin embargo es importante mencionar el caso de la leche condensada baja en calorías (Dálida Light), en donde obtuvimos valores más altos con el método propuesto en comparación a los obtenidos con el método 1. Esta leche se encuentra parcialmente descremada, por lo que el colesterol presente se halla asociado principalmente a proteínas a través de fosfolípidos esto hace que la extracción con cloroformo-MeOH se lleve a cabo de manera incompleta. Por otro lado este efecto se ve incrementado por el bajo contenido de grasa.

Los valores encontrados en la crema (Los Volcanes) son muy bajos en relación a los encontrados en la literatura (66mg/100g según Mc Cance) y a los obtenidos con crema que se vende a granel en los mercados ambulantes de la Cd. de México, que fue la utilizada para medir la precisión del método 2. Esto puede indicar que la crema "Los Volcanes" está adulterada con grasas vegetales aunque en la etiqueta se lea "crema elaborada con leche entera de vaca".

Grasas

En los alimentos analizados pertenecientes al grupo de grasas no se observaron grandes diferencias entre los dos métodos. Es importante mencionar que se encontraron valores más altos de colesterol en la mantequilla importada que en la mantequilla nacional, debido a que en nuestro país es frecuente utilizar mezclas de grasa butírica y aceites vegetales en la elaboración de las mantequillas.

En los análisis de los alimentos grasos evaluados por los dos métodos se presentaron problemas al hacer la extracción del material insaponificable debido a los jabones formados. Las sales de los ácidos grasos de estos alimentos forman micelas que tienen un carácter anfipático, tienen extremos polares y no polares y además, son lo suficientemente grandes como para que cada extremo ejerza su propio comportamiento de solubilidad. Es por lo tanto probable que parte del material insaponificable se disuelva en la parte no polar de las micelas y se pierda en la fase acuosa. Se estableció que para evitar este problema, las extracciones se deben hacer con mucho cuidado, sin agitaciones vigorosas, al contrario de los lavados con agua donde es conveniente agitar para eliminar la mayor parte de jabón posible.

Cereales

Con el método 2 se obtuvieron valores más altos al cuantificar colesterol en el pan, los ingredientes que se usan en la elaboración de este alimento y que contribuyen a su contenido de colesterol son, la manteca de cerdo y el huevo. En estos productos los lípidos y el colesterol se hallan asociados a macromoléculas de proteínas lo que dificulta la extracción lipídica que se lleva a cabo en el método 1, por lo que en alimentos de este tipo el método propuesto suele ser más eficiente.

Huevos

Los huevos de las aves tienen cantidades elevadas de colesterol que se localiza exclusivamente en la yema. El colesterol en el huevo se encuentra principalmente en forma libre y en menor proporción en forma esterificada (Bitman and Wood, 1980). Parte del colesterol está

formando complejos con la lecitina, por lo que anteriormente solia hacerse, previamente a la extracción con éter etílico una digestión con HCl, pero se ha demostrado que se obtienen resultados similares cuando la extracción se efectua con cloroformo-MeOH (Hubbard et al, 1977).

El valor de colesterol encontrado para el huevo de codorniz es considerablemente menor al reportado en la literatura para codornices japonesas que es de 12.83 mg de colesterol/g de yema de huevo (Bitman and Wood, 1980). La cantidad de colesterol presente en el huevo depende principalmente del tipo de alimentación del animal y de la variedad de la especie a la que pertenezca por lo que estos factores pueden ser la causa de las diferencia encontradas. Aunque lo anterior no se puede asegurar en este estudio ya que desconocemos la dieta y el tipo de codorniz de la que procedieron los huevos analizados.

La diferencia entre el contenido de colesterol del huevo de gallina y el huevo de codorniz, encontrada también por los investigadores antes mencionados aunque no tan marcada, se debe a una menor capacidad metabólica de las codornices para producir esteroides (Guichard, 1980).

La diferencia entre los dos métodos al cuantificar colesterol en huevo de gallina se debe principalmente a que se analizaron diferentes muestras, se presentaron problemas al realizar la extracción de los lípidos en el método 1, lo que hizo necesario repetir varias veces la determinación de tal forma que se tuvieron que utilizar diferentes muestras. El colesterol en el huevo se encuentra formando complejos biológicos con la lecitina lo que dificulta su extracción (Método 1), el método propuesto elimina estos problemas ya que la saponificación se realiza sobre el total del material

lipídico presente en la muestra y no solamente sobre el que se extrae fácilmente.

Como se puede observar en la tabla de resultados (tabla 2), en la yema del huevo de codorniz los valores obtenidos por los dos métodos fueron semejantes, aunque cabe mencionar que también fué necesario hacer repeticiones del análisis por el método 1.

Alimentos lipicos

En la garnacha obtuvimos valores más altos en el método 1 ya que debido a la consistencia de este alimento se depositaba en el fondo del tubo de ensaye impidiendo la saponificación total de la muestra (método 2). Lo contrario ocurrió con el tamal, con el que se dificultó la extracción y durante la saponificación fué necesario agitar frecuentemente.

Se estableció en este estudio que para cuantificar colesterol en alimentos complejos en su composición, primero la muestra deberá ser completamente homogénea y segundo, el tamaño de las partículas deberá ser tan pequeño como sea posible, para evitar problemas de sedimentación tanto en la extracción en caso del método 1, como en la saponificación en caso del método 2.

En este tipo de alimentos es mejor saponificar directamente la muestra (Método 2) debido a que la extracción lipídica (Método 1) es generalmente ineficiente ya que el colesterol se encuentra formando complejos con proteínas y carbohidratos. Además de que el método 2 ofrece otras ventajas sobre el método 1, como disminución en el tiempo de análisis, reproducibilidad de los resultados y menor manipulación de la muestra durante la cuantificación de colesterol.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

CONCLUSIONES:

El método propuesto es preciso y presenta la misma exactitud del método tradicionalmente empleado, lo que da bases suficientes para asegurar que el método 2 se puede sustituir por el 1. Además el método 2 ofrece una reducción en el tiempo de análisis de aproximadamente 1 hora por muestra y una disminución en el uso de solventes tóxicos y costosos de aproximadamente 150ml de solvente por muestra.

En algunos alimentos como el huevo, donde el colesterol está asociado a complejos biológicos el procedimiento de extracción del material lipídico utilizado en el método 1 es ineficiente, el método 2 no presenta este tipo de problemas por lo que es más aconsejable en este tipo de alimentos.

En alimentos de composición compleja como es el caso de alimentos típicos se requiere que la muestra este perfectamente homogenizada y que el tamaño de partícula sea lo más pequeña posible para cualquiera de los métodos ensayados en este estudio. En estos alimentos el colesterol está generalmente asociado a proteínas y carbohidratos formando complejos, por lo que también es más recomendable el uso del método 2.

Creemos que esta misma técnica puede servir para la cuantificación de otros esteroides presentes en alimentos como son el campesterol, stigmaesterol y el sitosterol.

La cuantificación del colesterol en alimentos es importante no solo para controlar su ingesta en personas con problemas cardiovasculares, sino también para determinar adulteraciones en productos lácteos y para detectar la presencia de grasas animales y vegetales. El contenido de huevo (exactamente de yemas de huevo) en pastas y pasteles puede conocerse a través de la cuantificación de colesterol en estos productos por cromatografía de gases..

BIBLIOGRAFIA:

Asmann G, (1983). "El diagnóstico lipídico" Lipid News-Edición en español- 2183-1 Ed Lakeside.

Bean G, Fernando I, Holden M, and Patterson G. (1984). Total plants analyses of sterol and fatty acids of the winged bean. J food Sci 49:964-966.

Belitz HD, Gross W, "Food Chemistry" Ed. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg (1987).

Beynen CA, and Jatan BM (1985). Why do polyunsaturated fatty acids lower serum cholesterol. Am J Clin Nutr 42:560-563.

Biró GY and Romics L (1983). The importance of lipid research in medicine: Requirements, utilization of results. Fat Science Part A: 33-58 Ed. J Hulio Elsevier.

Bitman J and Wood LD (1980). Cholesterol and cholesteryl esters of eggs from various avian species. Foul Sci 59(9):2014-2023

Bohac EC, Rhee SK, Cross RH and Ono K (1988). Assesment of methodologies for colorimetric cholesterol assay of meats. J Food Sci 53(6):1642-1644.

Brow V, Ginsberg HandKarmally W (1984). Dietand decrease of coronary heart disease. Am J Cardiol 54: 27 C-29 C.

Burges H, Chávez A, Hernández M (1977). Valor nutritivo de los alimentos mexicanos. Tablas de uso práctico. Ed. Instituto Nacional de la Nutrición. México.

Byron HW (1983). Fundamentals of Dairy Chemistry Second edition, The AVI Publishing company, inc.

Cal A (1987). Fats & Foods.- The health & nutrition factor. Food Processing (October) 41-49.

Chapman D y García RJL (1973). Lípidos. 1^{era} Edición Madrid 1973 Ed Alhambra.

Cheaskin E and Ringsdorf WM (1980). Another look at the "ideal" serum cholesterol level. Arch Inter Med 140:580-581.

Cueto GL, Barrios VR, Pérez CG, Alva M, García BI (1987). Prevención de la aterosclerosis coronaria (I) Conceptos patológicos y etiopatogénicos básicos Arch Inst Cardiol Mex: 57:331-336.

Elliot J (1979). An "ideal" serum cholesterol level? JAMA 241:19

Frick MH, Elo O, Haapa K, Heinonen OP, Heinsalmi P, Helo P, Huttunen JK, Kaitaniemi P, Koskinen P, Manninen V, Maenpää H, Malkonen M, Mänttari M, Nurola S, Pasternack A, Pitkanainen J, Romo M, Sjöblom T, Nikkilä EA (1987). Helsinki Heart Study: Primary prevention trial with gemfibrozil in middle-aged men with dyslipidemia. N Engl J Med 317:1237-1245.

Folch J, Lees M and Stanley GHS (1957). Simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226:497.

Guichard A, Scheib B, Haffen K, Mignot MTu and Cedard L (1980). Comparative study in steroidogenesis by quail and chick embryonic gonads in organ culture. *J Steroid Biochem* 12(Jan):83-87.

Goor R, Hosking DJ, Dennis HB, Graves LK, Waldman TG, and Haynes GS (1985). Nutrient intakes among selected North American populations in the Lipids Research Clinics Prevalence Study: Composition of fat intake. *Am J Clin Nutr* 41:299-31

Hayes BO and Rose G (1957). Supplementary food composition table. *J Am Diet A* 33: 26-29.

Haffner MS, Knapp AJ, Hazuda PH, Stern FM and Young AE (1985). Dietary intakes of macronutrients among Mexican Americans and Anglo Americans: The San Antonio heart study. *Am J Clin Nutr* 42: 1266-1275.

Hegsted DM and Nicolsi JR (1987). Individual variation in serum cholesterol levels. *Medical Sciences* 84:6259-6261.

Hillman CL, Peters GS, Fisher A and Fomare WE (1985). The effects of the fiber components pectin, cellulose and lignin on serum cholesterol levels. *Am J Clin Nutr* 42: 207-213.

Hornstra G, Lewis B, Chait A, Turpeinen D, Karvonen MJ, and Vergroesen JA. (1973). Influence of dietary fat on platelet function in men. The Lancet May 26:1155-1157.

Hubbard RD, Sheppard J, Newkirk DR, Frosser AR and Osgood T (1977). Comparison of various methods for the extraction of total lipids, fatty acids, cholesterol and other sterols from food products. J Am Oil Chem Soc 54: 81-83.

Ibrahim N, Puri KR, Kapila S and Unklesbay N (1990). Plant sterols in soybean hulls J food Sci 55: 271-272.

Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Historia (1985). Muertes por causa. S.S.P.

JAOACS (1976). Cholesterol in multicomponent foods. Changes in Methods 43:805, 59:481-484.

Kaneda T, Nakajima A, Fujimoto K and Kobayashi T (1980). Quantitative Analysis of cholesterol in foods by gas-liquid chromatography. J Nutr Sci Vitaminol 26: 497-505.

Kannel WB and Gordon T (1982). The search for an optimum serum cholesterol. Lancet 2:374-375.

Keys A, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Dontas AS, Fidanza F, Karvonen JM, Menotti A, Nedeljkovic S, Funsar S, and Toshima H (1985). Serum cholesterol and cancer mortality in the seven countries study. *AmJ Epidemiology* 121:870-883.

Kinney SM, Cross HR, Smith GC, and Smith SB (1990). Subcellular distribution and composition of lipids in muscle and adipose tissues *J Food Sci* 55:43-45.

Knapp AJ, Haffner MS, Young AE, MaduzaFH, Gardner L and Stern PM (1985). Dietary intakes of essential nutrients among Mexican Americans and Anglo Americans: The San Antonio heart study. *Am J Clin Nutr* 42:307-316.

Kovacs PIM, Anderson WE, and Ackman BR (1979). A simple method for the determination of cholesterol and some plant sterols in fishery-based food products. *J Food Sci* 44: 1299-1301.

Kritchevsky D and Dehoff LJ (1978). Sterol content of seafood as a function of analytical method. *J food Sci* 43:1786-1787.

Kritchevsky D, Tepper AS, Klurfeld MD (1985). Dietary protein and atherosclerosis *JAOCS* 64:1167-1171.

Leung WT (1961). *Tablas de composición de alimentos para uso en América Latina*. Instituto de nutrición de Centro América y Panamá (INCAP) Guatemala 1961, 2^o Ed. México 1964 Ed. Interamericana.

Lewis B (1980). Dietary prevention of ischaemic heart disease. Br Med J 281:177-180.

Lopez F, Antonio L, Carboney A, Dominguez S, Juárez I, Pineda C, Ramirez Eloisa, Sánchez MC, Zepeda F (1988). Estudio de la cardiopatía isquémica, hipertensión arterial y diabetes mellitus en población trabajadora de la Secretaría de Salud en el Distrito Federal. Ed. por Secretaría de Salud, Subsecretaría de Servicios de Salud, Dirección General de Medicina Preventiva y la Organización Panamericana de la Salud.

Mahalko JR, Sandstead HH, Johnson LK, Inman LF, Milne DB, Warner RC, and Haunz EA (1984). Effect of consuming fiber from corn bran, soy hulls, or apple powder on glucose tolerance and plasma lipids in type II diabetes. Amer J Clin Nutr 39:25

Márquez MH, Albores SJ, Altamirano DM, (1971). Principales padecimientos encontrados en las necropsias de algunos hospitales de la Ciudad de México. Gaceta Med. Mex. 102:191.

Martin ARC, (1985). Cholesterol. British Food Journal. 87(927): 97-99.

Mellies MJ, Vitale C, Jandacek RJ, LamKin EG, and Glueck CJ (1985). The substitution of sucrose polyester for dietary fat in obese, hypercholesterolemic outpatients. Am J Clin Nutr 41:1287-1298.

McCance and Widdowson's (1978) The composition of foods. Elsevier/North-Holland biomedical Press. Fourth Edition, New York U.S.A.

McMurry PM, Connor EW, Lin SD, Cerqueira TM, Connor LS (1985). The absorption of cholesterol and the esterol balance in the Tarahumara Indians of Mexico: fed cholesterol-free and high cholesterol diets. Am J Clin Nutr 41:1289-1298.

Mongeau R, Siddiqui RI, Emery J and Brassard R, (1990). Effect of dietary fiber concentrated from celery, parsnip, and rutabaga on intestinal function, serum cholesterol and blood glucose response in rats. J Agric Food Chem 38:195-200.

Montgomery (1974). Biochemistry. Most Company Saint Louis.

Nüssel T (1984). Epidemiologia de la aterosclerosis. Lipids News Edición en español 1:7. Ed Lakeside.

Oh YS and Monaco AP (1985). Effect of dietary cholesterol and degree of fat unsaturation on plasma lipid levels, lipoprotein composition, and fecal steroid excretion in normal young adult men. Am J Clin Nutr 42:399-413.

Pearce LM and Dayton S (1971). Incidence of cancer in men on a diet High in polyunsaturated fat. The Lancet 1:464-467.

Roberts L (1987). Study bolster case against cholesterol. Science 237:28-29.

Sheppard JA, Newkirk RD, Hubbard DW and Osgood T (1977). Gas Chromatographic determination of cholesterol and other sterols in foods JADAC 60(6):1302-1306.

Slover HT, Thompson HR and Merola VG (1983). Determination of tocopherols and sterols by capillary gas chromatography. JAOACS 60(8):1524-1528.

Steinberg D (1969). The cholesterol controversy is over. Circulation 80(4): 1070-1078.

Zorrilla E y Gomez FF (1977). Grasas saturadas y no saturadas. Presentado por la división de productos de consumo de Anderson Clayton & Co, S.A. para el decimo congreso Nacional de cardiología en octubre de 1977.