



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

**Manual de Laboratorio de Bioquímica Clínica
General para la Carrera de Médico
Veterinario Zootecnista**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

GLORIA MARIA PEREZ CABRERA

Directora de Tesis: Q. Linda Raquel Patricia Vega Castro

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

1986



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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

INDICE GENERAL

	Página
INTRODUCCION	1
Bibliografía	3
OBJETIVOS GENERALES.....	4
PRIMERA UNIDAD. PRINCIPIOS GENERALES	5
OBJETIVOS	6
I.1.1. Definición de ciencia.....	7
I.1.2. Estructura de la ciencia.....	7
I.1.3. La investigación experimental	9
Bibliografía	10
I.2.1. Introducción al trabajo de laboratorio.....	11
I.3.1. La seguridad en el laboratorio.....	13
Bibliografía.....	18
I.4.1. Obtención de muestras para análisis bioquímicos.....	19
I.4.1.a. Muestreo de la sangre.....	19
I.4.1.b. Manejo de las muestras de sangre.....	21
I.4.1.c. Envío de muestras de sangre.....	22
I.4.1.d. Métodos de obtención de muestras urinarias.....	22
I.4.1.e. Métodos de elección y conservación de muestras para análisis urinarios.....	23
I.4.1.f. Muestras de leche.....	24
Bibliografía.....	25
SEGUNDA UNIDAD. CONCEPTOS GENERALES DE QUIMICA ORGANICA.....	26
OBJETIVOS.....	27
II.1.1. Definición de Química Orgánica.....	28
II.1.2. La teoría estructural.....	28
II.1.3. Mecánica cuántica.....	29
II.1.4. Orbitales atómicos.....	29
II.1.5. Números cuánticos	31
II.1.6. Configuración electrónica.....	32

II.2.1. Configuración tetraédrica del átomo del carbono.....	36
II.3.1. Enlaces químicos.....	38
II.3.1.a. Enlace covalente.....	39
II.3.1.b. Enlace iónico.....	40
II.3.1.c. Enlace covalente polar.....	41
II.3.1.d. Enlace covalente coordinado.....	42
II.4.1. Electronegatividad.....	43
II.5.1. Concepto de molécula polar.....	44
II.5.2. Concepto de molécula dipolo.....	45
II.5.3. Fuerzas intermoleculares.....	48
II.6.1. Clasificación de los compuestos orgánicos.....	49
II.6.2. Homología.....	50
II.6.3. Alcanos o parafinas.....	50
II.6.3.a. Nomenclatura.....	50
II.6.4. Alquenos.....	52
II.6.4.a. Nomenclatura.....	52
II.6.4.b. Propiedades generales.....	54
II.6.5. Alquinos.....	55
II.6.6. Compuestos aromáticos. Benceno.....	55
II.7.1. Grupos funcionales.....	57
II.7.1.a. Alcoholes.....	58
II.7.1.b. Aldehídos y cetonas.....	59
II.7.1.c. Ácidos carboxílicos.....	60
II.7.1.d. Aminas.....	62
II.7.1.e. Éter.....	63
II.7.1.f. Tioéter.....	64
II.7.1.g. Compuestos heterocíclicos.....	64
Bibliografía.....	65
TERCERA UNIDAD. QUÍMICA DE SOLUCIONES ACUOSAS.....	66
OBJETIVOS.....	67
III.1.1. Agua.....	68
III.1.2. Composición del agua.....	68
III.1.3. Estructura de la molécula del agua.....	68
III.1.4. El agua como disolvente.....	70
III.1.5. Solubilidad.....	72
III.1.6. El agua como electrólito.....	73
III.1.7. El agua como ácido y base.....	74
III.1.8. Constante de ionización del agua.....	75
III.2.1. pH.....	76
III.2.2. pK.....	79
III.2.3. Ecuación de Henderson-Hasselbach.....	80
III.2.4. Determinación de pH por medio de indicadores.....	82
III.2.5. Empleo de los indicadores en las titulaciones ácido-base.....	83
III.3.1. Soluciones.....	83
III.3.1.a. Porcentuales.....	84
III.3.1.b. Molares.....	84
III.3.1.c. Normales.....	85
III.3.1.d. Molales.....	86

Bibliografía.....	87
CUARTA UNIDAD. METODOS USADOS EN EL LABORATORIO DE BIOQUIMICA GENERAL..	88
OBJETIVOS.....	89
IV.1. Introducción.....	90
IV.2. Titulación. (Valoración acidimétrica y alcalimétrica).....	90
IV.3. Potenciometría.....	92
IV.3.1. Uso del potenciómetro.....	92
IV.4. Cromatografía.....	93
IV.4.1. Cromatografía en columna.....	94
IV.4.2. Cromatografía en papel.....	94
IV.4.2.a. Cromatografía en papel ascendente.....	95
IV.4.2.b. Cromatografía en papel descendente.....	96
IV.4.2.c. Cromatografía en papel lateral o radial.....	96
IV.4.3. Cromatografía en capa fina.....	98
IV.4.4. Cromatografía de gases.....	99
IV.4.5. Cromatografía por intercambio iónico.....	100
IV.4.6. Cromatografía de exclusión-difusión.....	101
IV.5. Electroforesis.....	102
IV.5.1. Electroforesis en medio líquido.....	102
IV.5.2. Electroforesis en gel.....	102
IV.5.3. Electroforesis en papel.....	103
IV.5.3.a. Electroforesis en acetato de celulosa.....	104
IV.5.3.b. Electroforesis en vena líquida.....	104
IV.5.3.c. Electroforesis de alto voltaje.....	106
IV.5.3.d. Electroforesis en gel de almidón.....	106
IV.5.3.e. Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	106
IV.5.4. Inmunolectroforesis.....	106
IV.6. Colorimetría y espectrofotometría.....	107
IV.6.1. Luz.....	107
IV.6.2. Soluciones coloreadas.....	107
IV.6.3. Ley de Lambert-Beer.....	107
IV.6.3.a. Absorción específica.....	108
IV.6.3.b. Longitud del trayecto luminoso.....	108
IV.6.3.c. Absorbancia.....	108
IV.6.3.d. Transmitancia.....	108
IV.6.3.e. Transmitancia por 100.....	108
IV.6.4. Espectrofotómetros para luz ultravioleta y visible.....	109
IV.6.4.a. Fuente de luz.....	109
IV.6.4.b. Dispositivo de monocromía.....	109
IV.6.4.c. Portamuestras.....	109
IV.6.4.d. Control de sensibilidad.....	110
IV.6.4.e. Detectores fotosensibles.....	110
IV.6.4.f. Control de corriente sin luz.....	110
IV.6.4.g. Aparatos de medición.....	110

IV.6.5. Instrucciones para el manejo del espectrofotómetro Spectronic 20.....	111
IV.6.6. Fotocolorimetría.....	111
IV.6.7. Instrucciones para el manejo del fotocolorímetro Klett-Summerson.....	113
IV.7. Oximetría.....	114
Bibliografía.....	116

QUINTA UNIDAD. TEMAS DE BIOQUÍMICA CON ALCUNAS TÉCNICAS DE INTERÉS VETERINARIO. 118

OBJETIVOS.....	119
----------------	-----

V.1. Soluciones acuosas, Titulación y pH.....	120
V.1.1. Introducción.....	120
V.1.2. Objetivos.....	121
V.1.3. Métodos para preparación de soluciones y titulación.....	121
V.1.3.a. Material y Reactivos.....	121
V.1.3.b. Preparación de una solución ácida Normal.....	122
V.1.3.c. Valoración acidimétrica.....	122
V.1.3.d. Preparación de una solución alcalina.....	122
V.1.3.e. Valoración alcalimétrica.....	122
V.1.4. Medición del pH en muestras de interés veterinario.....	123
V.1.4.a. Método.....	123
V.1.5. Cuestionario.....	123
V.2. Aminoácidos. Separación de aminoácidos por cromatografía en papel y capa fina.....	124
V.2.1. Introducción.....	124
V.2.2. Objetivos.....	125
V.2.3. Métodos de separación e identificación de aminoácidos por cromatografía en papel y capa fina.....	125
V.2.3.a. Material y reactivos.....	125
V.2.3.b. Método para la separación e identificación de aminoácidos por cromatografía en papel de tipo ascendente.....	125
V.2.3.b. Método para la separación e identificación de aminoácidos por cromatografía en capa fina.....	127
V.2.4. Cuestionario.....	127
V.3. Proteínas. Determinaciones cualitativas y cuantitativas de proteínas en muestras biológicas.....	128
V.3.1. Introducción.....	128
V.3.2. Objetivos.....	130
V.3.3. Determinación cualitativa de albúmina en orina. Prueba de Robert.....	130
V.3.3.a. Material y reactivos.....	130
V.3.3.b. Método.....	130
V.3.4. Determinación cualitativa de proteínas en orina. Prueba del ácido sulfosalicílico.....	130
V.3.4.a. Material y reactivos.....	130
V.3.4.b. Método.....	131
V.3.5. Cuantificación de proteínas en la orina por fotocolorimetría.....	131
V.3.5.a. Material y reactivos.....	131
V.3.5.b. Método.....	131

V.3.6. Cuantificación de hemoglobina en sangre por fotocolorimetría.....	132
V.3.6.a. Material y reactivos.....	132
V.3.6.b. Método.....	132
V.3.7. Aislamiento, purificación y determinación de proteína.....	133
V.3.7.a. Material y reactivos.....	133
V.3.7.b. Método.....	133
V.3.7.c. Determinación cuantitativa de proteína por el método de Biuret....	134
V.3.7.c.1. Material y reactivos.....	134
V.3.7.c.2. Método para elaborar una curva de calibración.....	134
V.3.7.c.3. Método para cuantificar las muestras problema.....	135
V.3.8. Cuestionario.....	135
V.4. Enzimas.....	136
V.4.1. Introducción.....	136
V.4.2. Objetivos.....	140
V.4.3. Actividad de ureasa en función del: pH, temperatura, concentración de substrato y concentración de enzima.....	140
V.4.3.a. Material y reactivos.....	140
V.4.3.b. Método.....	141
V.4.4. Medición de la amilasa en suero y orina.....	144
V.4.4.a. Material y reactivos.....	144
V.4.4.b. Método.....	144
V.4.4.c. Notas.....	145
V.4.5. Medición de la lipasa en suero.....	145
V.4.5.a. Material y reactivos.....	145
V.4.5.b. Método.....	145
V.4.6. Cuestionario.....	146
V.5. Carbohidratos.....	146
V.5.1. Introducción.....	146
V.5.2. Objetivos.....	148
V.5.3. Determinación cuantitativa de glucosa por el método de Folin-Wu....	149
V.5.3.a. Material y reactivos.....	149
V.5.3.b. Método.....	149
V.5.4. Determinación cuantitativa de glucosa por el método de Dubowsky....	150
V.5.4.a. Material y reactivos.....	150
V.5.4.b. Método.....	150
V.5.5. Cuestionario.....	151
V.6. Lípidos.....	151
V.6.1. Introducción.....	151
V.6.2. Objetivos.....	153
V.6.3. Medición de los ácidos grasos no esterificados del plasma.....	153
V.6.3.a. Material y reactivos.....	154
V.6.3.b. Método.....	154
V.6.4. Determinación cuantitativa de colesterol total mediante el método de Lieberman-Buchard.....	155
V.6.4.a. Material y reactivos.....	155
V.6.4.b. Método.....	155
V.6.5. Determinación cualitativa de cuerpos cetónicos en una muestra de orina.....	155
V.6.5.a. Material y reactivos.....	156
V.6.5.b. Método.....	156
V.6.6. Cuestionario.....	156
Bibliografía.....	157

CONCLUSIONES.....	161
APENDICE A	162
A.1. Anticoagulantes.....	163
A.2. Teorías de ácidos y bases	166
A.3. Isomerías.....	168
A.4. Datos aproximados de ácidos y bases concentrados.....	169
A.5. Cambio de color e intervalos de pH de importantes indicadores...	170
A.6. Tabla de logaritmos.....	171
A.7. Tabla de antilogaritmos.....	173
A.8. Definición de logaritmo.....	175
A.9. Curva de titulación para un ácido de tipo HA que tiene un $pK=4$..	177
APENDICE B.....	178
B.1. Componentes principales (distintos de las proteínas) de la sangre de los animales domésticos y del hombre (mg/ 100 ml de sangre)..	179
B.2. Electrolitos en la sangre (sa), suero (su), plasma (p) de algunos animales domésticos y del hombre.....	180
B.3. Composición química de la leche de algunos animales domésticos y de la mujer.....	181
B.4. Valores normales de Hb (hemoglobina).....	182
B.5. Variaciones de algunos componentes orgánicos de la sangre en algunas enfermedades.....	184
B.6. Valores normales de algunos componentes bioquímicos del suero o del plasma de animales domésticos.....	186
B.7. Algunas enzimas medidas y sus principales fuentes.....	187
B.8. Variaciones en algunas enzimas de escape de algunas enfermedades	188
B.9. Guía para el diagnóstico de laboratorio de las enfermedades pancreáticas del perro.....	189
B.10 Niveles normales de algunas enzimas séricas de animales domésticos (intervalos de valores o valores medios).....	191
B.11 Valores medios e intervalos de valores de algunas enzimas en suero de sangre normal de animales domésticos.....	192
B.12 Grados de papel filtro Whatman para cromatografía y sus usos...	193
B.13 Solventes para cromatografía en papel.....	194
B.14 Solventes para cromatografía en capa delgada.....	195
B.15 Resinas de intercambio iónico.....	196
B.16 Centrifugación.....	197
B.17 Comparación en la composición química del calostro y la leche madura de vaca.....	197
APENDICE C.....	198
C.1. Método sencillo para preparar buffers o soluciones amortiguadoras Preparación de soluciones.....	199

INTRODUCCION.

La bioquímica clínica tiene un papel vital en la instrucción de los estudiantes de veterinaria. La relación entre el clínico veterinario y la bioquímica clínica es estrecha ya que el material llega al laboratorio porque él lo pide, y los resultados sólo alcanzan su significado completo cuando son interpretados por él con base en sus hallazgos clínicos. Es generalmente reconocido por los clínicos que las pruebas apropiadas de laboratorio revelan muchos datos que están por encima del alcance del exámen físico (4).

Sabemos que aunque los conocimientos sobre los cambios bioquímicos causantes de enfermedad hasta hace algún tiempo recibieron poca atención en medicina veterinaria, actualmente existe un gran número de pruebas bioquímicas potencialmente útiles en los estudios clínicos y es claro que el mayor reto en Patología Clínica serán del área de la Bioquímica (4).

Desde el tiempo en que se reconoció el papel que juega la hipocalcemia en la parésia de la parturienta, se han usado muchas pruebas bioquímicas tales como la determinación de la glucosa sanguínea, nitrógeno ureico sanguíneo, calcio, fósforo y magnesio séricos, para detectar y explicar la causa de muchas enfermedades (6,7,14); así también cada vez aumenta el número de enzimas medibles que sabemos se alteran en las enfermedades y cuyos cambios pueden ser aplicados en el diagnóstico (12,16). Cabe señalar por ejemplo, la miopatía nutricional de los bovinos y ovejas donde el único criterio fiel que indica la presencia de la enfermedad es el elevado nivel de la transaminasa glutámica oxalacética (8,9). Los valores de otras enzimas séricas que están fuera de lo normal también son de valor diagnóstico y determinación de la cuantía del daño en el hígado, páncreas, huesos y otros órganos o sistemas (5,2,1). El sodio y el potasio séricos junto con alteración del equilibrio ácido-base, pueden ser determinados con precisión y rapidez suficientes para influir en el tratamiento de un paciente (11,13). La pericia técnica y los instrumentos necesarios para algunas de estas determinaciones están aumentando en complejidad y por esta razón algunos medios valiosos de diagnóstico tardan en alcanzar uso práctico.

En ocasiones la medicina veterinaria es por necesidad muy utilitaria, y los factores económicos pueden desanimar al clínico de usar procedimientos de laboratorio. En muchas circunstancias esto puede ser una falsa economía desde el punto de vista del clínico y de su cliente. Frecuentemente un diagnóstico correcto ahorra tiempo valioso sobre todo en animales de granja, el cliente puede evitar cuidado y medicación costosos en animales que probablemente no responderán al tratamiento (4). En el caso de la anemia infecciosa equina un diagnóstico correcto por medio de pruebas hematológicas y serológicas será de un valor incalculable no sólo para el cliente inmediato, sino para otros cuyos caballos podrían estar expuestos a esta enfermedad (15).

La enseñanza y aprendizaje de la bioquímica clínica debe desarrollarse alrededor del paciente vivo, pues por este contacto el estudiante se hace participante activo en el proceso del aprendizaje. Cuando la bioquímica clínica es integrada cuidadosamente con el ejercicio clínico, además de proporcionar respuestas diagnósticas conduce al estudiante a considerar algunos de los cambios más fundamentales que ocurren en el paciente (13,3).

La enseñanza de una disciplina pierde eficacia cuando no se dispone de una extensa selección de libros. Algunos de los campos considerados en la bioquímica clínica hace años están bien expuestos en la literatura, y sin lugar a dudas, ha tenido gran influencia en otras áreas; pero otras han estado mal provistas y en algunos casos se ha depositado absoluta confianza en libros de texto relacionados con la medicina humana y ello no siempre es válido ya que se debe extrenar cautela al aplicar los resultados obtenidos en animales de experimentación a situaciones aparentemente comparables con el hombre y viceversa. El conocimiento de los valores en bioquímica es esencial para el patólogo clínico. Afortunadamente mucha de esta información ha sido registrada; pero la invención de nuevas pruebas y técnicas es necesario que esto continúe (10).

Lamentablemente en la actualidad no es posible que el estudiante de la carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia o el mismo clínico se apoyen de una manera más frecuente en bibliografía del área de la Bioquímica clínica y ello se debe entre otros factores a los altos costos en los materiales considerados como herramientas para el aprendizaje de un futuro profesionalista como son, los libros, revistas actualizadas etc., aunado a la escasez o inexistencia de los mismos en bibliotecas y hemerotecas públicas, particulares, en universidades y otros centros de estudios superiores, ocasionan que la educación sea cada vez más difícil para los estudiantes de bajos recursos que desean cursar una licenciatura. Considerando lo anterior, se desarrolló el presente trabajo en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán como una aportación para los estudiantes de Medicina Veterinaria y Zootecnia esperando que sea de utilidad no sólo durante el período del estudio de la bioquímica general como asignatura, sino a través de toda su carrera sea un apoyo más de información para un mejor desempeño profesional.

BIBLIOGRAFIA

1. Archer, R. K.: Haematological Techniques for Use in Animals. F.A. Davis Company, Philadelphia, 1965.
2. Babson, A.L.: Recent developments in diagnostic enzymology. Exp. Med. Surg., Suppl. Issue 1, 1965.
3. Blood, D.C., y Henderson, J. : Veterinary Medicine. Lea and Febiger, Philadelphia, 1960.
4. Boutwell, J.H.: Clinical Chemistry. Lea and Febiger, Philadelphia , 1961.
5. Burnett, S.H.: Notes on the clinical examination of the blood of domesticated animals. Amer. Vet. Reviews, 28:804, 1903.
6. Burnett, S.H.: The clinical pathology of the blood of Domesticated Animals. Taylor and Carpenter, Ithaca, N.Y., 1908.
7. Carstrom, G.: Studies on parturient paresis in dairy cows. II. Determination of calcium ions in bovine serum. Acta Agric. Scd., 4: 357, 1955.
8. Cornelius, D.E., Bishop, J., Switer, J., y Rhode, E.A. : Serum and tissue transaminase activities in domestic animals. Cornell, Vet., 49:116, 1959.
9. Cornelius, C.E., y Kaneko, J.J.: Clinical Biochemistry of Domestic Animals. Academic Press, New York, 1963.
10. Dunlop, G.G.: Diseases of Metabolismo. Ed. 4. W.B.Saunders Co., Philadelphia, 1959.
11. Fish, P.A. : Examination of Urine of the horse and Man. Taylor and Carpenter, Ithaca, New York., 1908.
12. Hoffman, W.S.: The Biochemistry of Clinical Medicine, Ed. 3. Year Book Medical Publishers LTD., Chicago, 1964.
13. Jubb, K.W.F., y Kennedy, P.C.: Pathology of Domestic Animals. Academic Press, New York, 1960.
14. Malkmus, B.: Outlines of Clinical Diagnostics of the Internal diseases of domestic Animals. Alex. Eger, Chicago, 1901.
15. Moore, V.A., Haring, C.M., y Cady, B.J.: The clinical examination of the blood of the horse and its value to the veterinarian. Proc. 41st Annual Convention A.V.M.A., 284, 1904.
16. Peters, J.P.: Quantitative Clinical Chemistry Methods, Vol. I. Billiere, Tindal and Cox, London, 1956.

OBJETIVOS GENERALES

Proporcionar al alumno de la FES-C un manual de laboratorio de Bioquímica Clínica sobre técnicas de aplicación con temas de interés veterinario, acordes con el programa teórico de la asignatura de Bioquímica General, impartida en la carrera de M.V.Z.

Proponer una serie de técnicas de laboratorio para Bioquímica General, que sirvan de base para elaborar un manual que de una manera más objetiva tome en cuenta los factores de recursos económicos, y disponibilidad de equipo, material y reactivos con que cuenta la FES-C.

Proporcionar las bases que permitan que el alumno desarrolle habilidad y destreza en el laboratorio a través de la práctica continua y la utilización de técnicas descritas con un lenguaje sencillo.

Lograr con información reciente y accesible un conocimiento básico que contribuya a un mejor desempeño durante el curso teórico-práctico de la asignatura.

Ofrecer un manual que contenga los conceptos fundamentales y referencias bibliográficas relacionadas con el área de la Bioquímica Clínica que generalmente se hayan dispersos para ser consultados por el alumno.

PRIMERA UNIDAD. PRINCIPIOS GENERALES

1. METODO CIENTIFICO
2. INTRODUCCION AL TRABAJO DE LABORIO.
3. MEDIDAS DE SEGURIDAD EN EL LABORIO
4. OBTENCION DE MUESTRAS PARA ANALISIS BIOQUIMICOS.

OBJETIVOS

Al finalizar esta unidad usted será capaz de:

1. Entender un panorama general sobre la ciencia y su importancia.
2. Conocer los conceptos que conforman la estructura de la ciencia.
3. Definir los conceptos anteriores, ya que a través del curso serán de vital aplicación práctica.
4. Conocer la importancia del trabajo de laboratorio.
5. Conocer los aspectos más importantes sobre la seguridad en el laboratorio.
6. Conocer los métodos de obtención de muestras para análisis bioquímicos en las diferentes especies domésticas.

I.1.1. DEFINICION DE CIENCIA

Tradicionalmente se ha tomado como significado de la ciencia el avance de la comprensión del funcionamiento del mundo observable, el desarrollo de las descripciones lógicas, integradas y constantes de por qué y cómo ocurren determinados sucesos (1,7).

La ciencia está íntimamente ligada con la tecnología moderna (hay quienes sostienen que son indivisibles) y la tecnología es un crecimiento de la sociedad contemporánea. Las actividades de los científicos son un intento para explicar el mundo natural y humano; y los tecnólogos, usan estas explicaciones para manipular este mundo, usar sus propiedades con el fin de construir nuevos objetos, máquinas o aparatos. Los avances científicos contribuyen a la comprensión de la manera como actúan las leyes de la naturaleza y los tecnológicos nos ayudan a controlar el mundo que nos rodea (1,7).

Así pues, la ciencia y la tecnología deben considerarse como dos actividades independientes; el descubrimiento precede a la invención; y la invención hace posible al descubrimiento. Estos enlaces entre la ciencia y la tecnología entre los métodos de la ciencia y los resultados de la misma hacen difícil que acordemos una sola definición precisa sea de ciencia o tecnología (1,7).

"La ciencia es la explicación objetiva y racional del Universo. Es una explicación porque describe las diversas formas en que se manifiestan los procesos existentes, distingue las fases sucesivas y coexistentes observadas en su desarrollo, desentraña sus enlaces internos y sus conexiones con otros procesos, pone al descubierto las interacciones que se ejercen entre unos y otros y determina los requisitos que son necesarios para que ocurra un proceso y suficientes para llevarlo a efecto; y encuentra las condiciones y los medios para hacer más eficaz la intervención humana en el curso de los propios procesos, ya sea acelerándolos, retardándolos, intensificándolos, atenuándolos o modificándolos de varias maneras (7)!"

I.1.2. ESTRUCTURA DE LA CIENCIA

La ciencia es objetiva porque sus explicaciones representan las formas de existencia de los procesos del Universo y constituyen, en rigor, los reflejos mentales producidos por los procesos conocidos y explicados. Así se construye una densa red de vínculos, implicaciones y otros tipos de relaciones posibles entre los procesos conocidos. Luego, dichas conexiones racionales son sometidas a la prueba decisiva de la experiencia, ajustándolas y afinándolas cuantas veces se haga indispensable, hasta conseguir que representen a los enlaces que existen efectivamente entre los procesos. Cuando eso se logra, y sólo entonces las conexiones racionales se convierten en conocimientos objetivos (3,4).

Cada ciencia estudia el Universo específicamente ya que dentro de cada disciplina científica se trata de encontrar explicaciones objetivas y racionales. Así, los dominios propios de cada ciencia, corresponden en algunos casos, a los diferentes niveles de la existencia, y en otros casos, a una propiedad universal (4).

Por ejemplo, la Química tiene como dominio propio el estudio de las reacciones que se ejercen entre las moléculas y produce como consecuencia, la inmensa variedad de composiciones y desintegraciones moleculares que se conocen(4).

En cambio, los procesos que ocurren en el interior de los átomos de los elementos de la tabla periódica, pertenecen a otro nivel de la existencia y constituyen el dominio de estudio de una disciplina diferente que es la Física Atómica. Dentro de cada ciencia resulta pertinente a veces subdividir su dominio, siempre de acuerdo a las características de los procesos indagados, constituyéndose así las diversas ramas de una misma ciencia. Por ejemplo, la Anatomía, la Fisiología, la Histología, la Citología y la Embriología, son algunas de las ramas de la Biología (4,5).

En la ejecución de la actividad científica se establecen constantemente síntesis de las determinaciones logradas a través del desarrollo racional y de los resultados experimentales. En la síntesis se reúnen diversos elementos conocidos primero por separado, conjugándolos en una unidad. Pero el resultado obtenido, la síntesis no es mera agregación de sus elementos integrantes, es un complejo unitario que posee nuevas cualidades. (5,8).

El análisis científico consiste en el descubrimiento y la determinación de las nuevas propiedades que se han producido y que se manifiestan como resultado de la combinación sintética de varios elementos. Las operaciones del análisis sirven para desentrañar y determinar la composición elemental de los procesos existentes (5,8).

El avance del conocimiento sigue un desarrollo en el que se alternan sucesivamente la síntesis y el análisis; de la síntesis racional al análisis experimental, de la síntesis experimental al empleo de la razón analizadora, del análisis experimental al desenvolvimiento sintetizador de la razón, del análisis racional a la síntesis experimental (5).

El conocimiento elemental de los cambios que ocurren en los procesos existentes se adquiere por medio de la observación. Por medio de la observación se registran los movimientos y cambios percibidos directamente por los sentidos, estableciendo así determinaciones simplemente cualitativas (5,8).

La reiteración de las observaciones y el incremento de su exactitud llevan al discernimiento de las relaciones cuantitativas entre los procesos. La determinación cuantitativa y los procedimientos de contar y medir que conlleva, ponen de manifiesto otras conexiones más profundas y ciertas ordenaciones simples entre los procesos. Más adelante, el refinamiento de las mediciones y el mejoramiento de los métodos para calcular traen como consecuencia la posibilidad de determinar los modos de reproducir ciertas condiciones para provocar un resultado previsto. En ese momento queda superada la observación, convirtiéndose en experimento (5,8).

I.1.3. LA INVESTIGACION EXPERIMENTAL

La investigación experimental es una actividad cíclica que consta de varias fases; la hipótesis, la planeación del experimento y diseño del experimento, su ejecución, la obtención de los resultados, la confrontación de los mismos con las predicciones y la interpretación de las conclusiones.(2)

La hipótesis es una predicción que puede ser sugerida por los resultados de otro experimento, o puede suscitarse en el curso de una reflexión racional. En todo caso, la investigación experimental tiene como punto de partida una hipótesis (2,6).

La planeación del experimento requiere de la determinación previa de las condiciones en que se puede provocar el surgimiento del proceso en cuestión, de los medios para mantener el control de esas condiciones y de los procedimientos para observar y medir el comportamiento del proceso. Con base a esas determinaciones se procede a :

Diseñar el experimento especificando los materiales, aparatos, instrumentos y dispositivos que se necesiten, así como las precauciones que deben tomarse para que el experimento funcione satisfactoriamente (2).

En la investigación experimental los resultados dependen directamente del método empleado. Un método riguroso conduce a resultados precisos, mientras que un método vago sólo puede llevar a resultados confusos. Sin embargo, no basta con que el método sea riguroso. También es indispensable que se aplique con habilidad, inteligencia y acierto (2).

El razonamiento es un elemento de la estructura científica, es una operación lógica mediante la cual, partiendo de uno o más juicios, se deriva, de la validez, la posibilidad o la falsedad de otro juicio. Cuando la operación se realiza rigurosamente el resultado que se obtiene es un juicio lógico llamado conclusión (2).

Los movimientos, los cambios y transformaciones a que se encuentran sujetos los procesos existentes están regulados por ciertas relaciones invariantes a las que se denominan leyes objetivas. Cuando se logra descubrir una ley objetiva, se expresa en la forma de una Ley Científica, la cual es una reconstrucción racional que refleja a la ley objetiva, y que enuncia una relación necesaria que se cumple en diversas condiciones y cuyos efectos se manifiestan en la producción de acciones determinadas en los procesos. De esa manera, las leyes que regulan el comportamiento de un proceso permiten explicarlo y sirven de base para predecirlo (2).

Una teoría científica está constituida por un conjunto de leyes ordenadas sistemáticamente que permiten explicar el comportamiento de los procesos estudiados por una ciencia o por algunas de sus ramas. En rigor, una teoría es científicamente válida cuando explica los conocimientos ya comprobados dentro de su dominio y el comportamiento de los otros procesos pertenecientes al mismo dominio aunque todavía no hayan sido experimentados. Los principios científicos son las leyes comunes a diversas disciplinas científicas y expresan aquellas irregularidades en el comportamiento de los procesos en varios niveles de la existencia o, inclusive en el Universo entero. Por consiguiente, las principios forman parte integrante de todas las teorías en las cuales desempeñan la función de Leyes (2).

BIBLIOGRAFIA

1. Bernal, J. D.: La ciencia en la historia, Problemas Científicos y Filosóficos, UNAM, México, 1966.
2. Bunge, M. : La investigación científica, ediciones Ariel, Barcelona, 1969.
3. Gortari, E.: Ciencia y Conciencia en México, Secretaría de Educación Pública, México, 1973.
4. Kedrov, M.B. y Spirkin, : La Ciencia. Editorial Grijalvo, México, 1968.
5. Poincaré, H.: Ciencia y Método. Colección Austral (409), Espasa-Calpe, España, 1963.
6. Poincaré, H.: La ciencia y la hipótesis, Colección Austral, (379), Espasa-Calpe, España, 1963.
7. Wilhelm, S. : ¿ Qué es la ciencia ? Breviarios, Fondo de Cultura Económica, (11), México, 1970.
8. Woolf, A.: Essentials of the Scientific Method. George Allen and Unwin Ltd, Londres. 1962.

1.2.1. INTRODUCCION AL TRABAJO DE LABORATORIO

El estudiante dedica muchas horas al trabajo de laboratorio. Estas horas solamente le serán provechosas cuando comprenda claramente los objetivos que persiga al realizarlo y los medios para alcanzarlos.

Tal vez la mejor manera de ubicarse en el contexto del experimento sea a través del estudio del desarrollo de la ciencia y la tecnología y al comprobar que una de las etapas fundamentales de ese proceso es la praxis, lo que concede enorme importancia a los componentes comunes a cualquier experimento, como es la observación.

La necesidad del trabajo experimental surge siempre de la existencia de un problema y el futuro científico deberá acostumbrarse a aceptarlo como un desafío. Por otro lado, ha de ser capaz de resolver estos problemas por sí mismo ya que mientras no sepa trabajar independientemente su valor como miembro de un equipo disminuirá.

Conviene señalar que la práctica necesaria para poder resolver problemas de tipo experimental, no se logrará jamás con un sistema de laboratorio que proporcione al estudiante amplias y detalladas instrucciones para la ejecución y para el cálculo de resultados de un experimento. Las dos etapas más importantes de la investigación experimental son el análisis preliminar y la evaluación final del experimento. Cuando un experimento está bien planeado, la ejecución del mismo se reduce a una simple recopilación de observaciones, y el verdadero trabajo intelectual se desarrolla antes y después de esa etapa. El permitir que el estudiante pase por alto estas operaciones, (análisis preliminar y evaluación final) indudablemente las más importantes del experimento es darle una idea totalmente equivocada de lo que es el trabajo experimental y negarle la oportunidad de adquirir una verdadera habilidad para la experimentación.

En esta capacidad para el ejercicio intelectual independiente, que sólo se adquiere ejercitando el criterio, reside una de las más importantes cualidades del científico. Todo lo anterior sugiere la actitud que el estudiante deberá guardar con respecto a su trabajo de laboratorio; para que un experimento resulte útil debe constituir una situación nueva y por tanto, un problema que resolver, es decir, debe considerarse cada experimento como un modelo de problema que puede presentarse en una situación real. Tendrá que trabajar en el laboratorio, de lo contrario el tiempo que allí pase será tiempo perdido.

Se espera que el estudiante tome sus propias decisiones en cuanto al método para hacer las mediciones, de manera que pueda recabar la información con un máximo de eficiencia. Sus decisiones serán frecuentemente equivocadas, pero lograrán un aprendizaje más efectivo al reforzar, mediante el análisis retrospectivo, su conducta correcta.

Tendrá que trabajar dentro de un marco de recursos, ya que debe aprender que la habilidad para el trabajo experimental consiste en obtener el máximo rendimiento posible.

La limitación de tiempo también simula situaciones reales de investigación. Los resultados del experimento no serán nunca los ideales, sin embargo, esto no debe tomarse como un defecto sino como un desafío. El trabajo efectivo al evaluar un experimento, reside en filtrar entre toda la información obtenida la que es significativa para ese experimento en particular que suele estar parcialmente encubierta por errores. El experimentador debe aprender a identificar sus fuentes de error, para dentro de lo posible, eliminarlas o tenerlas en cuenta.

Sea cual fuera el grado de control que tenga sobre su experimento, deberá evaluar el grado de confiabilidad de los resultados. Esta evaluación crítica, tiene tanta importancia como la obtención misma de un resultado numérico. La habilidad para manejar estas condiciones sólo se adquiere a través de la experiencia, es tan injusto como frecuente, hacer creer al estudiante que los experimentos son perfectos. El trabajo experimental requiere amplitud de criterio de modo que la actitud analítica no quede anulada ante una idea preconcebida de cómo "debería" resultar el experimento. Esta flexibilidad de discernimiento por parte del estudiante puede malograrse cuando se especifican demasiado los pasos que habrá de seguir para realizar el trabajo de laboratorio. En este tipo de trabajo es importante el aprendizaje y no cumplir con una tarea.

La redacción de los informes de práctica debe enfocarse con la misma norma. Mucho se ha hablado de la necesidad de que tanto médicos como científicos se expresen oralmente y por escrito de manera clara y sustanciosa, siendo esto motivo de preocupación por parte de las instituciones educativas que forman a dichos profesionales. Una de las formas más importantes y frecuentes de comunicación para esta comunidad, es el informe por escrito de su trabajo experimental. Una redacción fluida y clara es producto de una larga práctica y uno de los objetivos que debe perseguirse al elaborar los informes de trabajo. Un informe que se reduzca a una constancia de la realización de un experimento es un desperdicio de tiempo tanto para el alumno como para el maestro. Un estudiante que elabora cuidadosamente su informe se hace merecedor a una discusión detallada y constructiva de ese informe, lo que redundará en beneficio no sólo de él sino de todos los integrantes del grupo de laboratorio.

Podemos decir, concluyendo que el trabajo de laboratorio ofrece al estudiante la oportunidad de comparar sus conocimientos con la realidad y adquirir gran parte de la habilidad y pericia requeridas para un óptimo desempeño profesional, así como fluidez en el análisis de problemas, en la evaluación de los resultados y en la comunicación de éstos para beneficio de la colectividad.

I.3.1. LA SEGURIDAD EN EL LABORATORIO

Además de aprender a realizar lo mejor posible las distintas prácticas de laboratorio, el estudiante debe recordar constantemente las posibles causas de accidentes, los eventuales peligros, y las medidas más eficaces para disminuir las probabilidades de lesiones y daños materiales. Los posibles peligros en el trabajo de laboratorio son:

- a. Incendio o explosión al utilizar solventes inflamables.
- b. Productos químicos tóxicos, corrosivos y causticos.
- c. Quemaduras y escaldaduras, incluyendo los choques eléctricos.
- d. Laceraciones por vidriería rota.
- e. Infecciones por virus, bacterias y parásitos.
- f. Mordeduras de animales.
- g. Peligros de radiación.

En el laboratorio de bioquímica general los primeros cuatro puntos son los que deben de atenderse dada su frecuencia, y dependerá básicamente del tipo de actividad de acuerdo al laboratorio que los puntos antes mencionados cambien por orden de importancia.

I.3.1.a. Incendio y Explosión.

Los disolventes inflamables, como el alcohol, éter, tolueno, xilol, etc., se utilizan en todas las instalaciones de laboratorio. Los vapores de los alcoholes y sobre todo el éter, no solamente pueden encenderse, sino también en ciertas circunstancias estallar. Se recomiendan las siguientes precauciones:

- Los frascos que permanezcan sobre la mesa de laboratorio deben contener la menor cantidad de disolvente compatible con las necesidades de trabajo.
- Las grandes cantidades de disolventes deben guardarse en un cuarto de almacenamiento especial, fresco, bien ventilado, a prueba de fuego si es posible; provisto de extinguidores de CO₂ líquido, y alejado de cualquier flama directa o chispa eléctrica.
- Antes de abrir un frasco de cualquier disolvente inflamable, se verificará que no se encuentre en un radio de dos metros ningún mechero prendido. No debe haber ninguna flama directa a menos de tres metros del éter, ya que sus vapores pesados pueden recorrer distancias considerables sobre la mesa o el piso.
- Los disolventes inflamables no deben usarse en lugares cerrados en donde los vapores puedan acumularse hasta formar con el aire una mezcla explosiva.
- Las soluciones que contengan disolventes inflamables nunca se deben calentar sobre el mechero Bunsen; deben utilizarse los baños de agua a ebullición, las parrillas eléctricas, y cualquier vapor que se produzca debe ser arrastrado por una campana de ventilación.
- De declararse un incendio por disolventes en el laboratorio, debe hacerse lo siguiente:
Para un incendio pequeño en un matraz etc., se eliminará el oxígeno necesario para la combustión cubriendo con un recipiente mayor o se ahogará el fuego con un paño mojado o se combatirá con un extinguidor de bióxido de carbono.
Cuando el disolvente sea derramado sobre parte de la mesa o del piso, etc.,

se utilizará un extinguidor de dióxido de carbono. Si el fuego no puede vencerse de inmediato, se evacuará el laboratorio y cuartos vecinos a éste para evitar riesgos innecesarios y se llamará al departamento contra incendios de la institución.

Si a una persona se le derrama disolvente inflamable en su ropa o cuerpo y este enciende, no debe de correr, puede rodarse por el piso o utilizar la manta contra incendios.

- En los baños de agua de acero inoxidable, con calentamiento eléctrico, son poco probables los cortos circuitos por oxidación. Sin embargo es más conveniente emplear agua destilada para aforar los baños de agua cuando el nivel desciende por evaporación, y no utilizar agua corriente.

I.3.1.b. Compuestos químicos tóxicos, corrosivos y cáusticos.

Quien se inicia en el trabajo de laboratorio suele saber que los ácidos y bases minerales fuertes son peligrosos. Sin embargo, debe insistirse sobre sus propiedades corrosivas y venenosas. Al manejarlos una y otra vez, es fácil perderles el respeto, y la única manera de lograr seguridad satisfactoria es habituarse a observar una buena técnica. Además el estudiante suele no conocer muchas sustancias tóxicas del laboratorio (alcohol metílico, cloruros, tetracloruro de carbono, etc.), y es preciso hacerle saber sus características venenosas.

Ácidos minerales fuertes.- Ácido sulfúrico, clorhídrico, nítrico y perclórico (ácidos orgánicos fuertes- acético).

Estas sustancias destruyen rápidamente tanto tejamentos como, los tejidos internos. Los accidentes más frecuentes son las proyecciones de ácidos sobre las manos, los ojos, y la cara, y las quemaduras en la boca al pipetear directamente de la botella. (Este último proceder no se debe permitir nunca). Las quemaduras por ácidos tardan mucho en curar, y muchas veces dejan cicatrices permanentes. Están indicadas las precauciones siguientes:

- Al verter ácidos fuertes, para hacer las diluciones con los mismos, deben usarse guantes de caucho. Lo ideal sería llevar también un delantal y anteojos de seguridad, pero estas precauciones sólo son indispensables si se manejan cantidades de ácido (por ejemplo de un garrafón), o cuando sean muy peligrosas las proyecciones aun muy pequeñas (por ejemplo en el caso de usar el ácido perclórico).
- Hasta cuando se trabaja con una pequeña cantidad de ácido fuerte, deben evitarse las proyecciones vertiendo lentamente y empleando frascos con picos vertedores. En cualquier caso la cara se mantendrá lejos del frasco.
- La mejor solución para transferir ácidos fuertes, de frascos grandes, consiste en emplear algunas de las distintas bombas de plástico (propipetas), que existen en el mercado. El empleo de plástico se ha extendido también al envase de productos químicos en recipientes cúbicos de polietileno, provistos de un tapon de suministro integrado. Los reactivos muy ácidos pueden manejarse en el laboratorio empleando un aparato de pipeteo automático o semiautomático.
- Al diluir ácido con agua, se produce calor, sobre todo en el caso del ácido sulfúrico. Si se mezcla una gran cantidad de éste ácido con una pequeña cantidad de agua, puede generarse suficiente calor para producir un estallamiento. Se utilizará un frasco de vidrio Pyrex de pared delgada ya que el calor podría romper un frasco de pared gruesa.
- Se debe limpiar muy bien cualquier líquido derramado al exterior del frasco o de las mesas de trabajo.

Bases fuertes.- Tanto en su forma sólida (hidróxidos de sodio o de potasio) o en solución concentrada (hidróxidos de sodio, potasio y amonio), las bases habituales pueden lesionar profundamente los tejidos, en especial a nivel de my cosas de la boca y del esófago. Al disolverse los hidróxidos sólidos de sodio y potasio en agua, se produce una gran cantidad de calor, que puede ser suficiente para resquebrajar un recipiente de pared gruesa, por ejemplo un probeta. Para hacer soluciones de bases fuertes, deben tomarse las mismas precauciones que con los ácidos fuertes. Cuando se emplean hidróxidos de sodio y de potasio en lentejas es indispensable una agitación constante para evitar que se acumulen en un mismo lugar y se produzca un calentamiento local intenso.

El amoniaco también es peligroso ya que por sus vapores irritantes logran causar daño en los ojos y los pulmones, y las soluciones fuertes de amoniaco deben verse o transvasarse bajo la campana; nunca se pipetearán con la boca .

Todas las quemaduras por productos químicos, deben lavarse intensamente con agua, no aplique aceites a quemaduras severas.

Oxidantes fuertes.- Comprenden las soluciones concentradas de peróxido de hidrógeno, de ácido perclórico, y sólidos como el nitrato férrico, el dicromato de potasio y el ácido crómico. Pueden dañar la piel y los ojos, o combinarse con cualquier sustancia oxidante. Aplicarse las precauciones generales que se mencionan al hablar de los compuestos químicos tóxicos.

Otros compuestos químico tóxicos.- Hay compuestos que no tienen un efecto pronunciado sobre la piel, pero cuya ingestión es peligrosa: alcohol metílico, cianuros, ferro y ferricianuros, compuestos de arsénico, mercurio, oxalatos, nitróprusiato, compuestos de cinc, de plomo, de bario, yodo metálico, acrilamida, aminas aromáticas e hidrocarburos.

Pueden ser ingeridos estos productos cuando:

1. Permanezcan en las manos del estudiante o experimentador, que después las llevará a la boca o tocará sus alimentos con ella, etc.
2. No se tenga cuidado al pipetear soluciones.
3. Se contamine cualquier objeto que se encuentre sobre de la mesa de trabajo. (Nunca deben ingerirse alimentos en el laboratorio).

Debe insistirse en la importancia de rotular correctamente todos los frascos en el laboratorio; hecho particularmente cierto para las soluciones de compuestos venenosos.

Vapores tóxicos.- En algunos casos la ventilación en un laboratorio puede ser suficiente o aceptable para el trabajo ordinario, pero no basta para remover completamente los vapores tóxicos. Lo recomendable es que cualquier manipulación que produzca vapores tóxicos se realizará bajo la campana, pero esta precaución raramente se observa. Los principiantes no siempre se dan cuenta de que los vapores de acetona, cloroformo, éter, tetracloruro de carbono y alcohol metílico pueden ser tan peligrosos como el bromo, cuyos efectos nocivos se conocen mucho mejor.

Las manipulaciones que suponen la evaporación de volúmenes mayores de 10 ml. de estos disolventes deben llevarse a cabo bajo la campana empleando un condensador. El uso de la campana es el mejor método, pues la condensación de los disolventes no resuelve el problema de su alimentación. No deben tirarse por el vertedero grandes volúmenes de líquidos tóxicos o inflamables; deben ser eliminados en pe -

pequeñas cantidades por un tiempo prolongado, o se tirarán en excavaciones hechas para este propósito. Los efectos tóxicos de los vapores de disolventes como el tetracloruro de carbono pueden irse acumulando; en otras palabras, la exposición repetida a concentraciones bajas puede producir finalmente un efecto tóxico semejante a la exposición a una concentración elevada. Aun cuando se utilicen pequeñas cantidades deberá tenerse una buena ventilación.

1.3.1.c. Quemaduras y Escaldaduras.

Las quemaduras son causadas por objetos calientes y secos (cristalería, aparatos eléctricos), y las escaldaduras por líquidos o vapores calientes. La exposición prolongada a los rayos ultravioleta o infrarrojos también pueden producir quemaduras.

El experimentador nunca deberá manejar la cristalería u otros objetos con las manos desnudas si no se tiene la certeza de que están fríos o lo verifica primero. Esta regla que parece tan evidente se aplica pocas veces, por lo que son frecuentes las quemaduras pequeñas. Debe disponerse del equipo necesario para el manejo seguro de los utensilios calientes (guantes de asbesto, pinzas para tubo, vasos crisoles, etc.). Las parrillas eléctricas y otros tipos deben colocarse en forma de evitar lo más posible el contacto accidental de las manos, de los brazos, etc. Es frecuente quemarse los dedos cuando se prende el gas en el interior del mechero Bunsen.

Las escaldaduras suelen deberse a ebullición de líquidos, proyecciones, roturas de recipientes con líquidos calientes o contacto con vapor. Por ejemplo al calentar, la parte inferior de un tubo de ensayo muchas veces provoca la expulsión violenta de su contenido, que puede quemar la cara y las manos.

Al calentar líquidos en recipientes de cristal grueso, y al verter líquidos calientes en recipientes fríos, pueden hacer que se rompa éste y se derrame el líquido. Los frascos de pared delgada pueden romperse por el contacto con una flama directa de un mechero; siempre debe utilizarse una tela metálica con asbesto. Los frascos de fondo redondo son mucho más seguros que los erlenmeyer para calentar líquidos, porque su pared sufre menos. Se puede disminuir la ebullición violenta y las proyecciones de líquidos colocando canicas de cuarzo llamadas también "canicas de ebullición lenta" ya que impiden que se sobrecaliente el líquido.

Quemaduras por choques eléctricos.- Las causas más corrientes de choques eléctricos en el laboratorio son:

1. Manejar aparatos o equipo eléctrico con las manos mojadas o estando parados en piso húmedo.
2. Conexiones eléctricas mal hechas.
3. Los intentos por reparar aparatos eléctricos sin desconectarlos. Debe recordarse que aun después de desconectado, un aparato que contenga grandes condensadores (llamados capacitancias) puede almacenar bastante energía como para lograr producir un choque peligroso. Muchos fotómetros y espectrofotómetros tienen grandes condensadores de este tipo para corregir las variaciones de voltaje de la línea.

4. Rotura de un frasco o de un vaso sobre una parrilla eléctrica, con lo que el agua puede producir un corto circuito en la resistencia llegando así la electricidad a la camisa de protección. En estos casos, siempre debe desconectarse el aparato antes de limpiar el líquido derramado.

Las precauciones de seguridad se deducen de la naturaleza del peligro. Nunca se tocará un aparato eléctrico con las manos húmedas. No deben sobrecargarse los circuitos eléctricos utilizando enchufes eléctricos múltiples. Es mucho mejor pedir consejo y la ayuda de un electricista de la institución para que ellos aumenten el número de tomas eléctricas.

Casi siempre, los choques eléctricos en el laboratorio son de poca importancia pero si el contacto accidental es intenso (por ejemplo con las manos mojadas), el choque puede ser bastante grave para producir pérdida de la conciencia. En este caso, al alejar a la persona del aparato, debe utilizarse algún aislante, por ejemplo, una bata; o de no observarse estas precauciones, el salvador puede sufrir la suerte de la víctima. Debe solicitarse de inmediato atención médica, y y si es necesario, se iniciará respiración artificial aplicando el sistema "boca a boca".

I.3.1.d. Accidentes debidos a la vidriería.

Las lesiones debidas a la vidriería rota son los accidentes más comunes en el laboratorio. Por su forma particular de romperse, los fragmentos de vidrio especialmente el grueso, presentan un borde irregular agudísimo que puede producir heridas graves. La cristalería volumétrica y calibrada de buena calidad cuesta muy caro, y un manejo poco cuidadoso puede significar pérdidas económicas innecesarias. Una baja proporción de roturas es un buen indicio de la eficiencia con que se trabaja en un laboratorio.

Muchas de las precauciones necesarias en el manejo de la cristalería son evidentes, pues corresponden a las de objetos delicados de cualquier naturaleza. Las reglas que siguen son las que se pueden aplicar específicamente a la cristalería de laboratorio:

1. Nunca debe aplicarse mucha fuerza al montar un aparato de cristal, ni al conectar tubos de vidrio en tapones de caucho. En cualquier caso siempre debe protegerse la mano con un paño o un guante grueso. Es mejor mojar el tubo de vidrio con agua destilada antes de hacerlo penetrar en el tapón de caucho.
2. Al tener el tapón "pegado" no debe hacerse fuerza; se empleará la expansión por calor y la pinza de extracción de tapones.
3. El problema de las llaves "pegadas" casi ha desaparecido desde que se utilizan, tapones y llaves de teflón para algunos tipos de buretas, embudos de separación y otros aparatos.
4. En una centrífuga, los tubos soportan fuerzas considerables; si están fijados, se romperán a velocidades muy bajas. Los tubos de centrífuga de todos tamaños deben ajustar lo mejor posible a los portatubos de metal (poner un tubo pequeño en un portatubo grande es peligroso) y debe verificarse la presencia y el estado de los amortiguadores de caucho en el fondo de los portatubos. Para grandes velocidades (por encima de las tres mil rpm), los tubos de fondo redondo resisten mejor que los cónicos; para velocidades muy altas se necesitarán tubos de plástico.

BIBLIOGRAFIA

1. Lynch, J.M., Raphael, S.S., Mellor, D.L., Spare, D.P., Inwood, J.H.M.: Métodos de Laboratorio. Editorial Interamericana, 2a. ed. México, 1985.

I.4.1. OBTENCION DE MUESTRAS PARA ANALISIS BIOQUIMICOS

I.4.1.a. Muestreo de la sangre.

La posición y sujeción efectiva del animal son fundamentales para un muestreo correcto. La práctica apacible y suave, ganará la confianza del animal y reducirá el manejo físico humano, ya que además es necesario destacar, que un animal asustado (animal estresado), puede ocasionar resultados equivocados en varios análisis; por ejemplo glucosa y ácidos grasos no esterificados. A continuación se remarcan varios puntos importantes para un muestreo de sangre. (1)

El sitio de punción debe estar limpio y libre de patógenos; esto incluye recortar el pelo, lavarlo con jabón o detergente (con un antiséptico, como el hexaclorofeno) y después limpieza con alcohol. El corte de pelo puede ser indispensable en animales de exhibición. (1)

En ovejas se puede encontrar una área limpia, haciendo una separación de lana en el vellón. El arrancar o cortar la lana permite la entrada de suciedad. El agua y la grasa favorecen el crecimiento de microorganismos, la inflamación de la piel y la pudrición de la lana. La piel de los caballos, perros y gatos es sensible a muchos jabones medicinales y detergentes. En la práctica el grado de desinfección de la piel es determinado no sólo por el miedo a la infección sino también por la estructura y sensibilidad de la piel. En cambio, la esterilización de los instrumentos de punción (aguja, cánula, catéter, estileto), no tiene consideraciones atenuantes. (1)

Después de la punción, el sitio debe dejarse, seco, limpio y libre de sangre, ya que la humedad o la materia orgánica pueden propiciar una infección.

Es recomendable hacer uso de agujas y jeringas desechables en el muestreo rutinario de la sangre. Actualmente están adquiriendo mucha aceptación las agujas de dos puntas y frascos de vacío con tapón de hule (12).

La sangre capilar es obtenida comúnmente del dedo pulgar, de otro dedo o del lóbulo de la oreja del hombre, y de la oreja y del lecho ungueal de los animales. La manera de hacerlo es clavando un estileto estéril desechable con una punta de 2-3 mm. de largo protegida con hombros romos. El área no debe ser exprimida. Se obtiene sangre capilar "arterializada" haciendo masaje previo de la piel con alcohol o agua caliente para dilatar a las arteriolas. El método es fácil de aplicar a los dedos de los perros y gatos. (11,12)

La sangre venosa es la muestra más comúnmente obtenida de los animales, pero la sangre arterial puede necesitarse para algunos análisis. Las técnicas varían de una especie a otra, según sea la localización de los vasos sanguíneos convenientes y el espesor, dureza y capa de la piel. (12)

Bovinos.- La sangre es obtenida de las venas: yugular, mamaria (abdominal subcutánea) y de las caudales o coccígeas; y de las arterias: carótida, braquial y caudales. La vena yugular puede resaltarse presionando con los dedos el canal yugular. (1)

El vaso es prominente (aprox. de 2 cm de diámetro). Se introduce en él una aguja larga (calibre 14 y 5cm de longitud o calibre 16 y 10 cm). Una práctica más suave es introducir una aguja más fina (calibre 18 de 38mm) en ángulo de 45° con la piel a lo largo de la vena. Este procedimiento es más fácil con la aguja inserta en una jeringa. En cuanto se ha clavado la punta se aplica un poco de succión; si ésta entró en el vaso la sangre aparece en la jeringa. Puede ocurrir que la aguja atraviese la vena y que la punta quede afuera del vaso; entonces retirando la aguja lentamente se llevará la punta dentro de la luz del vaso. Extraída la sangre, se quita la presión sobre la vena y se aplica presión manual sobre la punción antes de sacar la aguja, y por 30 a 60 segundos después para parar el sangrado. (1)

La vena mamaria, se padece de la forma siguiente, cuidando el operador de evitar ser pateado. También es más difícil de limpiar la piel, pero es innecesario destacar la vena en la mayoría de los casos. (1)

Los vasos caudales se encuentran cercanos uno del otro y cualquiera de ellos, sirve para la punción. Se alza la cola y se clava una aguja pequeña (calibre 20 o 22, 25 mm), verticalmente en la línea media hasta que penetre en el vaso. Se identifica la sangre como venosa o arterial; ésta es más roja y sale con mayor presión. La arteria se hace más superficial a unos 23 cm. de la base de la cola, y es más fácil acertar en ella aquí que a unos 13 cm. (1)

La arteria carótida puede ser penetrada presionando sobre la vena yugular e insertando una aguja calibre 18,5cm en su punto medio, donde está colapsada o justamente debajo de su borde ventral en donde está prominente. A veces se perciben las pulsaciones con los dedos o con la aguja; si no es así, se espuja "ciegamente" en el sitio imaginado de la arteria. El éxito de esta técnica aumenta con la práctica. El sangrado de la arteria se cohibe con la presión manual firme por 3 a 5 minutos. (1)

Es preferible usar la arteria braquial, colocarlo la mano sobre la punta del hombro. En vacas delgadas, la arteria se vuelve visible o es fácilmente palpable y se puede penetrar con facilidad. En vacas gordas quizá no se perciban sus latidos y la punción debe hacerse a "ciegas". (7)

Ovejas.- La sangre es obtenida de las venas: yugular (es la más usada), y femoral. Y de la arteria: femoral. Se hace una partición en la lana, a veces previamente cortada, para exponer una área de piel limpia. La yugular se encuentra con frecuencia debajo de la piel, pero puede estar incluida en el tejido adiposo. La piel es blanda y la aguja (calibre 18 a 22,25 mm) entra con facilidad y frecuentemente atraviesa el vaso. Haciendo un poco de succión, la sangre penetrará en la jeringa si la aguja se encuentra en la luz del vaso. (1)

Equino.- Para sangre venosa se utiliza: la yugular. Para la sangre arterial: la carótida (el procedimiento requiere práctica y no debe ser intentado en un animal valioso por una persona inexperta), y la metatarsiana. Una persona diestra por lo general encuentra la vena yugular en el lado izquierdo del equino. Con el pulgar izquierdo en el surco yugular a la mitad de su trayecto en el cuello, se comprime y se sujeta la vena. Se clava la aguja (calibre 18 o 20,38mm de longitud) en ángulo aproximado de 15° con la piel, 1 cm arriba del pulgar que

está sujetando el vaso se introduce 1 o 2 cm bajo la piel, se aumenta el ángulo a 45° y se empuja para que entre en la vena. Esta penetración debe hacerse en un solo movimiento suave y continuo. Esto ayuda a disminuir el sangrado al sacar la aguja. (1, 15)

La arteria metatarsiana está situada en una canaladura sobre la cara antero-externa del corvejón, entre el tercero y el cuarto huesos metatarsianos. Se inyecta en la piel un poco de anestésico local (sin epinefrina ni otro vasoconstrictor), después de unos minutos se pincha la arteria con una aguja calibre 20 y 25 mm, mantenida en ángulo recto con el vaso, firmemente encajado en el surco óseo. (1, 15)

Cerdos.- Se usan las venas: de la oreja, cola y vena cava craneal. De una oreja se toma sangre por incisión de una vena con bisturí o por punción con una aguja. De la cola se puede cortar una porción pequeña de la misma y recoger la sangre. La punción de la vena cava craneal es peligrosa por lo que debe de realizarla una persona experimentada en esto. Las instrucciones al caso, vienen descritas con detalle en la obra titulada Diseases of Swine dirigida por H.W. Dunne y publicada en traducción española por U.T.E.H.A. (9)

Canideos y Felinos.- Se usan las venas: cefálica, safena y yugular. Y la sangre arterial: de la femoral. Es muy útil el servicio de un ayudante experto en el manejo de animales. Las venas cefálica y safena son usadas comúnmente en el perro; algunas veces en el gato. Con la mano el ayudante sujeta con suavidad la cabeza del animal y con la otra rodea el miembro por detrás, arriba del codo (o del corvejón), extendiéndolo un poco. Con el pulgar y los otros dedos de esta mano se fija la piel floja para sujetar el vaso firmemente. (1)

El operador inmoviliza el vaso con el pulgar e inserta la aguja (calibre 18 a 22, 25, 38 mm) arrihía de este punto. De la vena yugular se toma comúnmente sangre en el gato y algunas veces en el perro; el procedimiento es semejante al descrito para otras especies. (1)

La sangre arterial se obtiene de la arteria femoral, que es palpada en su fosa. Este procedimiento es más doloroso y más largo que la venipunción y se recomienda el uso de anestesia local. La infiltración de la piel con un anestésico local es innecesaria para una venipunción, pero si se recomienda para tomar sangre de la arteria femoral. (1)

I.4.1.b. Manejo de las muestras de sangre. (11)

Cuando se usa una aguja de calibre 18, o más delgada, en una jeringa, debe quitarse antes de expulsar la sangre extraída. De esta manera se disminuye el riesgo de que se rompan los eritrocitos. En una jeringa de vidrio, la sangre se coagula en pocos segundos, pero en una jeringa de plástico permanece líquida por algunos minutos.

Es importante que las muestras deban ser rotuladas y conservadas para las pruebas. Un procedimiento útil es colocar el recipiente en hielo picado o en una caja fría, pero no debe ser congelada antes de separar las células, plasma o suero, o de hacer frotis. Para la conservación se emplea el anticoagulante apropiado para la prueba específica. (Consultar apéndice A 1.)

La obtención, transporte y análisis de una muestra de sangre siempre debe registrarse en forma oficial. El incumplimiento de los procedimientos formales de registro descalifica la muestra para todo tratamiento ulterior.

I.4.1.c. Envío de muestras de sangre.

Para cualquier análisis químico (con excepción de la glucosa) y para las pruebas serológicas, la sangre se deja coagular, se centrifuga, y lo que se envía es el suero, este es un líquido de color pajizo claro que se separa de la sangre coagulada. Formado el coágulo, se decanta el suero y se le extrae por aspiración con una pipeta. Para obtener el suero no se usan los anticoagulantes y se debe tener cuidado de que la muestra no tenga daño mecánico de los eritrocitos. El suero en la mayoría de las especies se separa sin centrifugación. Con la sangre de bovino si es necesaria la centrifugación para obtener un buen rendimiento (40 % o más, de suero). Es importante señalar que el plasma es el suero que conserva los factores de la coagulación, entre ellos el fibrinógeno y la protrombina, y se obtiene centrifugando la sangre tratada. (8,12)

Si la sangre se recoge con técnica aséptica y se guarda en un tubo estéril, no necesita conservador. Para medición de glucosa, la sangre se recoge en un tubo que contenga por cada ml de sangre 11 mg de una mezcla de fluoruro de sodio (al 10%) en polvo y tiol. Esta mezcla impide la glucosis. (15)

Para exámenes hematológicos, la muestra de sangre debe llegar a su destino antes de dos horas para que los recuentos celulares y otras pruebas confiables. Para este tipo de exámenes se recomiendan anticoagulantes como ; el oxalato de bismuto, el etilendiaminetetracetato (EDTA) o citrato de sodio. (15)

Los líquidos biológicos, los tejidos, etc., que han de viajar por correo, deben ser preparados y envueltos en forma que no ocurran fugas ni roturas en el viaje; además no deben de constituir ningún peligro para los empleados de correo o cualquier otra persona que los manejen, ni deben echarse a perder.

I.4.1.d. Métodos de obtención de muestras urinarias.

Los métodos que se describen a continuación con algún detalle sólo son aquellos que pueden realizarse en un consultorio.

Los valores de excreción renal tienen considerables fluctuaciones hora tras hora, y las muestras de un momento no revelan el estado metabólico general. Es bueno recordar que una muestra parcial de orina no refleja la situación bioquímica que existe en el momento de tomarla, sino el estado cambiante desde la micción anterior. Para una investigación completa del estado metabólico, se necesita la orina emitida o recogida en 24 horas y para esto conviene tener al animal en una cámara de metabolismo. (10)

Por algún tiempo se creyó que los cambios cuantitativos que sufre la orina en la vejiga eran mínimos. Pero se sabe que pueden producirse cambios importantes por difusión a través de la membrana vesical, y así las muestras no siempre revelarían con exactitud el estado en que la orina sale del riñón. (10)

En algunos animales caseros bien adiestrados se puede recoger la orina de 24 horas, para esto se confina al paciente en la casa y no se le da oportunidad de orinar en ese tiempo. Esto, por supuesto, sólo puede hacerse cuando el animal no padece poliuria y la sustancia que se desea determinar no atraviesa la

pared de la vejiga. El agua se debe limitar para evitar malestar innecesario. Es claro que éste debe ser el método de elección en algunos casos, pero depende de la cooperación del cliente y del grado de adiestramiento casero del animal. A veces es práctico recoger la orina que espontáneamente emite el animal durante el día, pero este método es el menos recomendado. (8)

La técnica adoptada para recoger muestras comienza por una cateterización. La orina recogida se desecha. Evacuada así la vejiga, se pone el animal en una caja de metabolismo con un preservativo en los vasos colectores enfriados. Al final de las 24 horas, la vejiga se vacía de nuevo, y la orina obtenida se añade a la recogida anteriormente. Cuando se requieren de datos muy exactos, se lava la vejiga con solución isotónica y estéril de NaCl antes (y se tira el líquido de lavado) y después del período de colección, y ahora se añade al total el líquido de lavado. Aceptando la inexactitud de la muestra parcial de orina cuando es innecesaria la muestra de 24 horas, la técnica para tomar la muestra debe normalizarse cuando sea posible. La orina de la noche es la más satisfactoria. Está relativamente libre de factores extraños, como son la alimentación y el ejercicio, y representa, con la aproximación que razonablemente puede lograrse una muestra estándar de un día a otro y de un caso a otro. (10)

La cateterización es necesaria cuando se requiere el análisis como elemento de diagnóstico inmediato o cuando se necesita una muestra no contaminada para cultivo bacteriano. Cualquiera que sea el caso, ésta técnica es un procedimiento peligroso y sólo debe emplearse cuando sea absolutamente indispensable.

Los estudios metabólicos de los grandes animales presentan graves problemas, particularmente en condiciones de campo. Ovejas y cabras pueden mantenerse en cajas de metabolismo, y se han ideado casillas especiales para equinos y bovinos. En el toro, la manipulación del prepucio estimula la micción. Se han ideado aparatos para recoger orina en condiciones de campo para vacunos, ovinos y perros. (2,3, 14,16)

I.4.1.e. Métodos de elección y conservación de muestras para análisis urinarios (4,5)

La muestra de orina ideal para el análisis cualitativo es la que se obtiene en la mañana por "libre micción" en un recipiente limpio. Si no es posible obtener la muestra matinal, es satisfactoria una muestra tomada 3 horas después de la alimentación. La muestra de la mañana es preferida porque aumenta la probabilidad de encontrar componentes anormales. Si se remite a laboratorio inmediatamente, no es necesario refrigerarla ni agregarle un preservativo; éste es indispensable si el medio de enviar la orina es por correo.

La elección del preservativo depende del análisis previsto. Ningún preservativo es satisfactorio para todos los análisis que se pueden realizar en una muestra de orina pero el tolueno es el que origina menos efectos indeseables. Se añade tolueno en suficiente cantidad para formar una película delgada en la superficie de la orina. Este es el mejor preservativo en la mayoría de las determinaciones de componentes químicos. El formol es el conservador preferido para los elementos figurados. Se añade una o dos gotas de formol (40%) por cada 30 o 40 ml. de orina.

Se indica en la etiqueta la adición de formol para evitar la aceptación de valores positivos falsos en pruebas no específicas de azúcares.

Otro conservador utilizado es el timol, que se añade en cantidad de 0.1 g/100 ml. de orina. Es un conservador de uso general y puede dar falsos resultados positivos de albúmina. Para la orina humana se recomiendan las tabletas comerciales de timol, una tableta por cada 30 ml. de orina. Estos comprimidos sirven también para la orina de los animales. Tienen los inconvenientes de que alteran la densidad de la muestra e interfieren en la determinación del pH, sodio y potasio.

Para una breve conservación, la refrigeración es satisfactoria. La congelación de la muestra en un recipiente hermético conserva la orina para determinaciones químicas casi indefinidamente.

Toda determinación cuantitativa de la orina se debe realizar en una parte alícuota de la muestra de 24 horas. Para esto se coloca al animal dentro de una caja metabólica o se le pone un aparato colector como ya se mencionó en el tema anterior. Lo ideal es recoger la orina a medida que cae en el recipiente colector y llevarla inmediatamente al refrigerador, pues la descomposición de la orina es muy rápida y puede alterar los valores reales del análisis.

Para algunos estudios químicos especiales se recomiendan métodos muy específicos como por ejemplo; para la determinación del nitrógeno alfa-amino se recomienda usar el tolueno y la refrigeración; para el amonio, el tolueno; para el calcio y el fósforo inorgánico, 10 ml. de HCl concentrado, con un pH entre 2.0 y 3.0; para creatina y creatinina, tolueno; para 17-cetosteroides, refrigeración; para acidez valorable, tolueno y refrigeración; para otras hormonas refrigeración.

I.4.1.f. Muestras de leche. (5)

La principal preocupación en la obtención de muestras de leche es evitar la contaminación con la parte externa de la glándula mamaria. La superficie de la glándula se lava con solución suave de un detergente o de un desinfectante, y se seca. El orificio del pezón se limpia con alcohol y se deja secar antes de tomar las muestras en los recipientes.

Las muestras de leche de los animales pequeños (perros y gatos) son difíciles de extraer y sólo se obtienen volúmenes pequeños. El muestreo se facilita usando una pequeña pipeta estéril fija a un tubo de hule, similar al aparato usado para cuenta globular. Cuando se hace vacío, la leche llena la pipeta y después se traslada a un recipiente.

Los recipientes en que se guarden las muestras deberán ser lo suficientemente resistentes para evitar durante su traslado posibles rupturas. Se recomienda que estos se coloquen en cajas de envío en las cuales se coloca suficiente material absorbente para impedir que un recipiente roto deje escapar su contenido. El envío seguro de muestras frágiles y de implementos de laboratorio ha mejorado considerablemente desde que se dispone de una gran variedad de envases de plásticos.

BIBLIOGRAFIA

1. Archer, R.K.: Haematological Technique for Use in Animals. F.A. Davis Company, Philadelphia, 1965.
2. Border, J.R., Harris, L.E., y Butcher, J.E.: Apparatus for obtaining sustained quantitative collections of urine from male cattle grazing pasture or range. *J. Anim. Sci.*, 22:521, 1963.
3. Bredon, R.M., Marshall, R., y Juko, J.E.: The nutrition of Zebu cattle. 1. Equipment for separate collection of urine and faeces from steers. *J. Agric. Sci.*, 56:91, 1961.
4. Cornelius, S.E. y Kaneko, J.J.: Clinical Biochemistry of Domestic Animals, Ed. 1. Academic Press. New York, 1963.
5. Davidsohn, E., y Wells, B.B.: Clinical Diagnosis by Laboratory Methods, Ed. 13. W.B. Saunders CO., Philadelphia, 1962.
6. Eichlberger, J.W., Jr.: Laboratory Methods in Blood Coagulation. Hoeber Medical Division, Harper and Row, New York, 1965.
7. Fisher, E.W.: Arterial puncture in cattle. *Vet. Rec.*, 60:691, 1956.
8. Harvey, D.G.: On the routine chemical analysis of small volumes of urine. *Brit. Vet. J.*, 113:52, 1957.
9. Hokanson, J.F., y Luedeke, A.J.: Miscellaneous operations. In *Diseases of Swine*, Ed. 2, edited by H.W. Dunne, p.785. Iowa State University Press, Ames, 1964.
10. Levinsky, N.G., y Berliner, R.W.: Changes in composition of the urine in ureter and bladder at low urine flow. *Amer. J. Physiol.*, 196:549, 1959.
11. Linman, J.W.: Principles of Hematology. The Mcmillan Co., New York, 1966.
12. Schalm, O.W.: Veterinary Hematology. Ed. 2. Lea and Febiger, Philadelphia, 1965.
13. Tasker, J.B.: Laboratory aids to diagnosis in equine practice. *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, 148:384, 1966.
14. Wairman, F.W., y Paterson, D.: A note on the collection of urine from male cattle and sheep. *J. Agric. Sci.*, 61:253, 1963.
15. Wintrobe, M.M.: Clinical Hematology, Ed.5. Lea and Febiger, Philadelphia 1961.
16. Young, D.R., y Price, R. Utilization of body energy reserve during work in dog. *J. Appl. Physiol.*, 16: 351, 1961.

SEGUNDA UNIDAD.

CONCEPTOS GENERALES DE QUIMICA ORGANICA

1. DEFINICION DE QUIMICA ORGANICA.
2. CONFIGURACION TETRAEDRICA DEL ATOMO DE CARBONO
3. ENLACES QUIMICOS
4. ELECTRONEGATIVIDAD
5. CONCEPTO DE MOLECULA POLAR
6. CLASIFICACION DE LOS COMPUESTOS ORGANICOS
7. DEFINICION DE GRUPO FUNCIONAL

OBJETIVOS

Al finalizar esta unidad usted será capaz de:

1. Definir que estudia la química orgánica, y su importancia.
2. Recordar las bases en que se fundamentan la teoría estructural, la mecánica cuántica, orbitales atómicos, números cuánticos y configuración electrónica.
3. Saber desarrollar la configuración electrónica de cualquier elemento que sea necesario.
4. Conocer la configuración tetrahédrica del carbono.
5. Conocer los diferentes tipos de enlaces químicos más importantes en Química.
6. Definir y entender el fenómeno de electronegatividad.
7. Definir el concepto de molécula polar, dipolar y fuerzas intermoleculares.
8. Recordar la clasificación de los compuestos orgánicos, (homología, alcanos, alquenos, alquinos y compuestos aromáticos).
9. Definir que es un grupo funcional y conocer los de mayor importancia en bioquímica.
10. Entender la importancia de los conceptos anteriores con relación al estudio de la bioquímica.

II.1.1. DEFINICION DE QUIMICA ORGANICA (1,2)

Actualmente se define la química orgánica como aquella que estudia la química covalente del carbono. El nombre de química orgánica se aplicó primero a substancias naturales originadas en plantas y animales como el azúcar ($C_{12}H_{22}O_{11}$) de la caña de azúcar, la urea (CH_4ON_2) de la orina, etc. Hoy se estudian en química orgánica cientos de millones de compuestos que se han obtenido mediante laboriosas técnicas de síntesis.

El carbono posee propiedades tan especiales que le permiten formar una inmensa cantidad de compuestos; esto significa que los átomos de carbono pueden unirse entre sí hasta un grado que es imposible para átomos de cualquier otro elemento. Pueden formar cadenas de miles de átomos o anillos de todos tamaños, que a su vez, pueden tener ramificaciones y uniones cruzadas. A los carbonos de estas cadenas y anillos, se unen otros átomos principalmente hidrógeno y además también flúor, cloro, bromo, yodo, oxígeno, azufre, fósforo y muchos otros. Cada arreglo atómico diferente corresponde a un compuesto distinto con características físicas y químicas particulares.

La química orgánica es un campo inmensamente importante para la tecnología: En la química de colorantes y las drogas, del papel y las tintas, de las pinturas y los plásticos, de la gasolina y los neumáticos; es la química de nuestros alimentos y nuestro vestuario.

La química orgánica es fundamental para la biología y la medicina. Los organismos vivos están constituidos principalmente por substancias orgánicas, además de agua, las moléculas de la "biología molecular" son orgánicas. En esencia los procesos biológicos son cuestiones de la química orgánica.

II.1.2. LA TEORIA ESTRUCTURAL. (3,9)

La teoría estructural es la base o armazón de ideas acerca de como se unen los átomos para formar moléculas. Tiene que ver con el orden en que se juntan los átomos entre sí y con los electrones que los mantienen unidos. Tiene que ver con las formas y tamaños de las moléculas que generan estos átomos y con el modo de distribución de los electrones entre ellos.

A menudo se representa una molécula por un dibujo o un modelo, a veces por varios dibujos o varios modelos; aunque estos son útiles para nosotros sólo si entendemos lo que se supone que signifiquen. Interpretados en función de la teoría estructural, nos revelan bastante acerca del compuesto cuyas moléculas representan: Cómo proceder para hacerlo; qué propiedades se pueden esperar de él (punto de fusión, de ebullición, densidad), el tipo de solvente en que se disolverá el compuesto; qué tipo de comportamiento químico es de esperar, la clase de reactivos con los que reaccionará, el tipo de productos que formará y si reacciona rápida o lentamente. Sabríamos todo esto acerca de un compuesto que nunca antes hubiéramos conocido, simplemente con base en su fórmula estructural y cómo entendemos lo que ésta significa.

II.1.3. MECANICA CUANTICA (3,9)

En 1926 Erwin Schrödinger de la Universidad de Zurich sacó a la luz una teoría conocida como mecánica cuántica cuyo desarrollo en expresiones matemáticas describe el movimiento de un electrón en función de su energía. Estas expresiones matemáticas se conocen como ecuaciones de onda, puesto que se basan en el concepto de que el electrón no sólo presenta propiedades de partículas sino también de ondas.

Una ecuación de onda tiene muchas soluciones, llamadas funciones de onda, y cada una de ellas corresponde a un nivel de energía diferente para el electrón. La mecánica cuántica da respuestas que concuerdan tan bien con los hechos que es aceptada hoy en día como la herramienta más fructífera para lograr una comprensión de la estructura atómica y molecular.

II.1.4. ORBITALES ATOMICOS (3,15)

Una ecuación de onda nos revela la probabilidad de encontrar al electrón en cualquier lugar particular. La región del espacio, en la que es probable que se encuentre un electrón, se denomina orbital. Hay diferentes tipos de orbitales, de tamaños y formas diferentes, dispuestos en torno al núcleo de modos específicos. El tipo particular de orbital que ocupe un electrón depende de su energía. Las formas de los orbitales y los arreglos entre sí ayudan a determinar el arreglo espacial de los átomos de una molécula e incluso, su comportamiento químico.

Es conveniente visualizar, cómo se difunde un electrón para formar una nube la que podemos imaginar como una especie de fotografía borrosa del electrón en rápido movimiento. La forma de esta nube es la forma del orbital. La nube no es uniforme sino más densa en aquellas regiones en las cuales las probabilidades de hallar al electrón son máximas, o sea, en aquellas regiones en donde la carga negativa promedio o densidad electrónica es máxima.

Veamos cuales son las formas de algunos orbitales atómicos. El orbital correspondiente al nivel energético más bajo es el 1s, y es una esfera cuyo centro coincide con el núcleo del átomo tal como lo representa la figura II.1

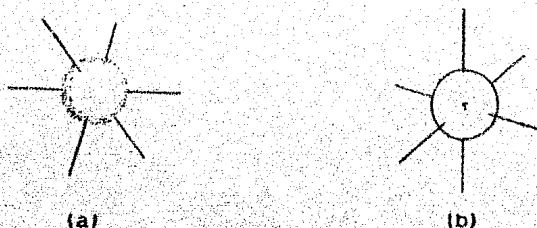


Fig. II.1. Orbitales atómicos
Orbital s (a). Núcleo al centro (b).

A continuación se encuentran tres orbitales de igual energía llamados orbitales 2p, ilustrados en la figura II.2. Cada orbital 2p tiene forma de huso y consiste de dos lóbulos entre los cuales se encuentra el núcleo atómico. El eje de cada orbital 2p es perpendicular a los ejes de los otros dos. Se diferencian por los símbolos $2p_x$, $2p_y$, $2p_z$, en los que x, y, y z se refieren a los ejes correspondientes.

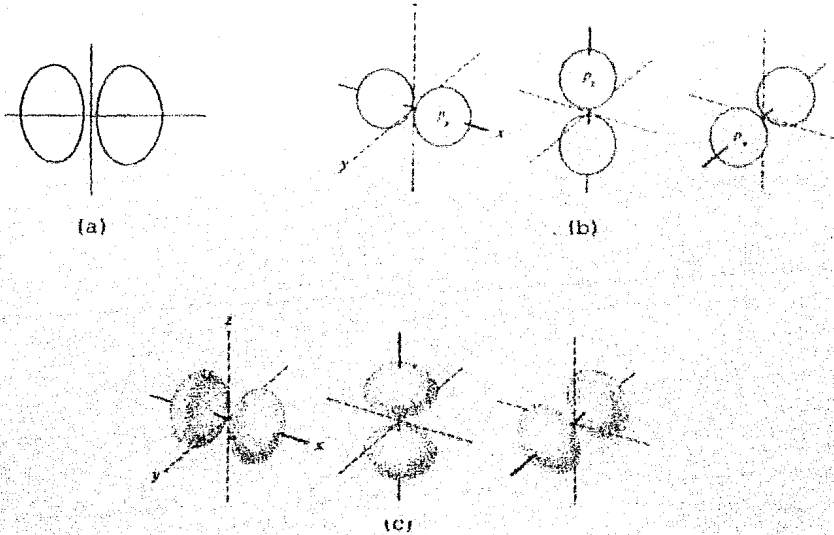


Fig. II.2. Orbitales atómicos: Orbitales p. Ejes mutuamente perpendiculares (a) Corte que ilustra los 2 lóbulos de un orbital. (b) Forma aproximada de pares de elipsoides distorsionados. (c) Representación como pares de esferas que no alcanzan a tocarse.

De igual forma, existen cinco posibles orientaciones de los orbitales d y siete posibles orientaciones para los orbitales f. En la Fig. II.3. se indica claramente el carácter direccional de los orbitales d.

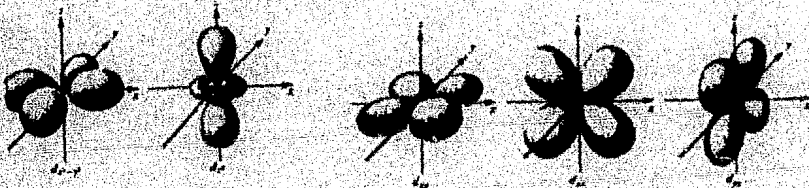


Fig. II.3. Forma y orientación de los orbitales "d"

II.1.5. NUMEROS CUANTICOS (9)

De la ecuación de Schrödinger podemos obtener los cuatro números cuánticos n, l, m y s . Los tres primeros se asocian al movimiento del electrón alrededor del protón, en tanto que el cuarto, (s), es con el giro del electrón sobre su propio eje.

n : número cuántico principal o fundamental, que relaciona la magnitud del volumen ocupado por el orbital o r.e.e.m.p.e. (región espacio energética de manifestación probabilística electrónica). Sólo puede adquirir valores enteros y positivos: $1, 2, 3, \dots, n$.

l : Número cuántico por forma o acimutal. Se relaciona con la forma del orbital en donde se localiza el electrón diferencial (electrón que distingue un elemento del que le precede el orden numérico). Puede adquirir valores que van desde cero hasta $(n-1)$. Cuando l adquiere valores $0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, \dots$ se acostumbra representarlo por las letras $s, p, d, f, g, h, i, \dots$ respectivamente.

m : Número cuántico por orientación, llamado magnético. Se relaciona con el número de probabilidades de orientación espacial de los orbitales, factibles de ser ocupados por el electrón diferencial, para cada valor particular de l , que depende del valor de n . Este número se relaciona con el impulso magnético del electrón diferencial. Los valores permitidos van desde $+l$ hasta $-l$ inclusive el 0 .

s : Es el spin del electrón. Se relaciona con la posibilidad de que en un orbital previamente ocupado, acepte o no al electrón diferencial. Se relaciona también con la suma de los impulsos generados por el giro del electrón diferencial sobre su propio eje. Sólo puede adquirir dos valores el que permite la aceptación del electrón diferencial y el que no la permite. Estos valores se representan por $+1/2$ y $-1/2$ como \uparrow y \downarrow .

La localización de los electrones en los diferentes niveles cuánticos puede ser comprendida en forma sencilla por el principio de orden que dice: Si deseamos investigar el orden en que se van estructurando las regiones espacio energética de manifestación probabilística electrónica, observamos cómo aparecen primero aquellos para los cuales el valor de la combinación cuántica ($n+l$) es mínima y de estas posibilidades se estructurarán primero aquellas para las que el valor de n es el menor. Esto es lo que se denomina principio de máxima sencillez, que está directamente relacionado con la energía de cada nivel y que se representa en la tabla II.1.

Subniveles	n	l	m	n+1	Secuencia Estructuración	Máximo de electrones
1s	1	0	0	1	1	2
2s	2	0	0	2	2	
2p	2	1	-1,0,1	3	3	8
3s	3	0	0	3	4	
3p	3	1	-1,0,1	4	5	18
3d	3	2	-2,-1,0,1,2	5	7	
4s	4	0	0	4	6	
4p	4	1	-1,0,1	5	8	32

Tabla II.1.

Para el orbital 1s, la distribución de probabilidad es esféricamente simétrica alrededor del núcleo. La distribución de la probabilidad para los orbitales p a diferencia del orbital s, no es igualmente probable en todas direcciones. Los tres orbitales p, que pueden existir para cada valor de $n > 1$, tienen una mayor probabilidad en tres direcciones en el sistema de coordenadas cartesianas (x, y, z como ejes). Las subcapas "d" constan de 5 orbitales y las subcapas "f" de 7, por lo que su distribución espacial es más compleja como ya se mencionó en el capítulo anterior.

II.1.6. CONFIGURACION ELECTRONICA. (9)

A las descripciones de estados de energía electrónica de los átomos es a lo que se conoce por estructura o configuración electrónica de un elemento.

Hay una serie de normas que determinan el modo de distribución de los electrones de un átomo, es decir, que fijan la configuración electrónica de un átomo.

De éstas, la regla más fundamental es el principio de exclusión de Pauli: Un orbital atómico determinado puede ser ocupado por sólo dos electrones que, para poder hacerlo, deben tener spins opuestos. Estos electrones de spins opuestos se consideran apareados. Electrones de igual spin tienden a separarse lo más posible. Esta tendencia es el más importante de los factores que determinan las formas y propiedades de las moléculas.

En la tabla de configuraciones de los elementos podemos apreciar que un orbital es ocupado solamente si los de energía más baja están llenos (o sea, 2s después de 1s, 2p luego de 2s). Observamos que un orbital no es ocupado por un par de electrones hasta tanto otros orbitales de igual energía no sean ocupados por un electrón (o sea, los orbitales 2p). (ver tabla II.2.)

CONFIGURACION ELECTRONICA
DE LOS
ELEMENTOS

Elemento	1s	2s	2p	3s	3p	3d	4s	4p	4d	4f	5s	5p	5d	5f	5g
1. H	1														
2. He	2														
3. Li	2	1													
4. Be	2	2													
5. B	2	2	1												
6. C	2	2	2												
7. N	2	2	3												
8. O	2	2	4												
9. F	2	2	5												
10. Ne	2	2	6												
11. Na	2	2	6	1											
12. Mg	2	2	6	2											
13. Al	2	2	6	2	1										
14. Si	2	2	6	2	2										
15. P	2	2	6	2	3										
16. S	2	2	6	2	4										
17. Cl	2	2	6	2	5										
18. Ar	2	2	6	2	6										
19. K	2	2	6	2	6		1								
20. Ca	2	2	6	2	6		2								
21. Sc	2	2	6	2	6	1	2								
22. Ti	2	2	6	2	6	2	2								
23. V	2	2	6	2	6	3	2								
24. Cr	2	2	6	2	6	5	1								
25. Mn	2	2	6	2	6	5	2								
26. Fe	2	2	6	2	6	6	2								
27. Co	2	2	6	2	6	7	2								
28. Ni	2	2	6	2	6	8	2								
29. Cu	2	2	6	2	6	10	1								
30. Zn	2	2	6	2	6	10	2								
31. Ga	2	2	6	2	6	10	2	1							
32. Ge	2	2	6	2	6	10	2	2							
33. As	2	2	6	2	6	10	2	3							
34. Se	2	2	6	2	6	10	2	4							
35. Br	2	2	6	2	6	10	2	5							
36. Kr	2	2	6	2	6	10	2	6							
37. Rb	2	2	6	2	6	10	2	6					1		
38. Sr	2	2	6	2	6	10	2	6					2		
39. Y	2	2	6	2	6	10	2	6	1				2		
40. Zr	2	2	6	2	6	10	2	6	2				2		
41. Nb	2	2	6	2	6	10	2	6	4				1		
42. Mo	2	2	6	2	6	10	2	6	5				1		

Elemento	1s	2s	2p	3s	3p	3d	4s	4p	4d	4f	5s	5p	5d	5f	5g
43. Tc	2	2	6	2	6	10	2	6	6		1				
44. Ru	2	2	6	2	6	10	2	6	7		1				
45. Rh	2	2	6	2	6	10	2	6	8		1				
46. Pd	2	2	6	2	6	10	2	6	10						
47. Ag	2	2	6	2	6	10	2	6	10		1				
48. Cd	2	2	6	2	6	10	2	6	10		2				
49. In	2	2	6	2	6	10	2	6	10		2	1			
50. Sn	2	2	6	2	6	10	2	6	10		2	2			
51. Sb	2	2	6	2	6	10	2	6	10		2	3			
52. Te	2	2	6	2	6	10	2	6	10		2	4			
53. I	2	2	6	2	6	10	2	6	10		2	5			
54. Xe	2	2	6	2	6	10	2	6	10		2	6			

Elemento	K	L	M	4s	4p	4d	4f	5s	5p	5d	5f	5g	6s	6p	6d	6f	6g	6h	7
55. Cs	2	8	18	2	6	10		2	6				1						
56. Ba	2	8	18	2	6	10		2	6				2						
57. La	2	8	18	2	6	10		2	6	1			2						
58. Ce	2	8	18	2	6	10	2	2	6				2						
59. Pr	2	8	18	2	6	10	3	2	6				2						
60. Nd	2	8	18	2	6	10	4	2	6				2						
61. Pm	2	8	18	2	6	10	5	2	6				2						
62. Sm	2	8	18	2	6	10	6	2	6				2						
63. Eu	2	8	18	2	6	10	7	2	6				2						
64. Gd	2	8	18	2	6	10	7	2	6	1			2						
65. Tb	2	8	18	2	6	10	9	2	6				2						
66. Dy	2	8	18	2	6	10	10	2	6				2						
67. Ho	2	8	18	2	6	10	11	2	6				2						
68. Er	2	8	18	2	6	10	12	2	6				2						
69. Tm	2	8	18	2	6	10	13	2	6				2						
70. Yb	2	8	18	2	6	10	14	2	6				2						
71. Lu	2	8	18	2	6	10	14	2	6	1			2						
72. Hf	2	8	18	2	6	10	14	2	6	2			2						
73. Ta	2	8	18	2	6	10	14	2	6	3			2						
74. W	2	8	18	2	6	10	14	2	6	4			2						
75. Re	2	8	18	2	6	10	14	2	6	5			2						
76. Os	2	8	18	2	6	10	14	2	6	6			2						
77. Ir	2	8	18	2	6	10	14	2	6	7			2						
78. Pt	2	8	18	2	6	10	14	2	6	9			1						
79. Au	2	8	18	2	6	10	14	2	6	10			1						
80. Hg	2	8	18	2	6	10	14	2	6	10			2						
81. Tl	2	8	18	2	6	10	14	2	6	10			2	1					
82. Pb	2	8	18	2	6	10	14	2	6	10			2	2					
83. Bi	2	8	18	2	6	10	14	2	6	10			2	3					
84. Po	2	8	18	2	6	10	14	2	6	10			2	4					
85. At	2	8	18	2	6	10	14	2	6	10			2	5					
86. Rn	2	8	18	2	6	10	14	2	6	10			2	6					
87. Fr	2	8	18	2	6	10	14	2	6	10			2	6					1
88. Ra	2	8	18	2	6	10	14	2	6	10			2	6					2
89. Ac	2	8	18	2	6	10	14	2	6	10			2	6	1				2
90. Th	2	8	18	2	6	10	14	2	6	10			2	6	2				2
91. Pa	2	8	18	2	6	10	14	2	6	10			2	6	1				2
92. U	2	8	18	2	6	10	14	2	6	10			2	6	1				2
93. Np	2	8	18	2	6	10	14	2	6	10			2	6					2

94. Pu	2	8	18	2	6	10	14	2	6	10	6	2	6	2
95. Am	2	8	18	2	6	10	14	2	6	10	7	2	6	2
96. Cm	2	8	18	2	6	10	14	2	6	10	7	2	6	2
97. Bk	2	8	18	2	6	10	14	2	6	10	8	2	6	2
98. Cf	2	8	18	2	6	10	14	2	6	10	10	2	6	2
99. Es	2	8	18	2	6	10	14	2	6	10	11	2	6	2
100. Fm	2	8	18	2	6	10	14	2	6	10	12	2	6	2
101. Md	2	8	18	2	6	10	14	2	6	10	13	2	6	2
102. No	2	8	18	2	6	10	14	2	6	10	14	2	6	2
103. Lr	2	8	18	2	6	10	14	2	6	10	14	2	6	2

Tabla II.2.

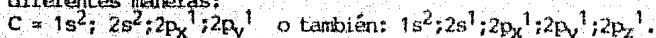
Por ejemplo: El Li, Be, B, C y O, son elementos que siguen en orden progresivo de número atómico, por lo que uno a uno irán aumentando un electrón para formar el siguiente átomo.

El litio tiene tres electrones el parámetro $n = 1$ se completa con dos electrones $1s^2$, el tercer electrón deberá ocupar el siguiente parámetro de energía $2s^1$, por lo tanto la distribución electrónica del átomo Li será: $Li = 1s^2, 2s^1$.

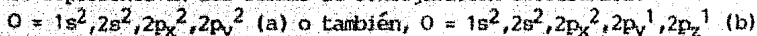
El berilio tiene cuatro electrones. Otra vez dos electrones ocupan reeque u orbital $1s^2$, y dos electrones ocupan la segunda reeque u orbital $2s^2$, por tanto su configuración electrónica será: $Be = 1s^2; 2s^2$. De esta manera queda completa la reeque u orbital $2s^2$ en el berilio. Pero el parámetro cuántico $n = 2$ puede acomodar todavía los electrones p en las reeques u orbitales $2p_x, 2p_y, 2p_z$, que van entrando uno a uno a medida que aumenta el número atómico.

El elemento que sigue es el Boro que tiene cinco electrones. Otra vez dos de ellos ocupan la reeque u orbital $1s^2$. Los otros tres ocupan el parámetro cuántico $n = 2$, con dos electrones con la reeque u orbital $2s^2$ y el tercero ocupa la reeque u orbital $2p_x^1$. Por lo tanto la configuración electrónica del Boro es: $B = 1s^2; 2s^2, 2p_x^1$.

El número atómico del carbono es seis por lo tanto tiene seis electrones. Experimentalmente se ha demostrado que el carbono tiene cuatro enlaces covalentes, por lo tanto se puede representar su configuración electrónica de dos diferentes maneras:



El número atómico del oxígeno es ocho y al igual que el carbono es posible que se represente en dos formas de configuración electrónica:

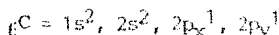


En (a) están llenas dos orbitales p : $2p_x, 2p_y$; en la segunda representación (b) la orbital $2p_x^2$ está completa, en cambio las orbitales p_y y p_z están desapareadas o incompletas. La segunda configuración es la más estable y la más comúnmente aceptable para el oxígeno.

En la tabla periódica, los primeros 39 elementos son tal vez, los que tengan más importancia en el estudio de la bioquímica, y recientemente se han anexado tres elementos más que son: el 104 Kurchatovio, (Ku); 105 Hahnio (Hn); y el Tecnecio (Tc) 106.

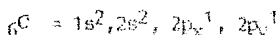
II.2.1. CONFIGURACION TETRAEDRICA DEL ATOMO DE CARBONO (9)

La configuración tetraédrica del carbono deriva del hecho experimental de que para casi dos millones de compuestos moleculares en lo que el carbono es el constituyente básico, forma cuatro enlaces covalentes. Considerando la configuración electrónica del carbono:



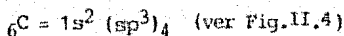
es lógico pensar que el carbono forma dos enlaces covalentes, ya que sólo hay disponibles dos de sus cuatro electrones de valencia para ser compartidos. Sin embargo, experimentalmente se ha demostrado que esta predicción es completamente falsa. Por ejemplo: El compuesto molecular más estable y más sencillo del átomo de carbono es el metano, cuya fórmula molecular verdadera CH_4 y no CH_2 . Además todos los datos experimentales indican que cada enlace de H en el CH_4 es idéntico. Estos hechos experimentales requieren la modificación de la mecánica cuántica del átomo de carbono.

La mecánica cuántica lo explica así: Cuando el átomo de carbono no está combinado existen en su estado mínimo de energía: $1s^2, 2s^2, 2p^2$. En cambio cuando el átomo de carbono reacciona la teoría presupone que uno de los electrones 2s es movido a una reempe 2p de mayor energía en un paso que consume energía:



y entonces se forman cuatro nuevos estados de energía electrónica de idéntico valor de energía en lugar de los diferentes estados de energía electrónica 2s y 2p.

El valor de energía para cada una de las nuevas reempes se puede calcular mediante complicadas matemáticas que mezclan las propiedades originales de la única reempe 2s y las tres reempes 2p. Entonces se modifica la distribución electrónica de manera que los cuatro electrones quedan hibridados, y a tales reempes se les llama reempes híbridas. Cada una de las cuatro reempes híbridas idénticas formadas por una reempe s y tres p se denomina reempe sp^3 y entonces la configuración del átomo de carbono es:

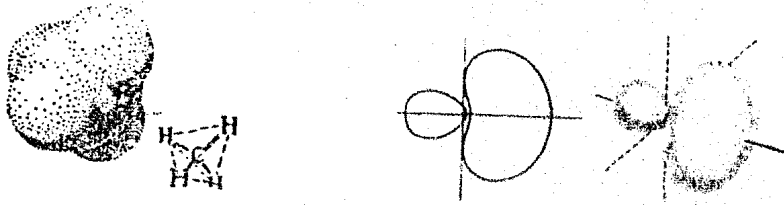


Quando se hacen cálculos de probabilidad según la mecánica cuántica de los reempes s y p, formando reempes de enlaces híbridos sp^3 , se ve que estos irradian simétricamente del núcleo del átomo de carbono, formando entre sí ángulos de 109° C. (ver Fig. II.5) Es decir, dan la configuración espacial tetraédrica, pudiendo explicarse de esta manera los enlaces covalentes del carbono y sus propiedades mediante los enlaces híbridos sp^3 .

Los cuatro enlaces sp^3 se orientan hacia los vértices de un tetraedro en cuyo centro está el átomo de carbono. (ver Fig. II.6)

También sabemos que el enlace C - H es covalente. Además los enlaces C - O, C - N también son covalentes.

En consecuencia, la química orgánica estudia principalmente compuestos con enlaces en contraste con la química inorgánica, la cual se ocupa de todo tipo de enlaces.



(a)

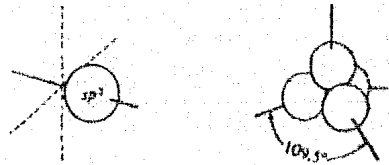
(b)

Fig. II.4.

a) Estructura de la molécula de metano.

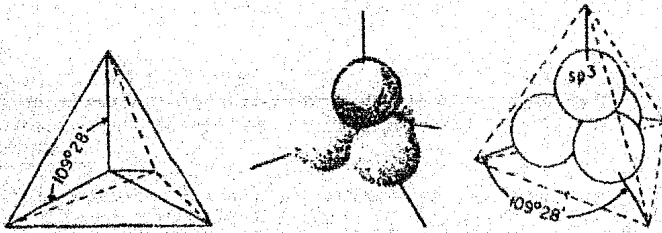
b) Orbitales atómicos: orbitales híbridos sp^3 . Corte transversal y forma aproximada de un orbital aislado. Dirigido fuertemente a lo largo de un eje.

c) Representación como esfera, con omisión del pequeño lóbulo posterior.
d) Cuatro orbitales con ejes dirigidos hacia vértices de un tetraedro.



(c)

(d)



(a)

(b)

Fig. II.5. Modelo del átomo de carbono

Orbitales atómicos en el átomo de carbono; orbitales híbridos sp^3 (ejes dirigidos hacia los vértices del tetraedro).

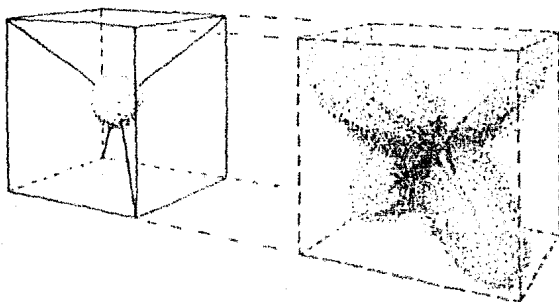


Fig. II.6.

Diagrama que indica (a la izquierda) el orbital 1s de la capa K del átomo de carbono, y (a la derecha) los cuatro orbitales tetraédricos de la capa L.

II.3.1. ENLACES QUÍMICOS (6,7,16)

En la sección II.1.3. se dió una visión de la estructura electrónica de los átomos a partir de la teoría mecánica ondulatoria. Usaremos ahora este conocimiento para examinar el proceso de combinación de los átomos para formar moléculas.

Toda consideración de la estructura molecular debe comenzar con un estudio de los enlaces químicos, o sea, las fuerzas que mantienen unidos a los átomos en una molécula.

En 1916 fueron descritas dos clases de enlace químico: El enlace iónico por Walter Kossel en Alemania y el enlace covalente por G.N. Lewis de la Universidad de California. Tanto Kossel como Lewis basaron sus ideas en el siguiente concepto de átomo.

Un núcleo cargado positivamente se halla rodeado por electrones que se encuentran en capas a niveles energéticos concéntricos. Hay un máximo de electrones que pueden ser acomodados en cada capa: dos en la primera, ocho en la segunda o dieciocho en la tercera y así sucesivamente. Se alcanza estabilidad máxima cuando se completa la capa externa, como en los gases nobles.

Todos los enlaces iónicos como los covalentes surgen de la tendencia de los átomos de alcanzar esta configuración electrónica estable. La tendencia a formar pares de electrones (regla del par) y grupos de ocho (regla del octeto) es un principio básico en la teoría de las combinaciones químicas.

Consideremos ahora la formación de una molécula:

II.3.1.a. Enlace Covalente.

Se forma cuando en la unión de dos átomos cada uno de ellos proporciona un electrón; el par así formado es compartido en forma equitativa por los dos y no pertenece en forma especial a ninguno. Este tipo de enlace es característico de la unión de dos átomos del mismo elemento ya que no existe diferencia en las electronegatividades y por lo tanto la influencia de cada uno de los núcleos de los átomos sobre los electrones de la unión misma.

Este arreglo de electrones y núcleos contienen menos energía o sea, es más estable que el arreglo en los átomos aislados; como resultado, la formación de un enlace se ve acompañada por la liberación de energía. La cantidad de energía (por vol.) desprendida durante la formación del enlace (o la cantidad necesaria para romperlo) se denomina energía de disociación del enlace.

La fuerza del enlace covalente está dado por el aumento en atracción electrostática. En los átomos aislados, cada electrón es atraído por un núcleo positivo; en la molécula cada electrón es atraído por dos núcleos positivos.

Por ejemplo, consideremos la formación de la molécula de hidrógeno H_2 , a partir de dos átomos (ver Fig. II.7.)

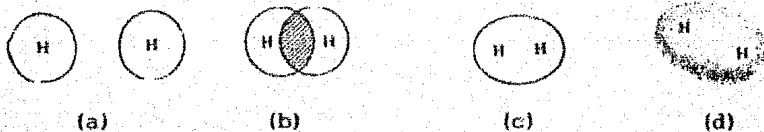


Fig. II.7.

Formación de enlace: molécula de H_2 (a) orbitales "s" separados. (b) traslapo de orbitales "s". (c) y (d) el orbital de enlace sigma.

Cada uno de ellos tiene un electrón, el cual ocupa el orbital $1s$, este es una esfera centrada en el núcleo atómico. Para que se forme el enlace, ambos núcleos deben acercarse lo suficiente como para que se produzca el traslapo de los orbitales atómicos. Para el hidrógeno, el sistema más estable resulta cuando la distancia entre los núcleos es de $0,74 \text{ \AA}$ a la que se llama longitud de enlace.

A esta distancia, el efecto estabilizador del traslape es exactamente equilibrado por la repulsión entre núcleos de igual carga. La molécula de hidrógeno resultante contiene 104 Kcal/mol menos de energía de los átomos de los cuales fue construida. Se dice que el enlace hidrógeno-hidrógeno tiene longitud de 0.74 Å y una fuerza de 104 Kcal.

Este orbital de enlace tiene aproximadamente la misma forma que la que se espera resulte de la fusión de dos orbitales "s".

Tal como lo indica la figura II.7, tiene aspecto de salchicha cuyo eje mayor coincide con la línea que une los núcleos; en torno a este eje es cilíndricamente simétrico, o sea, una tajada de esta salchicha es circular.

Los orbitales de enlace que tienen ese aspecto se denominan enlaces sigma (σ) (orbitales sigma).

Como lo indica el ejemplo un enlace covalente resulta del traslape de dos orbitales atómicos para formar un orbital de enlace, ocupado por un par de electrones. Cada tipo de enlace covalente tiene una longitud y una fuerza característica.

Este tipo de enlace lo encontramos en los compuestos no polares. En las moléculas no polares los átomos se encuentran unidos por enlaces covalentes, o sea por un par de electrones compartidos de modo que cada uno de los átomos aporta un electrón.

II.3.1.b. Enlace iónico.

Cuando los elementos que se unen para formar un par electrónico tiene electronegatividades muy diferentes, el átomo con electronegatividad mayor atrae con más intensidad al par electrónico haciendo que el átomo menos electronegativo pierda prácticamente los electrones de unión y estos pasen íntegramente al átomo electronegativo; se dice entonces que el enlace es iónico. Este enlace es llamado también electrostático o electrovalente. Los compuestos resultantes se llaman electrovalentes y el número de valencia o carga del ión de un elemento es simplemente el número de electrones perdidos o ganados al cambiar de la forma atómica a la iónica. Este tipo de enlace es típico en las sales formadas por combinación de elementos metálicos (elementos electropositivos) del extremo izquierdo del sistema Periódico con los elementos no metálicos (elementos negativos) del extremo derecho. Por ejemplo, de acuerdo con la clasificación cuántica de los elementos, el Na es un metal y el Cl es un no metal, pudiéndose formar entre ellos un enlace de tipo iónico. (ver Fig. II.8)

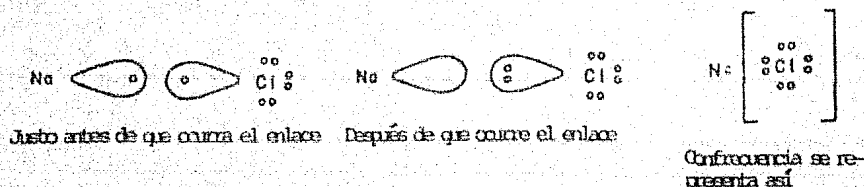


Fig. II.8. Enlace iónico del cloruro de sodio (NaCl)

El par de enlace se forma por transferencia de electrones, el electrón del sodio es atraído fuertemente por el cloro. En el continuo movimiento atómico, el átomo del cloro gana la posesión total del par de electrones recientemente formado, convirtiéndose en una partícula separada con una carga iónica de 1^- . El átomo de sodio habiendo perdido su electrón de la configuración electrónica externa, se convierte en una partícula con carga iónica de 1^+ .

Los enlaces iónicos son muy resistentes a la acción del calor, por lo que, los compuestos que los poseen, tienen generalmente puntos de fusión y ebullición muy altos. En solución acuosa, por ejemplo, los iones de cristal se rodean por moléculas de disolvente, llegando a separarse mostrando una reactividad muy elevada; disueltos o fundidos conducen bien la corriente eléctrica, es decir son electrólitos.

II.3.1.c. Enlace Covalente Polar.

Cuando dos átomos de elementos distintos se unen proporcionando un electrón cada uno y la diferencia de sus electronegatividades no es tan grande como para formar un enlace iónico, se dice que constituyen un enlace covalente polar (parcialmente iónico) es decir, los electrones son compartidos pero no en forma equitativa.

Como consecuencia de esto, en la molécula se constituyen dos polos, uno con carga parcial negativa que permanece en la vecindad del núcleo del elemento más electronegativo, y otro con carga parcial positiva en la zona del elemento menos electronegativo.

Un ejemplo de enlace covalente polar es el de HCl (ácido clorhídrico). El par de electrones lo forma un electrón del hidrógeno y un electrón del cloro. Los dos átomos son diferentes en cuanto al tamaño y el número de electrones en sus capas interiores, pero los electrones de sus capas externas se pueden compartir adquiriendo así la molécula una configuración estable. (Fig. II.9)



Fig. II.9. HCl molécula covalente polar
a) HCl.
b) Nube electrónica del HCl formando un dipolo.
c) Atracción de moléculas polares.
d) Molécula no polar de Cl_2

El cloro tiene mucho más fuerte atracción que la del hidrógeno; es decir, tiene mucha más facilidad para ganar electrones, por lo tanto al formar la molécula, el par de electrones compartido se reparte de manera desigual, formando un compuesto polar covalente. Una parte de la molécula de HCl es débilmente negativa y la otra parte es débilmente positiva (Fig. II.10.)

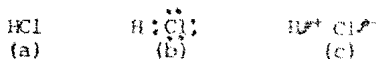
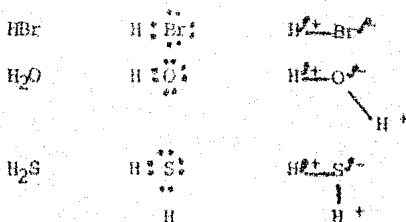


Fig. II.10.

- a) compuesto
- b) electrón compartido
- c) carga parcial

Otro ejemplos de moléculas covalentes polares son los siguientes:



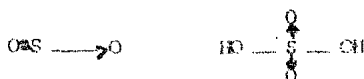
II.3.1.d. Enlace Covalente Coordinado

Este enlace que también se ha designado como enlace doble semipolar, viene a ser un tipo especial de enlace covalente que tiene lugar cuando ambos electrones de enlace son aportados por uno solo de los átomos, produciéndose así un dipolo en la molécula puesto que si un átomo neutro adquiere un par de electrones se encontrará cargado electronegativamente y un átomo que comparte un par de electrones que antes no compartía, queda cargado electropositivamente.

En los anteriores tipos de enlace el par electrónico está constituido por participación igual de los dos átomos de la unión, en el enlace covalente coordinado sólo uno de los átomos proporciona los dos electrones y los comparte con el otro, lo que permite completar su configuración electrónica similar a la de un gas noble. Generalmente el "donador" del par conserva un electrón que no comparte con ningún otro en su capa exterior de valencia. Ejemplos de compuestos que tienen este tipo de unión son el SO₂ y el H₂SO₄ :



Generalmente, el enlace coordinado se señala por medio de una flecha(→) que va del átomo que sede el par de electrones al que los recibe:



II.4.1. ELECTRONEGATIVIDAD (8,17)

Esta se define como la capacidad de un átomo en una molécula para atraer un electrón hacia él. No hay una manera directa de medir esta capacidad, aunque se han sugerido varios métodos indirectos, tal como el propuesto por Mulliken, que definió la electronegatividad de un átomo como el valor medio de su afinidad electrónica y su potencial de ionización (ya que la afinidad electrónica es una medida de la tendencia de un átomo a ganar un electrón y el potencial de ionización indica su tendencia a perder un electrón).

Las electronegatividades se han definido en función de otros varios parámetros que incluyen energías de enlace por Pauling, y en términos de las propiedades de resonancia magnética nuclear en el tratamiento de Allred y Rochow.

En la tabla II.3 se presenta una colección redondeada de estos valores.

Los valores están redondeados al 0.05 más próximo. Se ha tomado como base H = 2.1 para que concuerden con los valores de Pauling

Li	Be											B	C	N	O	F
0.95	1.5											2.0	2.5	3.05	3.5	4.1
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl
1.0	1.25											1.45	1.75	2.05	2.45	2.85
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br
0.9	1.05	1.2	1.3	1.45	1.55	1.6	1.65	1.7	1.75	1.75	1.65	1.8	2.0	2.2	2.5	2.75
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I
0.9	1.0	1.1	1.2	1.25	1.3	1.35	1.4	1.45	1.35	1.4	1.45	1.5	1.7	1.6	2.0	2.2
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At
0.85	0.95	1.1	1.25	1.35	1.4	1.45	1.5	1.55	1.45	1.4	1.45	1.45	1.55	1.65	1.75	1.95
Fr	Ra	Ac														
0.85	0.95	1.0														

Los Lantánidos van de 1.0 a 1.15

Los actínidos van de 1.1 a 1.2

Tabla II.3 Valores de la electronegatividad según Rochow y Allred *

La electronegatividad es valiosa, como un parámetro, del comportamiento químico general de un átomo, ya que dan una orientación sobre la distribución electrónica en un enlace, y permite predecir de una manera aproximada la estabilidad o fuerza de un enlace. Cuanto mayor sea la separación de dos elementos en dicha tabla mayor será la fuerza de enlace entre ellos.

En general, grandes fuerzas de enlace desprenden gran cantidad de energía al formarse el mismo. Las reacciones entre elementos con semejante electronegatividad, generalmente van acompañados de un pequeño desprendimiento o absorción de calor.

* La electronegatividad de los elementos, aumenta según el grupo hacia la derecha y según el periodo hacia arriba.

Los enlaces fuertes se forman entre átomos que difieren mucho en electronegatividad y los débiles entre átomos cuyas electronegatividades difieren poco.

El flúor posee la máxima electronegatividad entre todos los elementos de la Tabla Periódica. Los gases inertes, no forman normalmente enlaces químicos, por eso no se les ha asignado ningún grado de electronegatividad en la clasificación Periódica.

Es importante diferenciar la electronegatividad de enlace y la electronegatividad molecular:

La electronegatividad de enlace es el momento dipolo que se forma cuando hay una mayor densidad electrónica orientada hacia uno de los compuestos en un enlace.

La electronegatividad molecular es igual a la suma vectorial de dipolos de la molécula, y es a partir de ésta que se obtiene el concepto de polaridad de un compuesto tomando en cuenta su constante dieléctrica; entre mayor sea ésta mayor será la polaridad y entre menor sea su constante dieléctrica menor será su polaridad.

II.5.1. CONCEPTO DE MOLECULA POLAR (11,12,17)

La molécula es eléctricamente neutra en su conjunto por tener igual número de partículas positivas y negativas, pero no existe simetría en la distribución de la electricidad.

Aquellas moléculas cuyos centros de carga positiva no coinciden con la carga negativa, se denominan moléculas polares, llamándose polar al enlace en que un par de electrones de la configuración externa no está igualmente compartido por los dos orbitales. De manera que todos los enlaces iónicos, como los enlaces covalentes, pueden formar compuestos polares.

Es interesante observar que no existe una diferencia perfectamente definida entre el enlace iónico y el enlace covalente; el límite va siendo gradual, de tal manera que si ambos átomos tienen la misma capacidad para atraer electrones, el enlace es no polar. Si van sustituyendo los elementos de modo que aumente la capacidad para atraer electrones, las parejas de electrones pasarán cada vez la mayor parte del tiempo más cerca de un elemento que de otro, con lo que el enlace se va volviendo cada vez más polar. Llegando por fin a dejar de estar compartiendo el par electrónico, para formar el anión y el catión, hasta convertirse en enlace iónico. (Fig. II.11)

En las moléculas polares hay interacción debido a las fuerzas atractivas, entre el final positivo de una molécula y el final negativo de otra molécula (Fig.II.12)



Fig. II.11. Enlaces Polares.

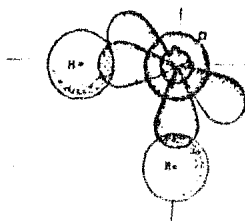


Fig. II.12. Concepto de molécula polar. Recorres u orbitales para la molécula del agua. El traslape de la recorpe u orbital "s" de cada uno de los hidrógenos, con las dos orbitales "p" del oxígeno, seguidos de una repulsión de los protones del oxígeno, hace que su estructura sea positiva cerca del núcleo del hidrógeno y negativa cerca de los electrones desapareados del átomo de oxígeno.

II.5.2. CONCEPTO DE MOLÉCULA DIPOLO (5,8,17)

Henos visto que una molécula es polar si el centro de la carga negativa no coincide con el centro de la carga positiva. Entoces decimos que la molécula constituye un dipolo, es decir dos cargas iguales y opuestas separadas en el espacio. La molécula poseerá un momento dipolo (μ) que es igual a la magnitud de la carga (e) multiplicada por la distancia (d) entre los centros de las cargas. El momento dipolo se mide en Debyes:

$$\mu = e \cdot d = \text{unidades electrostáticas por angströms} = \text{debyes.}$$

Un debye equivale a 10^{-18} unidades electrostáticas (las cargas electrostáticas son del orden de 10^{-10} u.e.e. y las distancias en las moléculas son del orden 10^{-8} cm = 1 Å). Un protón y un electrón separados por 1 Å (10^{-8} cm) tiene un momento dipolo igual a 4.8 debyes.

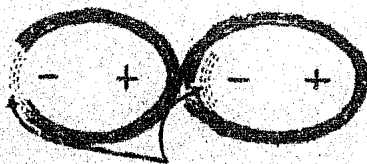


Fig.II.13. Momento dipolo. Átomos o moléculas con centros separados de cargas, dipolos, se atraen en sus cargas opuestas.

Los momentos dipolares son cantidades vectoriales; su dirección en el espacio viene determinada por un símbolo (\rightarrow) para caracterizar un dipolo, en el que la flecha apunta del extremo positivo al negativo (Fig. II.13.)

A continuación se da una tabla en la que figuran los valores del momento dipolo de varias moléculas. (Tabla II.4.)

H ₂	0	HF	1.75
O ₂	0	HCl	1.03
N ₂	0	HBr	0.79
Cl ₂	0	HI	0.30
Br ₂	0	NH ₃	1.46
CH ₄	0	NF ₃	0.24
H ₂ O	1.84	BF ₃	0
C ₂ H ₄	0	CH ₃ Cl	1.86
C ₂ H ₆	0	CCl ₄	0
C ₆ H ₆	0	CO ₂	0
CH ₂ Cl ₂	1.59	CO	0.12

CHCl₃ 1.15

Tabla II.4. Momentos dipolos (en debyes)

El metano (CH₄) (Fig. II.14) tiene un momento igual a cero, porque los centros de gravedad del núcleo y de los electrones coinciden o bien, desde otro punto de vista, porque los cuatro momentos existentes (C - H) son iguales y opuestos; el cloruro de metilo (CH₃Cl) (Fig. II.15) tiene un momento eléctrico de 1.86 que es la resultante de los momentos C - H y C - Cl. La introducción de más átomos de Cl en la molécula causa un descenso en el momento (en el CH₂Cl₂ es de 1.59 y en el CHCl₃ es de 1.15) hasta alcanzar el momento dipolo cero en el tetracloruro de carbono (CCl₄) simétrico. (Fig. II.16)

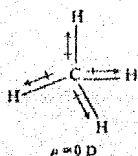


Fig. II.14 Metano

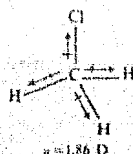


Fig. II.15 Cloruro de carbono

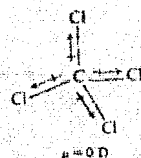
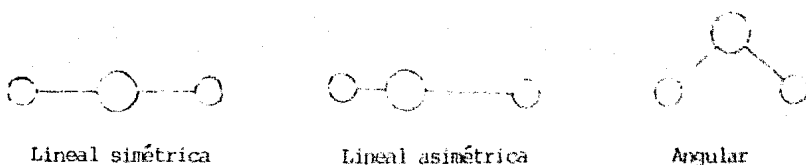


Fig. II.16 Tetracloruro de carbono.

Se comprende que puesto que el momento dipolo es cero para todas las moléculas cuyo centro de gravedad de las cargas positivas y negativas coinciden, la presencia o la ausencia de un momento dipolo proporciona una indicación de gran valor, para averiguar la constitución de un compuesto. Por ejemplo, el anhídrido carbónico (CO₂) y el agua (H₂O) pueden poseer estructuras correspondientes a una molécula lineal simétrica, molécula lineal asimétrica o angular. (Fig. II.17).



En la tabla de los momentos dipolares vemos que el CO_2 es cero por lo que la molécula debe ser simétrica y lineal, pues si fuera asimétrica o angular, las cargas eléctricas se encontrarían en desequilibrio. El agua posee un momento dipolo pronunciado de 1.84 debye, por lo cual no puede tener una estructura simétrica lineal; la medición de los espectros de banda demuestra que la molécula de agua es angular más bien que lineal asimétrica.

Cada uno de los enlaces OH del agua son polares, mientras que el enlace del oxígeno, que es más electronegativo que el H, es covalente. Por tanto cada enlace contribuye de diversa manera a establecer el momento dipolo de la molécula como si fuera uno solo o continuo. Puesto que las cargas y las distancias entre uno y otro enlace no son equidistantes, la molécula del agua forma un ángulo de 105° y se le asigna esta forma: (Fig. II.18)



Fig. II.18. Molécula de agua. Enlace polar. Momento dipolo. La molécula es tridimensional y tiene forma bien definida.

Este modelo indica que el centro de la carga positiva está localizado entre los dos átomos de hidrógeno, mientras que el centro de la carga negativa está en el átomo de oxígeno. El momento dipolo de la molécula es la resultante del momento de enlace entre los dos átomos. (Fig. II.19)

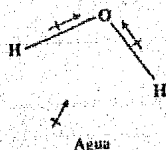


Fig. II.19. Momentos dipolares esperados, sólo con base en momentos de enlaces

El momento dipolo se puede definir como el producto de una de las cargas y la distancia entre ellas. Moléculas como las de HCl y H₂O que tienen momentos dipolo, se dice que tienen enlaces covalentes polares. Las moléculas que exclusivamente tienen enlaces covalentes como los de H₂, O₂, N₂ no tienen momentos dipolos.

II.5.3. FUERZAS INTERMOLECULARES (10,11,13)

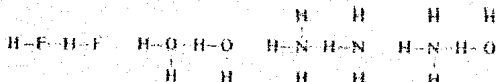
Hay dos clases de fuerzas intermoleculares: interacciones dipolo-dipolo y fuerzas de Van der Waals.

La interacción dipolo-dipolo es la atracción que ejerce el extremo positivo de una molécula polar por el negativo de otra semejante.

Como resultado de esta interacción dipolar, las moléculas polares generalmente se unen entre sí más firmemente que las no polares de peso molecular comparable; esta diferencia entre la intensidad de las fuerzas intermoleculares se refleja en las propiedades físicas de los compuestos comprendidos. (Fig. II. 20)



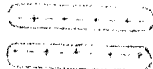
Un tipo de atracción dipolar particularmente fuerte, es el puente hidrógeno, en el cual un átomo de hidrógeno hace de puente entre dos átomos electronegativos, sujetando a uno con un enlace covalente y al otro con fuerzas puramente electrostáticas. Cuando el hidrógeno se encuentra unido a un átomo muy electronegativo, la nube electrónica se distorsiona notablemente hacia éste, exponiendo el núcleo del hidrógeno. La carga + considerable del hidrógeno, sólo débilmente aislada, es atraída por la negativa del átomo electronegativo de una segunda molécula. Esta atracción tiene la fuerza de unos 5 Kcal/mol, por lo que es mucho más débil que el enlace covalente de unos 50 - 100 Kcal/mol que lo mantiene unido al primer átomo electronegativo. En las fórmulas, los enlaces por puentes de hidrógeno se indican generalmente por un línea punteada. (Fig. II.21)



Para que un puente de hidrógeno sea importante, ambos átomos electronegativos deben ser del grupo F, O, N. Sólo es suficientemente positivo un hidrógeno unido a uno de estos elementos y solamente estos tres son suficientemente negativos para que exista la atracción necesaria. El puente de hidrógeno juega un papel muy importante en la fijación de las formas de moléculas grandes, tales como las proteínas y ácidos nucleicos, formas que a su vez, determinan de modo muy directo sus propiedades biológicas: La forma espiral de las moléculas de de alfa queratina y colágeno, que confiere resistencia a la lana y al pelo, y da tenacidad a los tendones y a la piel. El puente de hidrógeno es responsable de que la espiral de DNA sea doble, lo que permite la autoduplicación de moléculas que es la base de la herencia.

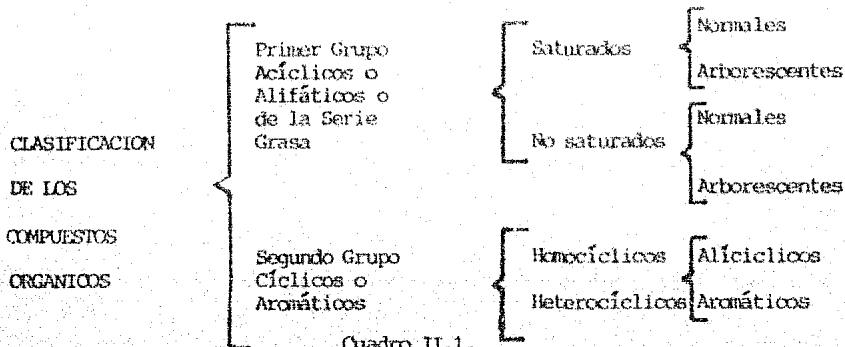
Deben existir fuerzas entre las moléculas de un compuesto no polar, puesto que aún estas sustancias pueden solidificar. Tales atracciones se conocen como fuerzas de Van der Waals, su existencia está justificada por la mecánica de

metano, por medio de carga en torno a una molécula de metano, por ejemplo, es simétrica, de modo que no hay un momento dipolar neto. Sin embargo, los electrones se desplazan de modo que, en un instante de tiempo, esa distribución probablemente se distorsiona, por lo que existirá un pequeño dipolo momentáneo, el cual afectará la distribución electrónica en otra molécula cercana de metano; el extremo negativo del dipolo tiende a repeler electrones y el positivo a atraerlos; es decir induce un dipolo de orientación opuesta en la molécula vecina:



A pesar que los dipolos momentáneos e inducidos cambian constantemente, resulta una atracción neta entre ambas moléculas: estas fuerzas de Van der Waals son de muy corto alcance: sólo actúan entre las partes de moléculas diferentes que están en contacto íntimo, es decir, entre sus superficies. La relación entre la magnitud de las fuerzas de Van der Waals y el área de superficies moleculares ayuda a comprender el efecto del tamaño y la formas moleculares sobre las propiedades físicas. No debemos subestimar la importancia de los más débiles de las fuerzas intermoleculares; actuando entre las cadenas no polares de los fosfolípidos, por ejemplo, constituyen el "mortero" de las paredes de las células vivas.

II.6.1 CLASIFICACION DE LOS COMPUESTOS ORGANICOS. (8)



Cuadro II.1.

Los compuestos orgánicos, atendiendo a su constitución se clasifican en dos grandes grupos: 1. Compuestos acíclicos o alifáticos o de la serie de grasa formados por esqueletos de cadena abierta saturados o esqueletos de cadena abierta no saturados. 2. Compuestos cíclicos que a su vez se dividen en homocíclicos y heterocíclicos. Los homocíclicos se subdividen en: alicíclicos y aromáticos. Los alicíclicos están formados por esqueletos de cadena cerrada homogénea saturada y de cadena homogénea no saturada. Los aromáticos contienen esqueletos de cadena cerrada homogénea no saturada y los heterocíclicos contienen esqueletos de cadena cerrada heterogénea saturada (Cuadro II.1.)

II.6.2 HOMOLOGIA (8,14)

Se llama homología a una serie de compuestos de estructura semejante que pueden representarse por una fórmula general. La serie de compuestos en la cual varios miembros tienen similar estructura, pero difieren unos de otros en el número de grupos metileno (CH_2), se les llama series homológicas. El primer grupo de series homológicas que vamos a considerar es el de los hidrocarburos saturados. Cada miembro de cada serie es un homólogo.

Los hidrocarburos son compuestos orgánicos que contienen solamente carbono e hidrógeno, atendiendo a su estructura éstos se clasifican en alifáticos o acíclicos y en cíclicos o aromáticos. Estas dos grandes divisiones se subdividen a su vez en cuatro clases.

II.6.3. ALCANOS O PARAFINAS (4,10)

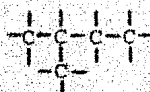
Son hidrocarburos alifáticos que tienen el máximo número de átomos de hidrógeno unidos mediante enlaces covalentes simples. Se dice por tanto que los alcanos son compuestos saturados. Estos pueden tener los carbonos en cadenas lineales o en cadenas ramificadas y en estructuras cerradas.

El metano es el más simple hidrocarburo saturado. Los hidrocarburos saturados pueden contener 1,2,3, etc. átomos de carbono unidos entre sí por enlaces simple. Los hidrocarburos saturados parafinas o alcanos tienen la fórmula general: $\text{C}_n\text{H}_{2n+2}$ donde n representa el número de átomos de carbono y donde $2n+2$ representa el número de átomos de hidrógeno de la fórmula.

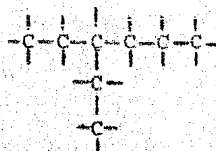
II.6.3.a. Nomenclatura

Los nombres de los primeros cuatro miembros de esta serie homóloga, tienen nombres triviales que tienen en común el sufijo "ano", estos son: metano, etano, propano y butano. Los hidrocarburos con cinco o más átomos de carbono tienen nombres formados con un prefijo latino o griego que indica el número de átomos de carbono y el sufijo "ano" que indica que son miembros de la serie homóloga de las parafinas o hidrocarburos saturados. Cuando se emplea la nomenclatura aprobada por la Unión Internacional de Química se aplican las siguientes reglas:

1. Se selecciona primero la cadena más larga del compuesto y ésta es la parte básica del compuesto: (Fig. II.22)



Derivado del butano



Derivado del hexano

Fig. II.21.

2. Se numera la cadena, empezando por el extremo más próximo a una ramificación o arborescencia, pudiendo localizar así la posición de los radicales hidrocarbonados, de acuerdo con el átomo de carbono al que están unidos logrando al mismo tiempo que las arborescencias tengan los números más bajos posibles: (Fig. II.22.)

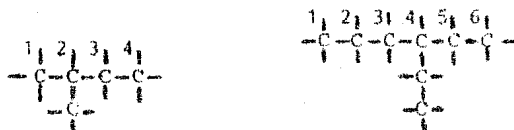


Fig. II.22.

3. Se enuncian las arborescencias por orden de complicación indicando el número del carbono al cual van insertadas. Los grupos de hidrocarburos que aparecen como ramificaciones son derivado de los alcanos; se conocen como grupos o radicales alquilo y se nombran con el sufijo il. (Fig. II.23)

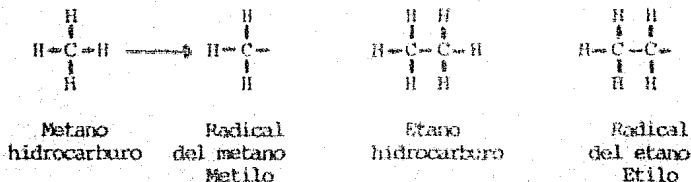


Fig. II.23

El radical etano en el hexano se nombraría así: (Fig. II.24)

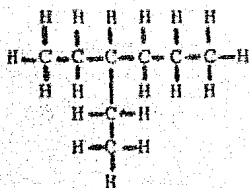


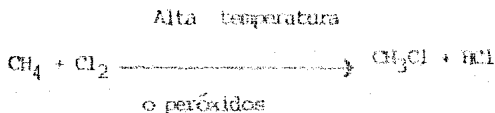
Fig. II.24. Etil 3-hexano

4. Por último, se numera el nombre del hidrocarburo que corresponde a la cadena principal. En los ejemplos anteriores el butano y el hexano son el nombre de los hidrocarburos que forman la cadena más larga.

Puesto que los alcanos son compuestos no polares, no son solubles en agua. Por ejemplo: el petróleo no se disuelve en agua. Los hidrocarburos como casi todos los compuestos orgánicos son disolventes no polares.

Es importante mencionar que los alcanos también están presentes en los sistemas biológicos, por ejemplo: las cadenas lineales (parte no polar) de lípidos (ácidos grasos) que constituyen las membranas celulares.

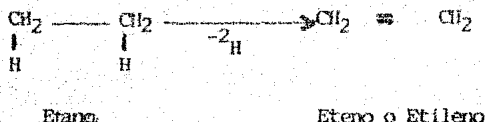
Los hidrocarburos son inertes a la mayoría de los reactivos, a la temperatura ambiente, por esta razón se les llamó parafinas que quiere decir poca afinidad. No son atacadas por bases fuertes, ácidos fuertes, agentes oxidantes, ni por agentes reductores. Los hidrocarburos saturados están unidos por enlaces simples entre dos átomos. En presencia de la luz, de peróxidos orgánicos o calentados a altas temperaturas, los hidrocarburos reaccionan dando derivados halogenados y un haluro de hidrógeno:



II.6.4. ALQUENOS (17)

Los alquenos son hidrocarburos alifáticos que contienen uno o más dobles enlaces carbono-carbono. El etileno obtenido a partir de los alcanos por deshidrogenación y por cracking, constituyen el primer miembro de una serie homóloga de compuestos llamados alquenos. Uno de los orbitales carbono-carbono del etileno, está formado por la superposición de los orbitales sp^2 y un carbono está unido a una orbital sp^2 con el segundo carbono y cada uno de los cuatro enlaces del hidrógeno, se forma por la superposición de orbitales sp^2 con la orbital s del hidrógeno.

Diferenciándose de los alcanos por tener dos átomos de hidrógeno menos en carbonos vecinos, por ejemplo: Si al etano se le eliminan dos hidrógenos obtenemos el eteno o etileno:



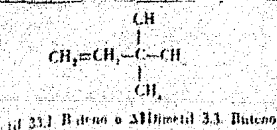
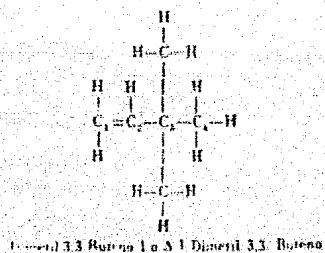
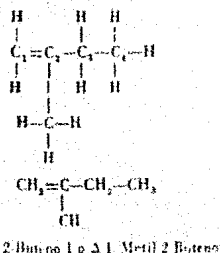
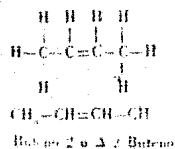
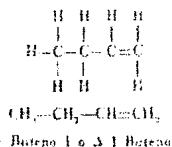
La fórmula general para esta serie homóloga en la que cada elemento tiene un doble enlace por moléculas es: C_nH_{2n} .

Cuando la serie tiene dobles enlaces por molécula, la fórmula será: C_nH_{2n-2} . Esta serie se llama de los alquenos o simplemente dienos.

II.6.4.a. Nomenclatura,

1. Se forma la cadena más larga que contenga el doble enlace carbono-carbono.
2. Se numera dicha cadena, comenzando por el extremo más próximo al doble enlace.

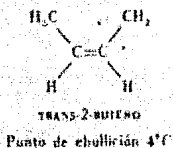
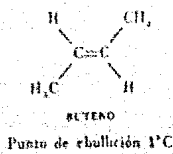
- Se enuncian los radicales por orden de complicación, indicando con un número la posición del doble enlace y al mismo tiempo el lugar que ocupa en la cadena.
- Se enuncia el nombre de la olefina, cambiando la terminación "ano" de los alcanos, por "eno". For ejemplo:



Los alquenos tienen isomería estructural (Ver apéndice No. A 3) de la misma manera que los alcanos, debido a que difieren en posición los radicales y también la isomería de posición del doble enlace.

Además tienen otro tipo de isomería llamada geométrica estos isómeros tienen propiedades diferentes como resultado de la diferente orientación espacial de sus átomos. Por ejemplo: el 2-butano.

ISOMEROS GEOMETRICOS



El doble enlace entre los átomos de carbono, impide que esos átomos puedan girar alrededor de otro. Así la molécula polar del butano que se representa puede y experimentalmente tiene los dos isómeros estructurales que se muestra. Esta isomería pone de manifiesto, como la estructura molecular determina y explica el comportamiento molecular.

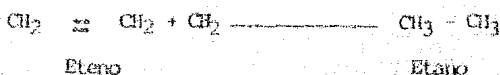
II.6.4.b. Propiedades Generales

El eteno, propeno y buteno son gases a la temperatura ordinaria; los compuestos por 5 átomos de carbono hasta el de 16 carbonos son líquidos, y desde 17 carbonos en adelante son sólidos, fusibles y volátiles sin descomposición.

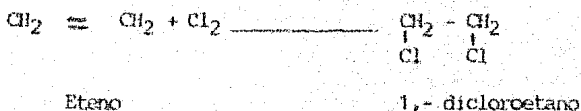
Los puntos de fusión y ebullición, así como la densidad aumentan proporcionalmente a la masa molecular. Son poco solubles en alcohol.

El doble enlace de un alqueno, hace que la molécula sea mucho más reactiva que la de los correspondientes alcanos, y son capaces de dar reacciones de adición debido a que se rompe el doble enlace, introduciendo otros átomos. Por ejemplo: Cuando se adiciona hidrógeno el proceso se llama hidrogenación:

1. Hidrogenación



2. Adición de Halógenos



3. Adición de ácidos halogenhídricos



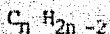
Otra propiedad importante de estas moléculas no saturadas es la polimerización. Esta es una reacción de autoadición en la cual una molécula pequeña se une a otra más formando una molécula grande. Las moléculas pequeñas unidas e iguales se les llama monómeros.

Por ejemplo: El etileno se polimeriza formando polietileno substancia muy usada en muchos procesos industriales.

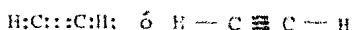
En los sistemas biológicos los alquenos están presentes en la cadena lateral de la vitamina A que contiene múltiples dobles ligaduras conjugadas o en cadenas de ácidos grasos no saturados, por ejemplo: ácidos grasos esenciales como el linoléico y el linolénico.

II.6.5. ALQUINOS (17)

Los alquinos son otra serie de hidrocarburos, que contienen un triple enlace entre carbono-carbono. Como los alquinos contiene dos hidrógenos menos que los alquenos, con el mismo número de átomos de carbono, su fórmula general será:



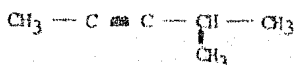
El primero y más importante de esta serie es el acetileno C_2H_2 . La fórmula del acetileno es:



Los tres pares de electrones entre carbono y carbono forman el enlace triple éste se indica con el sufijo "ino".

II.6.5.a. Nomenclatura

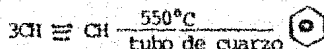
Se numera la cadena más larga que pueda contener los enlaces triples. Los radicales se enuncian por orden de complicación, indicando el número que les corresponde en la cadena más larga y a continuación se dice el nombre del hidrocarburo. Si hay más de un triple enlace, se agrega un sufijo que indique cuantos enlaces hay. Los alquinos más sencillos se nombran como derivados del acetileno. Por ejemplo:



Metil 4-pentino 2

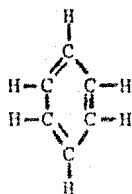
Presentan fenómenos de isomería estructural y también de posición debido al triple enlace.

Los tres primeros hidrocarburos acetilénicos son gases, los intermedios son líquidos y los de elevada masa molecular son sólidos. Los alquinos forman reacciones de adición en el triple enlace; de oxidación, de sustitución, de polimerización, etc. El acetileno puede polimerizarse formando benceno, un hidrocarburo cíclico no saturado.



II.6.6. COMPUESTOS AROMÁTICOS. BENCENO (12)

El benceno y todos los compuestos de tipo hidrocarburo parecidos al benceno en su comportamiento químico, son derivados del benceno y se conocen como hidrocarburos aromáticos. El benceno es el compuesto más sencillo, cíclico, con seis átomos de carbono formando un anillo y cuya fórmula es C_6H_6 . Kekulé fue el primero que expuso la existencia de tres dobles ligaduras conjugadas. Una de las teorías más modernas considera que todos los ángulos entre los enlaces son de 120° entre carbono-carbono (los de estructura tetraédrica son de 109°) formando un hexágono regular, con los átomos distribuidos en la forma siguiente:



La fórmula estructural más moderna usada para el benceno y otros hidrocarburos aromáticos es la siguiente :

Fórmula
estructural



Moderna
para el benceno

Partiendo de este modelo resulta evidente la igualdad de longitudes de enlace y la igualdad de sus ángulos. El círculo interior sugiere la insaturación de todos los enlaces carbono-carbono como intermedios entre enlaces dobles y sencillos.

Las series aromáticas pueden combinarse por ejemplo; puede unirse dos anillos de sus seis carbonos; por ejemplo el benceno al unirse con otro anillo bencénico forma el naftaleno ($C_{10}H_8$) este tiene dos anillos de benceno, tiene una orbital deslocalizada que circunda los diez carbonos, tiene propiedades aromáticas. Es posible obtener dos isómeros monosustituídos, y por esto se tiene que usar una nomenclatura, llamándose los isómeros (α) y (β). Para designar los derivados se numera el núcleo como se observa en la fig. II.25.

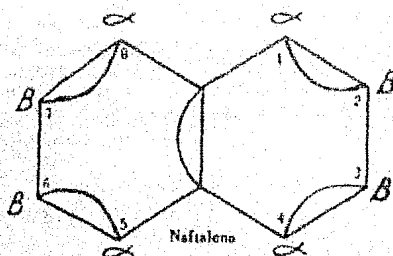


Fig. II.25.

Los derivados de uno de los cuatro carbonos se llaman α -isómeros y los otros β -isómeros.

Los hidrocarburos aromáticos se nombran de varias formas. Los compuestos más simples en cualquiera de los casos tiene nombres ordinarios que sirven de base para nombrar las substancias derivadas. Para indicar las posiciones relativas de dos sustituyentes en un anillo bencénico se usan frecuentemente los terminos:

orto, meta y para como se ve en los nombres de los tres xilenos siguientes: (Fig. II.25)

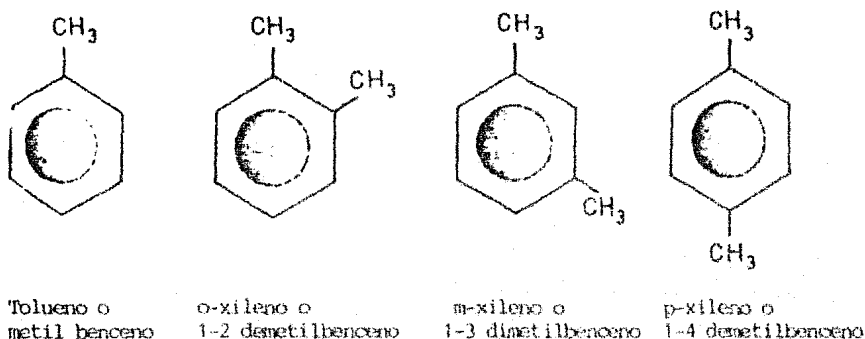


Fig. II.25.

La posición relativa de los sustituyentes se indica mediante números. Los anillos del naftaleno tienen dos posiciones únicas designadas por (α) y (β) y sirven para indicar el lugar que ocupan los sustituyentes en los naftalenos monosustituídos. Cuando los anillos bencénicos o de naftaleno, se unen con cadenas alifáticas se coloca delante del nombre correspondiente a éste compuesto. También pueden sustituirse los hidrógenos por radicales como los siguientes: Cl, Br, I, OH, NH₂, etc.

Todos los hidrocarburos aromáticos son líquidos o sólidos a la temperatura ambiente. Su punto de ebullición es más o menos el mismo que sus correspondientes cicloalcanos. Sus moléculas son ligeramente polares o no polares. Algunos compuestos no son solubles en los alcanos, pero sí se disuelven en los hidrocarburos aromáticos. Los hidrocarburos aromáticos pueden reaccionar con los halógenos formando derivados halogenados, y el proceso de llama "halogenación", pueden sufrir también la nitración, sulfonación, alquilación acilación, etc., formando infinidad de compuestos al efectuarse estas sustituciones. Por ejemplo: La estructura del fenantreno son la base del colesterol y hormonas esteroidales. (Fig. II.26)

II.7.1. GRUPOS FUNCIONALES (12,13,14)

El átomo o grupos de átomos que define la estructura de una familia específica de compuestos orgánicos y que, al mismo tiempo, define sus propiedades se llama grupo funcional.

A continuación se enuncian los principales grupos funcionales de utilidad en Bioquímica.

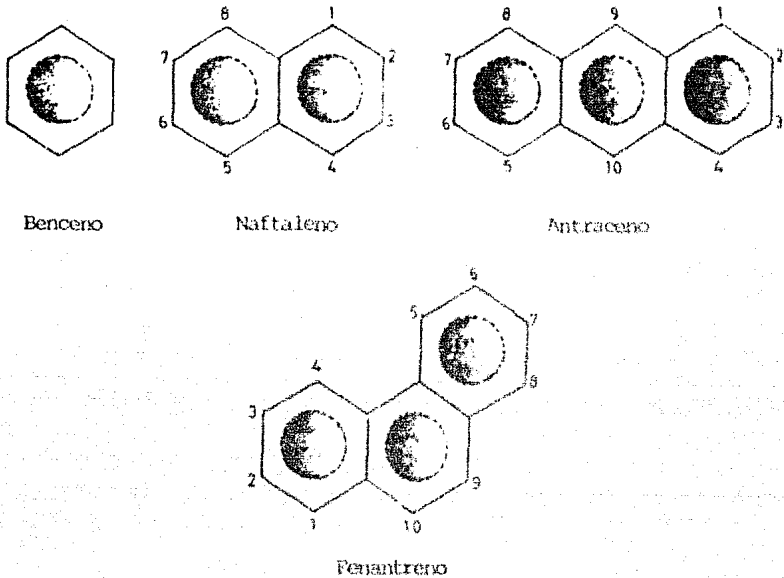
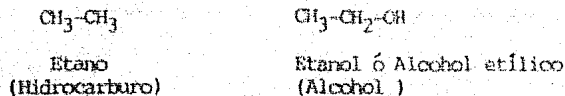


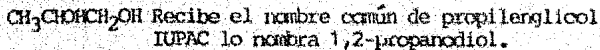
Fig.II.26. Sistemas de anillos aromáticos simples de hidrocarburos aromáticos

II.7.1.a. Alcoholes.

Si a un hidrocarburo se le sustituye un hidrógeno por un grupo OH (hidroxilo), se tiene un alcohol; que se nombra con el mismo nombre del hidrocarburo, cambiando la terminación en "ol", v.g.



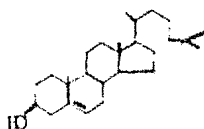
Los compuestos con dos grupos -OH reciben el nombre común de glicoles; en el sistema IUPAC son dioles, v.g.



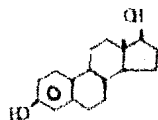
Se dice que se tiene alcohol absoluto cuando nos referimos al etanol al 100% (normalmente el de uso ordinario es alcohol de 96%) y si la etiqueta dice desnaturalizado, se refiere a que se le ha agregado un contaminante para evitar que sea bebido, dicho contaminante es difícil de eliminar (v.g. metanol).

El grupo funcional hidroxilo, característico de los alcoholes, es muy común en la naturaleza; llegando a existir compuestos de fórmulas complejas como los esteroides, que pertenecen a la clasificación de lípidos y pueden ser clasificados

como alcoholes:



a) Colesterol

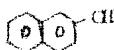


b) Estradiol (hormona femenina)

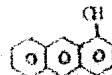
Los alcoholes del benceno y sus derivados, se llaman fenoles; los del naftaleno y sus derivados, naftoles y los antraceno y sus derivados, antranoles, v.g.



p-metil fenol



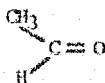
β-naftol



α-antranol

II.7.b Aldehidos y Cetonas.

Un aldehido se caracteriza por tener un grupo alquilo o arilo y un átomo de hidrógeno unido al grupo carbonilo $C=O$



Aldehido Alifático

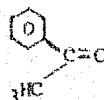


Aldehido Aromático

Una cetona se caracteriza por tener dos grupos alquilo o arilo unidos al grupo carbonilo. Los grupos no tienen que ser necesariamente iguales.

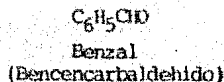
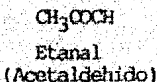


Cetona Alifática

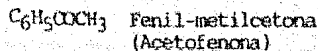
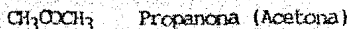


Cetona Alifática aromática

En el sistema usado por IUPAC para nombrar a los aldehidos, la terminación "ol" usada para los alcoholes se cambia por "al".



El nombre utilizado por la IUPAC para las cetonas, comienza con el alcano principal como raíz y añadiendo el sufijo "ona".



El estudio de aldehidos y cetonas es de importancia para la comprensión de la estructura y química de los carbohidratos, en algunas hormonas esteroidales que regulan el desarrollo y funciones sexuales. También son importantes por sus olores fragantes agradables v.g. cinamaldehido (olor de la canela), citral (limón), vainillina, etc.

II.7.1.c. Ácidos carboxílicos

El grupo funcional de los ácidos carboxílicos es el grupo carboxilo, que se representa como:



Se le dió este nombre debido a que puede considerarse una combinación de un carbonilo >C=O y un grupo hidroxilo $-\text{OH}$.

Muchos ácidos carboxílicos tienen nombres comunes que se utilizan con frecuencia y por lo tanto es necesario aprenderlos. Aquellos con un número par de carbonos que fluctúa entre 4 y 22 pueden obtenerse por hidrólisis de grasas y aceites vegetales y animales, y se les conoce como ácidos grasos, teniendo nombres comunes según la fuente de que se derivan, v.g. El ácido fórmico se origina de la palabra latina hormiga, debido a que es un ingrediente tóxico de la secreción que inyectan las hormigas al picar. El ácido butanoico (ácido butírico) deriva su nombre de la mantequilla, en la cual se encuentra cuando se hace rancia. Los ácidos caproico, caprílico y capríco provienen del olor del ganado caprino, y sus nombres se derivan de la palabra latina caper = cabra.

Los nombres IUPAC se forman añadiendo la terminación "oico" al alcano principal del que derivan, precedido de la palabra ácido, v.g.



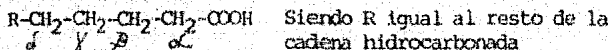
Ácido Etanoico
(Ácido Acético)

Ácido Fenil-metanoico
(Ácido Benzoico)

Este ácido presenta dos grupos carboxilos, es el Ácido Butanol-dioico (málico.)

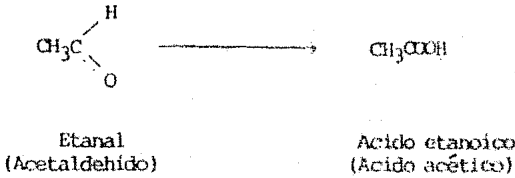
Cuando un compuesto ácido posee además otras funciones cuya composición debe indicarse, se acostumbra a usar en lugar de numeración de carbonos, las letras griegas, usando el siguiente convenio:

El carbono que está unido al que soporta la función ácido, se denomina carbono α (alfa), el que sigue β (beta), el siguiente γ (gamma), etc.

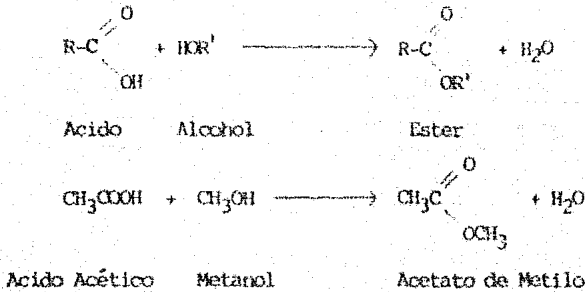


Ácido α -propanoico
(Ácido láctico)

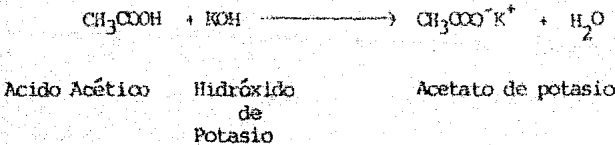
Al oxidar un aldehído se podrá obtener un ácido orgánico:



La reacción de un ácido carboxílico con un alcohol, da como producto un éster (derivado de ácido carboxílico).

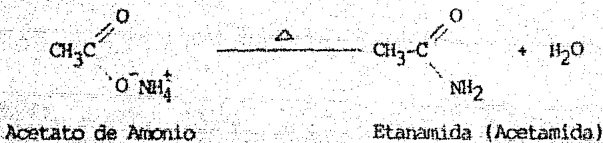


La reacción de un ácido carboxílico con una base fuerte produce una sal de ácido carboxílico, v.g.

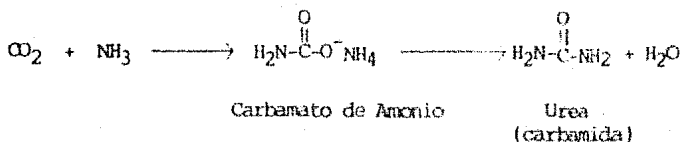


Las sales sódicas de los ácidos grasos de cadena larga son jabones. (Proceso de saponificación).

Cuando se lleva a cabo un calentamiento fuerte de la sal de amonio de un ácido carboxílico, se elimina agua y se produce una amida, v.g.



Esta reacción también se usa en la industria para la síntesis de la urea $\text{NH}_2\text{-CO-NH}_2$, la cual puede considerarse como la amida del ácido carbónico.

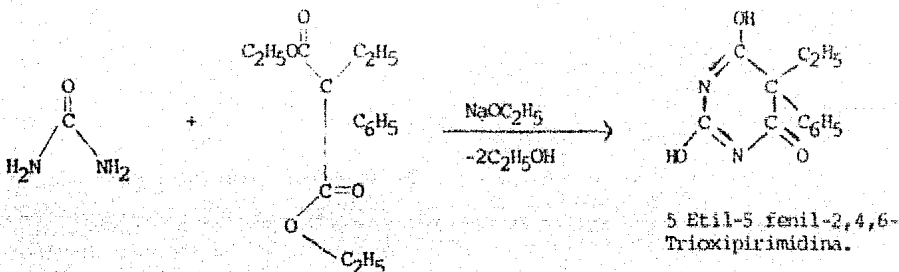


La urea es el principal producto nitrogenado de desecho en la orina de animales urotélicos. Se utiliza como fertilizante, complemento proteico para el ganado y como intermediario químico.

Cuando en una molécula se repite n veces la función amida, se le llama poli-amida, v.g. la amida del ácido adipico unida repetidas veces da lo conocido como nylon, que posee una estructura parecida a la de la seda. La seda es una proteína y las proteínas son poliamidas naturales.

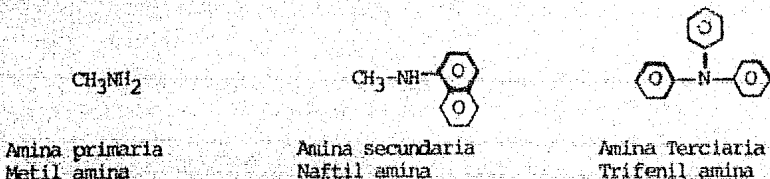
Si uno de los átomos de hidrógeno del grupo $-\text{NH}_2$ de una amida se substituye por la cadena que contiene el grupo amida resulta una amida cíclica (lactama) v.g.

Los barbitúridos son amidas cíclicas que se obtienen por la reacción entre la urea y diferentes ésteres. Urea + etilfenilmalonato de dietilo \longrightarrow Feno barbital (somníferos)

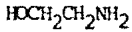


II.7.1.d. Aminas

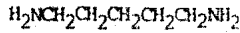
La estructura de una molécula de una amina se parece a la del amoníaco, pero con uno, dos o tres átomos de hidrógeno substituidos por grupos alquílicos o arílicos; dándoles la clasificación de primarias, secundarias o terciarias de acuerdo al número de átomos de hidrógeno substituidos.



Para nombrarlas basta mencionar el grupo alquílico o arílico unidos al átomo de nitrógeno y añadir la palabra amina. En el sistema de la IUPAC, al grupo amino ($-\text{NH}_2$) puede tratarse como substituyente y denominarlo como grupo amino de la estructura principal, v.g.



2-aminoetanol
(etanolamina)



1,5-diaminopentano
(cadaverina)

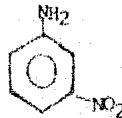


α -aminoácido

A las arilaminas se les nombra como derivados del miembro principal de la familia, la anilina:

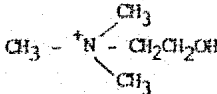


Anilina

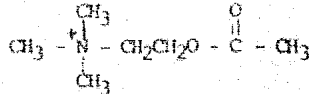


3-nitroanilina
(m-nitroanilina)

También existen compuestos importantes en Bioquímica, que contienen nitrógeno pero en la forma de amonio cuaternario, v.g.



Colina

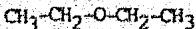


Acetilcolina

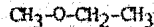
La colina es una porción molecular de un grupo de fosfolípidos que se conocen como lecitinas, las cuales son importantes en la construcción de membranas celulares. La acetilcolina es una substancia transmisora en ciertas neuronas motrices que inician la contracción de los músculos voluntarios.

II.7.1.e. Eter.

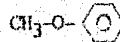
Los éteres pueden considerarse como derivados de los hidrocarburos, obtenidos al reemplazar un grupo $-\text{CH}_2-$ por $-\text{O}-$, v.g.



dietil-éter
(éter etílico)



metil, etil-éter



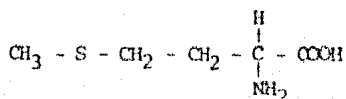
metil, fenil-éter

La palabra éter se usa como nombre de la clase del compuesto, el prefijo "di" usado para nombrar éteres simétricos (con dos radicales iguales) es opcional.

La mayoría de los éteres son muy inertes (poca reactividad) y muy volátiles (se evaporan fácilmente). El disolvente éter de petróleo (bencina de petróleo) no pertenece en realidad a este grupo, únicamente se le ha dado el nombre de éter por su alta volatilidad.

II.7.1.f. Tioéter

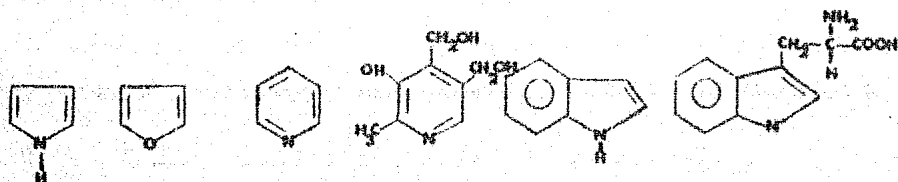
Son aquellos compuestos que en vez de presentar el grupo funcional -O-, tienen -S-, v.g.



Metionina (α -aminoácido)

II.7.1.g. Compuestos Heterocíclicos

Son aquellos compuestos que poseen uno o más ciclos de carbono con la presencia de un átomo diferente del carbono (oxígeno, nitrógeno, azufre) dentro de un ciclo. Son comunes de encontrarlos tanto en vegetales y animales, v.g. El pirrol forma parte de estructuras como los grupos hemo, presentes en moléculas como la hemoglobina, hemocianina, clorofilas, citocromos. El furano, que se extrae del olote del maíz y se usa como disolvente. La piridina, que es el esqueleto básico del piridoxal (vitamina B₆) que interviene en el cambio de α -aminoácidos en α -cetoácidos (transaminaciones). El indol que forma parte de la estructura del triptofano (α -aminoácido), del ácido indolacético (fitohormona) o de numerosos alcaloides como la dietilamida del ácido lisérgico (LSD). La purina y la pirimidina, que son las moléculas bases que conforman las llamadas bases nitrogenadas, partes esenciales de la estructura de los nucleótidos que están presentes en la DNA y RNA.



Pirrol

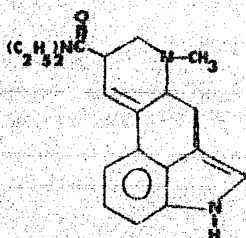
Furano

Piridina

Vit. B₆

Indol

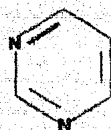
Triptofano



LSD



Purina



Pirimidina

BIBLIOGRAFIA

1. Andrews, D.H., Kokes, R.J.: Química Fundamental 2a. ed. Ed. Limusa-Wiley México, 1964.
2. Burgoyne, E.E.: Principios de Química Orgánica. 1a. ed. Ed. El Manual Moderno S.A. de C.V. México, 1979.
3. Cartmell E., Fowels, G.: Valency and Molecular Structure. 3a. ed. Ed. Butterworths, London, 1966.
4. Cotton, F.A. Wilkinson, G.: Advanced Inorganic Chemistry, 2a. ed. Ed. Interscience Publishers, London, 1966.
5. Devore, G., Muñoz Mesa, E.: Química Orgánica, Ed. Publicaciones Cultural, S.A., México, 1969.
6. Eichinger, Jr. J.W.: Enlaces Químicos, Introducción y Fundamentos. Ed. Publicaciones Cultural, S.A., México 1968.
7. Gray, H.B.: Electrones y Enlaces Químicos, 3a. ed. Ed. Reverté, México, 1970.
8. Lenz del Río Alberto.: Química Orgánica Elemental. 3a. ed. Ed. Patria, S.A. México, 1969.
9. Mackay, K.M. Mackay R.A.: Introduction to Modern Inorganic Chemistry. 1a. ed. Ed. Intertext Books, London, 1968.
10. Mateos González, J.L.: Química Orgánica, UNAM, México, 1970.
11. Noller, C.R.: Química Orgánica. 2a. ed. Ed. Interamericana, México, 1968.
12. Pasto, J.D., Johnson, C.: Organic Chemistry. 1a. ed. Ed. Prentice-Hall Drc., New Jersey, 1979.
13. Pauling Linus: Química General. 9a. ed. Ed. Aguilar, España, 1971.
14. Powell, V.P.: Nociones de Química Serie Programada 5 volúmenes, Limusa-Wiley México, 1970.
15. Pudephatt, R.J.: Tabla Periódica de Iso Elementos. 1a. ed. Ed. El Manual Moderno, S.A., México, 1977.
16. Spice, J.E.: Enlace Química y Estructura. 1a. ed. Ed. Alhambra, México 1967.
17. Thornton, Morrison, R., Neilson Boyd R.: Química Orgánica. 3a. ed. Ed. Fondo Educativo Interamericano, S.A. de C.V., Estados Unidos, 1976.

TERCERA UNIDAD.

QUIMICA DE SOLUCIONES ACUOSAS.

1. AGUA
2. pH
3. SOLUCIONES

OBJETIVOS

Al finalizar esta unidad usted será capaz de:

1. Resaltar la importancia del agua en la naturaleza y relacionar las propiedades fisicoquímicas del agua con las propiedades biológicas que la misma confiere al organismo.
2. Conocer la composición y estructura de la molécula del agua.
3. Conocer el comportamiento del agua como disolvente; como electrólito, como ácido y base.
4. Definir que es la constante de ionización del agua.
5. Definir pH y aprender a calcularlo matemáticamente en una solución dada.
6. Definir pOH y aprender a calcularlo matemáticamente..
7. Conocer y definir qué es el pK.
8. Relacionar los conceptos de pH y pK.
9. Conocer la ecuación de Henderson-Basselbach y aprender a calcularla.
10. Definir que son los indicadores y su importancia en la determinación de pH de una solución ácida o básica.
11. Definir que es una solución y conocer los tipos de soluciones más utilizadas en el laboratorio de bioquímica.
12. Aprender a realizar los cálculos matemáticos necesarios de cualquier tipo de solución que necesite preparar en el laboratorio.

III.1.1. AGUA

El agua es una de las sustancias químicas más importantes y uno de los principales constituyentes de la materia viva y del medio en que vivimos. Sus propiedades físicas son notablemente diferentes de las otras sustancias, de suerte que determinan la naturaleza de los mundos físico y biológico. (1)

Las principales funciones biológicas del agua se basan fundamentalmente en su capacidad para transportar diferentes sustancias a través del cuerpo y de disolver otras y mantenerlas tanto en solución como en suspensión coloidal. Esto se logra gracias a sus propiedades como disolvente y a que permanece líquida dentro de un intervalo de temperatura relativamente amplio. (10)

Muchas de las macromoléculas con interés biológico desarrollan su actividad solamente al asociarse con moléculas de agua, como es el caso de las proteínas, y los ácidos nucleicos, que son activos cuando adquieren sus correspondientes estructuras terciarias en presencia del agua (2).

III.1.1.2. COMPOSICION DEL AGUA.

Lavoisier fue el primero en reconocer que el agua es un compuesto de dos elementos: hidrógeno y oxígeno. La fórmula del agua es H_2O . Los pesos relativos del hidrógeno y del oxígeno en esta sustancia se han determinado muy cuidadosamente siendo 2,016:16,000. Esta determinación se ha realizado pesando las cantidades de hidrógeno y oxígeno que se liberan del agua durante la electrólisis y calculando los pesos de hidrógeno y oxígeno que se combinan para formar agua. (8)

III.1.1.3. ESTRUCTURA DE LA MOLECULA DEL AGUA.

La molécula del agua no es lineal, es altamente polar, constituida por dos átomos de hidrógeno unidos covalentemente a un átomo de oxígeno y forma estructuras tridimensionales debido a la hibridación de las orbitales moleculares s y p del oxígeno. El par de electrones que tiene el oxígeno pueden considerarse como dos fuerzas separadas que junto con los dos enlaces covalentes de los hidrógenos, forman un tetraedro (Fig. III.1) (6)

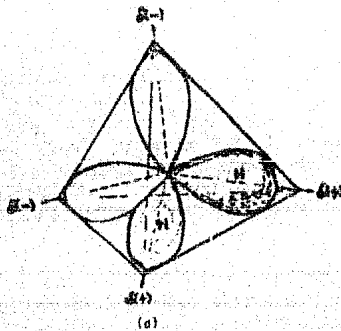


Fig. III.1.

Cada átomo de hidrógeno comparte un par de electrones con el átomo de oxígeno a través de una interacción de la orbita $1s$ del hidrógeno con las orbitas híbridas sp^3 del oxígeno. Mediante estudios de espectroscopía y métodos de difracción de rayos X se calculó que el ángulo formado en la molécula del agua es de 104.5° . Otras técnicas que se han empleado para la determinación de la estructura del agua son la resonancia magnética nuclear, la difracción con neutrones, el uso de isótopos y el análisis en el infrarrojo. (6)

En la siguiente figura observamos las dimensiones de la molécula del agua: (Fig. III.2.)

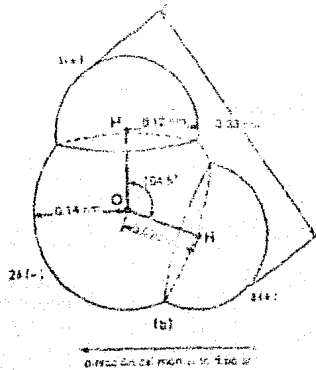


Fig. III.2.

El radio de Van der Waals (ver página 48) del átomo de hidrógeno es de 0.12 nm (1.2 Å), la longitud del enlace covalente entre el oxígeno y el hidrógeno es de 0.096 nm (0.96 Å) y el radio de Van der Waals del átomo de oxígeno es de 0.14 nm (1.4 Å). También se puede apreciar que la dirección del momento dipolar, que está determinado por la fuerza de atracción de electrones que tiene el oxígeno sobre los dos átomos de hidrógeno. (6,9)

En la molécula del agua existe una diferencia de electronegatividades debido precisamente a que el oxígeno tiene un gran poder de atracción por los electrones de los dos hidrógenos ocasionando que estos desarrollen una carga parcial $\delta(+)$, y el átomo de oxígeno una carga parcial doble negativa $2\delta(-)$. Estas diferencias de carga eléctrica hacen a la molécula del agua muy polar, y que debido a sus cargas parciales tenga la capacidad de formar con otras moléculas de agua y con algunos constituyentes como proteínas, y carbohidratos los puentes de hidrógeno. (6,8)

Como ya se explicó en la unidad I. Los puentes de hidrógeno se producen cuando dos átomos cargados eléctricamente se unen a través de un átomo de hidrógeno de tal manera que solamente los elementos más electronegativos pueden participar en este tipo de unión, principalmente el oxígeno, el nitrógeno y el flúor.

Un puente de hidrógeno no es propiamente un enlace químico sino solamente una fuerza de unión debido a una atracción electrostática entre dos átomos provenientes de moléculas polares, o sea, moléculas que tienen un dipolo o movimiento dipolar como es el caso del agua. Debido a sus cargas parciales, cada molécula de agua tiene dos sitios que actúan como receptores y dos sitios como donadores de electrones, por lo que la interacción entre dos a más moléculas de agua puede producir estructuras tridimensionales estabilizadas a través de puentes de hidrógeno. (Fig. III.3.) (2)

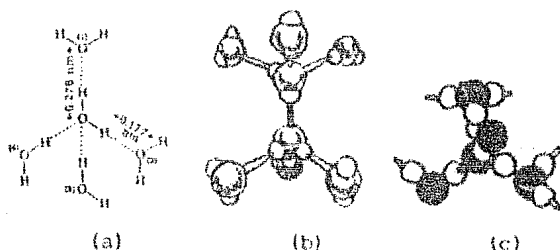


Fig. III.3. Puentes de hidrógeno entre moléculas de agua (a) las moléculas 1 y 2 y la molécula central se hallan en el plano del papel; la molécula 3 se encuentra por encima de él y la molécula 4 detrás del plano; (b) interacción de moléculas de agua a través de puentes de hidrógeno; (c) los puentes de hidrógeno entre moléculas de agua producen una estructura tetraédrica.

Esta capacidad de formar grandes agregados da por resultado que el agua tenga constantes físicas como el punto de fusión y de ebullición, y el calor de fusión y de vaporización muy grandes, ya que se requiere de una energía mayor para romper los innumerables puentes de hidrógeno intermolecular que se forman entre las moléculas de agua. (8)

La temperatura tiene un efecto, muy importante sobre la intensidad de la interacción que existe entre las moléculas de agua de tal manera que a bajas temperaturas se favorecen los puentes de hidrógeno, mientras que a altas se inhibe la formación de ellas. El hielo tiene un 100% de puentes de hidrógeno, mientras que el vapor de agua carece de ellos. Las funciones biológicas del hombre se efectúan normalmente en un intervalo de temperatura muy corto; alrededor de 37°C que es la temperatura del ser humano. Por lo tanto, debe de existir una relación entre estructura del agua a esta temperatura y la facilidad para que se efectúen las reacciones biológicas que sustentan la vida. (6,9)

Se considera que el agua a 37°C conserva de 35 a 47% de puentes de hidrógeno. (Fig. III.4)

III.1.4. EL AGUA COMO DISOLVENTE

El agua es por excelencia el disolvente universal y tiene una infinidad de aplicaciones y usos. Muchas sales y otros compuestos iónicos se disuelven fácilmente en agua, pero son insolubles en disolventes poco polares como el cloroformo y

benceno. Al disolver una sal en agua se producen iones positivos y negativos que se rodean de moléculas de agua formando especies hidratadas muy estables y cuyo grado de hidratación depende de la densidad de la carga del ion; la hidratación es mayor en los iones pequeños que en los grandes para una misma carga. A la densidad de carga se le conoce también como poder polarizante y es igual a la carga total de ión, dividida por su radio iónico. Se puede comprobar que la hidratación de los iones potasio y sodio es diferente, a pesar de tener la misma carga, ya que el radio iónico del potasio es mayor que el del sodio, lo que refleja en una menor densidad de carga y una menor capacidad de hidratación. (2)

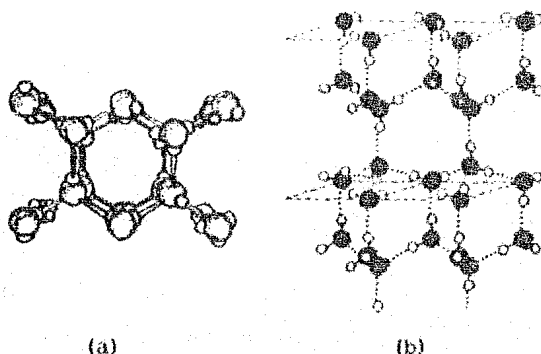


Fig. III.4. (a) estructura hexagonal de los cristales de hielo formados a través de puentes de hidrógeno entre moléculas de agua. (b) planos paralelos de las moléculas de hielo.

El agua es un buen disolvente ya que tiene una constante dieléctrica (D) muy alta, que por definición es una medida de la tendencia del disolvente a oponerse a las fuerzas electrostáticas de atracción entre iones de cargas opuestas:

$$F = \frac{e_1 e_2}{D r^2} ,$$

donde F es la fuerza de atracción entre dos iones de carga opuesta e_1 y e_2 y r es la distancia entre ellos. (Cuadro III.1)

Constante dieléctrica (D) de algunos líquidos a 20°C	
Cuadro III.1.	Agua 80.0
	Metanol 33.0
	Etanol 24.0
	Acetona 21.4
	Benceno 2.3
	Hexano 1.9

El agua es ciertamente el disolvente más importante, porque disuelve substancias iónicas como el cloruro de sodio pero también substancias no iónicas como el azúcar y el alcohol que tienen otro tipo de enlace, enlace covalente. ¿Por qué se puede efectuar la disolución en ambos casos? Porque los enlaces con el hidrógeno se efectúan con los grupos OH^- hidroxilo de los compuestos orgánicos, y después reaccionan con el agua.

Todos los compuestos polares tienen grupos carbonilos, aminos, hidroxilos y carboxilos que fácilmente pueden interactuar con las moléculas de agua por medio de puentes de hidrógeno. Este tipo de interacción es el mismo que opera cuando se forma dispersiones acuosas de polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos; los cuales no forman verdaderas soluciones, sino suspensiones coloidales estabilizadas en agua, a través de dichos puentes de hidrógeno. (2)

III.1.5. SOLUBILIDAD. (1,4)

Cuando se disuelve un sólido o un líquido, las unidades estructurales -iones o moléculas- se separan una de otra y el espacio entre ellas pasa a ser ocupado por moléculas del solvente. Durante la disolución debe administrarse energía para romper los enlaces entre las partículas del soluto (fuerzas interiónicas o intermoleculares); esta energía es aportada por la formación de uniones entre partículas de soluto y moléculas de solvente: Las fuerzas atractivas antiguas son reemplazadas por nuevas.

Sólo el agua y otros solventes muy polares son capaces de disolver apreciablemente compuestos iónicos. En solución cada ion está rodeado por muchas moléculas de solvente, por lo que se dice que está solvatado; y si el solvente es agua se dice que el ion está hidratado.

Para que un solvente pueda disolver compuestos iónicos debe tener una constante dieléctrica elevada, o sea, debe poseer propiedades altamente aislantes para disminuir la atracción entre iones de carga opuesta una vez que se encuentran solvatados.

El agua debe sus relevantes propiedades como solvente de substancias iónicas no sólo a su polaridad y a su elevada constante dieléctrica, sino también a otro factor, tiene el grupo $-\text{OH}$, por lo que puede formar puentes de hidrógeno.

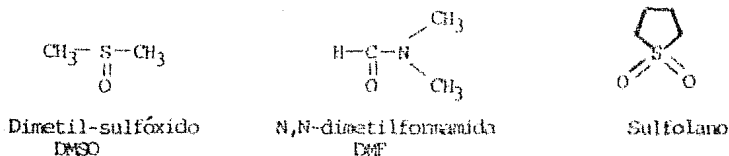
Las características de solubilidad de los compuestos no iónicos están determinados fundamentalmente por su polaridad. Compuestos no polares o débilmente polares se disuelven en solventes no polares o apenas polares. "Una substancia disuelve a otra similar" es una regla empírica sumamente útil.

Parte importante de la química se ocupa de las reacciones entre compuestos no iónicos (generalmente orgánicos) y las substancias iónicas (inorgánicas y orgánicas), por lo general se debe elegir un solvente en que se disuelvan ambos reactivos. El agua es un mal solvente para la mayoría de las substancias orgánicas dificultad que puede superarse por adición de otro, como el metanol.

Solventes tales como el agua y el metanol se denominan solventes próticos, contienen hidrógeno unido a oxígeno o nitrógeno, estos tienden a solvatar aniones y éstos aniones son la parte importante de un reactivo iónico. Así, aunque los

solventes próticos disuelven el reactivo y lo ponen en contacto con la molécula orgánica, estabilizan al mismo tiempo los aniones desunjiendo drásticamente su reactividad, debilitando su basicidad y el poder nucleofílico.

En años recientes se ha extendido, el uso de solventes apróticos polares, de constante dieléctrica moderadamente elevada y que no contienen hidrógeno ácidos como por ejemplo:



Estos solventes disuelven reactivos orgánicos e inorgánicos pero, al disolver iónicos, solvatan más intensamente los cationes, dejando los aniones relativamente libres y altamente reactivos: Así son más básicos y más nucleofílicos.

Moléculas individuales pueden tener tanto partes polares como no polares y si son suficientemente grandes, estas partes exhiben sus propiedades individuales de solubilidad.

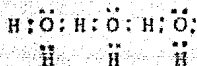
Las porciones polares se disuelven en agua y las no polares en un solvente no polar o, si no hay ninguno cerca, se aglomeran, en efecto, se disuelven mutuamente.

Tal comportamiento dual confiere a los jabones, y detergentes su poder limpiador y controla la alineación de las moléculas en las membranas celulares: una molécula proteínica globular, digamos una enzima, se enrolla para exponer sus partes no polares, al hacer esto, adquiere la forma específica necesaria para sus propiedades biológicas características.

III.1.6. EL AGUA COMO ELECTROLITO (7)

La polaridad de la molécula del agua conduce a la hidratación de los cationes y de los aniones, haciendo posible que los compuestos iónicos se disuelvan en agua. Cada ion negativo atrae los extremos positivos de las moléculas del agua adyacentes y tiende a mantener unidas a él varias de estas moléculas. Los iones positivos que generalmente son más pequeños que los aniones, muestran todavía más atracción; cada catión atrae los extremos negativos de las moléculas de agua y mantiene unidos a su alrededor varias de estas, formando un hidrato muy estable. (Fig. III.5.)

Si el agua tiene terminales positivos y negativos, tienden a asociarse unos con otros, formando cadenas:



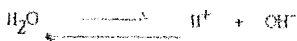
Si estas moléculas se separan, pueden formar iones hidronio H_3O^+ y iones oxhidrilo OH^- .

Otra manera de expresarlo es que el agua al disociarse forma iones hidronio H_3O^+ y iones OH^- en una autoionización limitada pero de gran importancia, que el agua sea simultáneamente un ácido y una base. Por ejemplo:



Puesto que una molécula de agua dona un protón y la otra lo acepta podemos decir que la que lo acepta es una base y la que lo dona es un ácido.

Podemos representar la reacción de equilibrio entre ambos iones H^+ y OH^- así:



Al establecerse el equilibrio en la reacción, la cantidad de iones hidronio e hidroxilo es muy pequeña por lo que el agua es un electrólito débil. La ecuación muestra que los iones H^+ y los iones OH^- están en igual concentración, por lo que el agua es una sustancia neutra.

III.1.7. EL AGUA COMO ACIDO Y BASE (7)

Un ácido es un donador de protones, iones hidrógeno H^+ o iones hidronio H_3O^+ . Una base se define como una sustancia que al disociarse en solución acuosa contiene iones hidroxilo OH^- . (Consultar apéndice No. A 2)

Estos iones están presentes en el agua pura, neutra en concentraciones iguales, pero muy pequeñas:



Esta reacción indica que una molécula de agua actúa como ácido porque cede un protón y otra molécula de agua actúa como base porque acepta un protón. Según Lewis, ampliando estas definiciones, llama ácido a toda molécula o grupo atómico que puede aceptar electrones y base a aquella sustancia que puede ceder electrones. Por lo tanto, el agua puede considerarse como un ácido o como una base según ésta teoría.

La reacción de un ácido y una base se denomina neutralización porque los iones H^+ y los iones OH^- forman agua neutra.

Los ácidos y las bases pueden ser electrólitos fuertes, moderados y débiles. Los ácidos y bases fuertes están totalmente disociados. Los moderados y débiles están parcialmente disociados.

La neutralización da lugar a la formación de sales, que es el resultado de la reacción entre ácido y una base, es decir, las sales estarán formadas por el catión de una base y el anión de un ácido.

III.1.8. CONSTANTE DE IONIZACIÓN DEL AGUA. (1,4)

En cualquier solución acuosa, ya sea ácida, básica o neutra, a 25°C, el producto de la concentración de iones H^+ , expresado en gramos iones/litros, y el producto de la concentración de iones OH^- , expresado en gramos iones /litros, es una constante inicial, y es igual a 1×10^{-14} .

Puesto que la concentración de los iones H^+ es de 1×10^{-7} gramos-iones/litros y la concentración de iones OH^- es 1×10^{-7} gramos-iones/litro, esto quiere decir que de cada diez millones de litros de agua a 25°C, sólo hay una molécula ionizada, o de manera más específica solamente hay un ion de H^+ y 17 gr. de ion OH^- en 10,000,000,000 (10^{10}) gr. de agua. La concentración se expresa en gramos-iones /litro.

La constante de equilibrio de la ionización del agua se expresa de la siguiente manera:

$$\frac{[H_3O^+][OH^-]}{[H_2O]^2} = K$$

Tratándose de soluciones diluidas, la concentración de las moléculas disociadas puede considerarse como constante, por lo que la igualdad anterior se expresa:

$$[H_3O^+] \times [OH^-] = [H_2O] \quad K = K_{H_2O} = K_w.$$

La expresión K_{H_2O} a temperatura constante, se denomina constante de ionización del agua. El producto de la ionización varía con la temperatura, pero generalmente se toma como base su valor a 24°C, que es de:

$$[H_3O^+] \quad (OH^-) = K_{H_2O} = 1 \times 10^{-14}$$

Encerrando entre paréntesis a los respectivos iones se indica la concentración. La concentración de iones H^+ indica acidez y se escribe (H_3O^+) o también (H^+) y su valor es 10^{-7} ; la concentración de iones OH^- indica alcalinidad y se escribe (OH^-) y su valor es 10^{-7} . Si hay igual cantidad de iones H^+ (como el ion hidronio es un ion hidratado $H_2O.H^+$) algunas veces conviene considerar únicamente el ion hidrógeno solo, H^+ ; el agua es neutra y se expresa como 1×10^{-14} .

Se puede expresar la concentración de iones hidrógeno de otra manera: La concentración de iones hidrógeno en el agua es igual a:

$$[H^+] = \frac{1}{10 \ 000 \ 000} = \frac{1}{10^7} = 10^{-7}$$

La concentración de los iones OH^- se puede escribir de la misma manera : 10^{-7}

El número que está como exponente negativo de 10 es el valor del pH. En el caso del agua destilada, el exponente negativo de 10 es 7, por lo tanto el valor de pH del agua destilada es 7 y su reacción es neutra.

Resumiendo: si en cualquier solución acuosa el producto de la concentración de iones H^+ y el producto de la concentración de iones OH^- es una constante, conociendo la concentración de uno de los iones podemos conocer la concentración del otro. Podemos expresar la acidez o la basicidad de la solución mediante el término concentración de iones H^+ o concentración de iones OH^- , pero es costumbre expresarlo en función de la concentración de iones H^+ :

Si la solución es neutra

$$[H^+] = [OH^-]$$

$$[H^+] = 1 \times 10^{-7}$$

$$[OH^-] = 1 \times 10^{-7}$$

Si la solución es ácida

$$[H^+] > [OH^-]$$

$$[H^+] > 1 \times 10^{-7}$$

$$[OH^-] < 1 \times 10^{-7}$$

Si la solución es básica

$$[OH^-] > [H^+]$$

$$[OH^-] > 1 \times 10^{-7} \quad [H^+] < 1 \times 10^{-7}$$

III.2.1. pH (1,4)

Se define como el logaritmo negativo de la concentración de hidrogeniones expresado matemáticamente así:

$$pH = \log 1/[H^+]$$

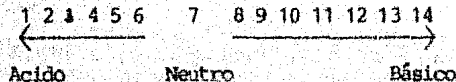
ó

$$pH = -\log [H^+]$$

Como la definición indica el valor negativo, el resultado tiene un valor positivo.

Cuando una solución tiene $pH = 7$, quiere decir que tiene igual número de iones H^+ que de iones OH^- y se dice que es neutra. Se puede expresar con un uno y siete ceros (1 parte en 10,000,000) y quiere decir que hay una parte de iones hidrógeno en 10,000,000 partes de solución. Si el pH disminuye la concentración de iones hidrógeno aumenta. Mientras más bajo es el pH la solución es más ácida. Cuando el pH es mayor de siete la solución es básica.

El esquema siguiente da idea de lo que es una solución ácida o básica



En la tabla siguiente se muestra la concentración de iones H^+ y iones OH^- en soluciones con diferentes valores pH (Tabla III.1.)

pH	Concentración de iones H^+	Concentración de iones OH^-	Observaciones Solución
1	1 parte en 10	1 parte en 10 000 000 000 000	Ácida
2	1 parte en 100	1 parte en 1 000 000 000 000	
3	1 parte en 1 000	1 parte en 100 00 000 000	
4	1 parte en 10 000	1 parte en 10 000 000 000	
5	1 parte en 100 0000	1 parte en 1 00 000 000	
6	1 parte en 1 000 000	1 parte en 100 000 000	
7	1 parte en 10 000 000	1 parte en 10 000 000	
8	1 parte en 100 000 000	1 parte en 1 000 000	
9	1 parte en 1 000 000 000	1 parte en 100 000	
10	1 parte en 10 000 000 000	1 parte en 10 000	
11	1 parte en 100 000 000 000	1 parte en 1 000	
12	1 parte en 1 000 000 000 000	1 parte en 1 00	Alcalina
13	1 parte en 10 000 000 000 000	1 parte en 10	

Si la concentración de iones hidrógeno en el agua pura es de 1×10^{-7} mol. litro y puesto que hay un ion H^+ por cada ion OH^- , la concentración de dichos iones es también de 1×10^{-7} mol. litro. O expresado de otra manera: Hay solamente una molécula de cada ion en 10 millones (10^7) de litros de agua.

El número de moles de agua en un litro es:

$$\frac{1\ 000\ \text{g/litro}}{18\ \text{g/mol}} = 55\ \text{moles/litro}$$

Entonces, la fracción de una muestra de agua que se encuentre ionizada es de:

$$\frac{1 \times 10^{-7}\ \text{mol/litro}}{55\ \text{moles/litro}} = 2 \times 10^{-9}\ \text{(aprox.)}$$

Es lo mismo que decir: Solamente una molécula de cada 500 millones de moléculas es disociada en iones.

La cantidad disociada es extraordinariamente pequeña y sin embargo se puede medir. Y siendo tan pequeña, es sumamente importante y casi todas las reacciones dependen de ella.

Para calcular el pH de una solución:

1. Calcular la concentración de iones hidrógeno $[H^+]$
2. Calcular el logaritmo de base 10 de $[H^+]$
3. El pH es el negativo del valor encontrado en el paso 2. Por ejemplo: para el agua pura a 25°C. (3)

$$pH = \log [H^+] = \log 10^{-7} = (-7) = 7.0$$

Los siguientes ejemplos ilustran cómo calcular el pH de las siguientes soluciones ácidas y alcalinas:

Ejemplos: ¿Cuál es el pH de una solución cuya concentración de iones hidrógeno es de 3.2×10^{-4} molar? (ver apéndice A.6.).

$$\begin{aligned} pH &= -\log [H^+] \\ pH &= -\log (3.2 \times 10^{-4}) \\ pH &= -\log (3.2) - \log (10^{-4}) \\ pH &= -0.5 + 4.0 \\ pH &= 3.5 \end{aligned}$$

Ejemplo: ¿Cuál es el pH de una solución cuya concentración del ion hidroxilo es de 4.0×10^{-4} molar?

Para plantear este problema definimos la cantidad de pOH, que es igual a $-\log OH^-$ y que puede ser derivada de la definición de K_w :

$$\begin{aligned} K_w &= [H^+][OH^-] = 10^{-14} \\ \log [H^+] + \log [OH^-] &= \log 10^{-14} \\ pH + pOH &= 14 \end{aligned}$$

Para resolver el problema por este planteamiento:

$$\begin{aligned} [OH^-] &= 4.0 \times 10^{-4} \\ pOH &= -\log [OH^-] \\ &= -\log (4.0 \times 10^{-4}) \\ &= -\log (4.0) - \log (10^{-4}) \\ &= -0.60 + 4.0 \\ &= 3.4 \\ \text{ahora pH} &= 14 - pOH = 14 - 3.40 \\ &= 10.6 \end{aligned}$$

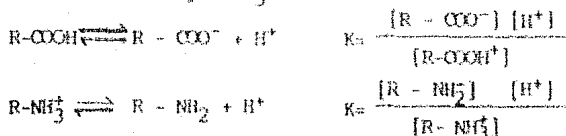
Es importante hacer la distinción entre los ácidos fuertes (por ejemplo HCl, H_2SO_4) que se disocian completamente aún en soluciones fuertemente ácidas (esto es a pH bajo) y los ácidos débiles, que se disocian sólo parcialmente en solución ácida. Una distinción semejante se hace entre las bases fuertes (por ejemplo: KOH, NaOH) y las bases débiles (por ejemplo: $Ca(OH)_2$)

Sólo las bases fuertes están disociadas a pH muy alto. El comportamiento de la disociación (equilibrio protónico) de los grupos funcionales débilmente ácidos y débilmente alcalinos es fundamental para entender la influencia del pH intracelular sobre la estructura y la actividad fisiológica de estos compuestos.

Nos referimos a la forma protonizada de un ácido (por ejemplo: HA ó RNH_3^+) como el ácido y a la forma no protonizada (por ejemplo: A^- ó RNH_2) como su base conjugada. De manera semejante podemos referirnos a una base (por ejemplo: A^- ó RNH_2) y su ácido conjugado (por ejemplo: HA ó RNH_3^+).

La fuerza relativa de los ácidos y de las bases débiles se expresa cuantitativamente como sus constantes de disociación, las cuales expresan su tendencia a ionizarse.

Las expresiones siguientes muestran la constante de disociación para 2 ácidos débiles representativos $R-COOH$ y $R-NH_3^+$. (11)



III.2.2. pK (10)

Como los valores numéricos de K para los ácidos y bases débiles son números exponenciales negativos, es conveniente expresar K como pK por lo cual el pK está relacionado con K como el pH está relacionado con la concentración de H^+ .

$$pK = -\log K$$

Al relacionar la K con $[H^+]$ y con las concentraciones de ácidos indisiociados y su base conjugada, nótese que:

$$[R-COO^-] = [R-COOH]$$

o cuando

$$[R-NH_2] = [R-NH_3^+]$$

entonces

$$K = [H^+]$$

Esto quiere decir que cuando la especie asociada (protonizada) y la disociada (base conjugada) están presentes en igual concentración, la concentración de iones hidrogeno prevaeciente $[H^+]$ es numericamente igual a la constante de disociación K.

Si se toman los logaritmos de ambos miembros de la ecuación anterior y se multiplican ambos miembros por -1, las expresiones serán como sigue:

$$K = [H^+]$$

$$-\log K = -\log [H^+]$$

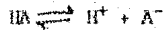
Esto es, el pK de un grupo ácido es aquel pH en la cual las especies protonizadas y no protonizadas se encuentran en concentraciones iguales. (tabla III.2)

Fuerza del ácido	Ka	Fuerza de la base	Kb	Ejemplos.
Muy fuerte	10^4 a 1	Muy débil	10^{-4} a 1	HCl / Cl ⁻
Fuerte	1 a 10^{-4}	Débil	1 a 10^4	HSO ₄ ⁻ / SO ₄ ²⁻
Moderado	10^{-4} a 10^{-8}	Moderado	10^4 a 10^8	HAc / Ac
Débil	10^{-8} a 10^{-12}	Fuerte	10^8 a 10^{12}	HCO ₃ ⁻ / CO ₃ ²⁻
Muy débil	10^{-12} a 10^{-16}	Muy fuerte	10^{12} a 10^{16}	HS ⁻³ / S ²⁻

Tabla III.2. Tabla de Constantes de Disociación

III.2.3. ECUACION DE HENDERSSON-HASSELBACH

Un ácido débil HA se ioniza así:



La constante de equilibrio para la disociación se escribe:

$$K = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}$$

Pasando HA al primer miembro de la ecuación:

$$[H^+][A^-] = K[HA]$$

dividiendo ambos miembros de ecuación entre [A⁻]

$$[H^+] = K \frac{[HA]}{[A^-]}$$

Tomando los logaritmos decimales de ambos miembros

$$\log [H^+] = \log K + \log \frac{[HA]}{[A^-]} = \log K + \log \frac{[HA]}{[A^-]}$$

multiplicando por -1:

$$-\log [H^+] = -\log K - \log \frac{[HA]}{[A^-]}$$

Substituyendo pH y pK con $-\log[H^+]$ y $-\log K$ respectivamente se tiene

$$pH = pK - \log \frac{[HA]}{[A^-]}$$

Ahora, para quitar el signo menos se invierte el último término:

$$pH = pK + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

Cuando $A^- = HA$ (cuando un ácido está semineutralizado: como en el punto de equivalencia de una titulación) (ver Quinta Unidad).

$$pH = pK + \log \frac{[A^-]}{[HA]} = pK + \log \frac{[1]}{[1]} = pK + 0$$

$$pH = pK$$

Cuando la relación $[A^-] / [HA] = 100$ a 1

$$pH = pK + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

$$pH = pK = \log 100/1 = pK + 2$$

Cuando la relación $[A^-] / [HA] = 10$ a 1

$$pH = pK + \log 1/10 = pK + (-1)$$

La ecuación de Henderson-Hasselbach generalmente se aplica en el laboratorio para la preparación de soluciones amortiguadoras. Ejemplo:

Consideremos el problema práctico de la preparación de un litro de amortiguador de acetato 0.1M., con un pH = 5.22. El primer paso, consiste en determinar la relación de la base conjugada (ion acetato) y del ácido débil (ácido acético). Se puede hacer esto si se utiliza la ecuación de Henderson-Hasselbach. (5) (Consultar apéndices A 6, A 7, A8, A9).

$$pH = pK_a + \log \frac{[CH_3COO^-]}{[CH_3COOH]}$$

$$5.22 = 4.74 + \log \frac{[CH_3COO^-]}{[CH_3COOH]}$$

$$\log \frac{[CH_3COO^-]}{[CH_3COOH]} = 5.22 - 4.74 = 0.48$$

$$\frac{[CH_3COO^-]}{[CH_3COOH]} = \text{Antilog. } 0.48$$

$$\frac{[CH_3COO^-]}{[CH_3COOH]} = 3$$

En esta solución habrá 3 moles de CH_3COO^- por cada mol de CH_3COOH ; o sea que el 75% de los componentes de la solución "Buffer", será la base conjugada CH_3COO^- ; puesto que un litro de solución de "Buffer" de acetato 0.1M. contendrá 0.1 molar de acetato u ácido acético. Combinados habrá $0.75 \times 0.1 = 0.075$ moles de acetato, es decir que se necesitan 750 ml. de la base y 250 ml. de ácido en una solución de un litro. (3)

III.2.4 DETERMINACION DE pH POR MEDIO DE INDICADORES (4)

Un método para determinar el pH lo constituyen los indicadores. Un indicador es una sustancia que cambia de color dentro de un pequeño intervalo de la concentración de pH, y en general, el pasar de una disolución ácida a una alcalina. Son estos ácidos y bases débiles que, en solución, se disocian en iones cuyo color es diferente del de la molécula sin disociar.

Por ejemplo: El equilibrio existente en una solución de un indicador ácido como el anaranjado de metilo, puede expresarse en la siguiente forma:



Las formas ionizadas y no ionizadas difieren en el color.

Un aumento en la concentración de ion H^+ cambia el equilibrio, dando con el indicador color rojo. Cuando se aumenta la concentración de iones H_3O^+ hasta obtener un pH de 3, cerca del 90% del indicador está presente en forma no ionizada y el 10% en forma de ion H^+ ; el equilibrio, sigue cambiando hacia la forma roja, pero la concentración de ésta es ya tan grande que no se aprecia el cambio de color fácilmente.

La adición de la base en un sistema reduce la concentración de los iones hidrógeno y cambia el equilibrio, dando al anaranjado de metilo coloración amarilla. Una disminución mayor en este color de la concentración del ion H_3O^+ no produce cambio notable en la coloración. La amplitud del pH entre 3 y 4.4 se conoce como la zona de variación del indicador; dentro de estos límites es donde se producen los cambios de color del indicador, que indican el cambio de pH.

Consecuentemente, el anaranjado de metilo es útil en la determinación del pH de soluciones cuyos valores se encuentran entre 3 y 4.4.

El pH de una solución puede medirse añadiéndole un indicador y comparando el color obtenido con una serie de soluciones patrones de pH conocido, adicionados de la misma cantidad del mismo indicador. Estos patrones pueden obtenerse en el comercio.

También existen patrones fijos de vidrio en cajas de comparación. Los papeles indicadores, que son tiras de papel absorbentes impregnadas de uno o varios indicadores, dan una medición aproximada del pH de la solución en que se sumergen por comparación con tablas coloreadas de referencia; son útiles cuando basta una exactitud de 0.2 de unidad de pH aproximadamente. Si la medición tiene que ser más exacta, debe emplearse un potenciómetro.

III.2.5. EMPLEO DE LOS INDICADORES EN LAS TITULACIONES ACIDO-BASE

Al titular:

1. Un ácido fuerte con una base fuerte, se emplea un indicador que cambie de color a un pH alcalino, por ejemplo la fenolftaleína.
2. Una base fuerte con un ácido fuerte, se emplea un indicador que cambie de color a un pH ácido, por ejemplo el anaranjado de metilo.
3. Un ácido débil con una base fuerte, se emplea un indicador que cambie de color a un pH alcalino, por ejemplo: la fenolftaleína.
4. Una base débil con un ácido fuerte, se emplea un indicador que cambie de color a un pH ácido, por ejemplo el anaranjado de metilo.

Para titular ácido fuerte con base fuerte y viceversa el pH cambia tan rápidamente al acercarse del punto de equivalencia que el indicador utilizado no es muy importante; se transforma completamente de una forma a la otra al añadir una cantidad muy pequeña del reactivo. Pero para las titulaciones de ácidos y bases débiles, el indicador debe escogerse en función del grado de disociación de las sales que se producen durante la titulación. Por ejemplo: un indicador que cambie de color en la parte ácido de la escala de pH no es útil para titular ácidos débiles con bases fuertes porque cambiaría de color antes de que se alcanzara la neutralidad. (ver apéndice No.A 5) (4)

III.3.1. SOLUCIONES (11,12)

Una solución se define como la interacción homogénea entre un soluto y un solvente.

Puesto que la concentración de una solución varía grandemente, es necesario expresar la cantidad de soluto que se disuelve en determinada cantidad de solvente, ya que los cambios de concentración originan grandes cambios debido a la dilución. Por otra parte, ciertas propiedades de las soluciones dependen de la clase de partículas presentes mientras que otras dependen solamente del número de partículas.

La cantidad de soluto disuelto en un peso o en un volumen determinado de disolución, o incluso de disolvente, constituye la concentración de la disolución.

La cantidad de sustancia disuelta, conocida en general como soluto, puede expresarse en unidades físicas, usualmente en gramos o en unidades químicas generalmente en moles o en equivalente gramo; o en volumen de disolución, generalmente por un litro.

Por lo tanto se puede decir que la concentración de una solución indica la cantidad exacta de soluto en un determinado volumen de solución.

Los tipos de soluciones que se utilizan más en el laboratorio son:

III.3.1.a. Porcentuales (%)

Una solución porcentual se define como aquella que expresa el porcentaje de soluto en gramos y es llevado a un volumen final de cien ml. por ejemplo: NaCl 30% quiere decir, que el 30% se expresa en gramos (30 grs.) que se pesan y se disuelven en 100 ml. de solvente que generalmente es agua destilada. Asimismo esta definición sirve para conocer lo que es una solución peso/volumen.

De las soluciones porcentuales existen a su vez las de peso/peso, volumen/volumen, peso/volumen.

a.1. Peso/peso (soluto grs./disolvente grs.)

Es aquella solución donde el porcentaje (%) se expresa en gramos y son llevados c.b.p. 100 grs. de reactivo final. Este tipo de soluciones son más utilizadas a nivel de laboratorios industriales para la preparación de ácidos y es como se expresa la pureza de un ácido. Por ejemplo: El HCl concentrado, generalmente en el frasco reactivo se indica que la pureza del ácido es de 36.5% p/p, esto quiere decir que por cada 100 grs. de reactivo, sólo 36.5 grs. son químicamente puros de HCl (ácido clorhídrico).

a.2. Volumen/volumen (soluto ml./ disolvente ml.)

Es aquella solución donde el porcentaje (%) de soluto se expresa en mililitros y son llevados a un volumen final de 100 ml. de solvente. Este tipo de soluciones son muy utilizadas en los reactivos que, como el alcohol, están en estado líquido. Por ejemplo: Si tenemos una solución de etanol al 30% esto quiere decir que se miden 30 ml. de etanol y se llevan a un volumen final de 100 ml. de disolvente.

a.3. Peso/volumen.

Son las más utilizadas de las tres y se define estrictamente como una solución porcentual enunciada en un principio.

III.3.1.b. Soluciones Molares (M)

Una solución molar se define como el peso molecular del soluto expresado en gramos y llevado a un volumen final de un litro de solución.

$$1M \text{ ----- } PM \text{ (soluto) grs. ----- } 1000 \text{ ml. solución}$$

o bien:

$$M = \frac{\text{gramo de soluto por litro de solución}}{\text{Masa molecular del soluto.}} = \text{Moles de soluto/lit. de solución}$$

Por ejemplo: para preparar una solución 1M de Na OH se suman primero los pesos atómicos de los elementos y con esto se obtiene el P.M. del soluto.

Na	23
O	16
H	1

$$\text{Por tanto } 1M \text{ ----- } 40 \text{ grs. NaOH ----- } 1000 \text{ ml.}$$

40 P.M. NaOH

III.3.1.c. Soluciones Normales (N)

Se definen como el peso equivalente del soluto, expresado en gramos y llevado a un volumen de un litro de solución.

El peso equivalente se define como el P.M. del soluto expresado en gramos entre el número de H⁺ sustituibles o entre el número de la valencia. Por ejemplo:

$$1N - \text{Peq soluto (grs.)} \text{ --- } 1000 \text{ ml. solución}$$

$$\text{Peq} = \frac{\text{P.M. soluto gramo}}{\text{Número de H}^+ \text{ sustituibles o número de valencia.}}$$

o bien:

$$N = \frac{\text{gramo soluto. por litro de solución}}{\text{Masa equivalente del soluto}} = \text{Número de equivalencia por litro de solución}$$

Por ejemplo: Para preparar una solución 1N del HCl:

1. Se determina su peso equivalente por lo tanto primero se saca el P.M. (en igual forma que para las soluciones molares, es decir, sumando los pesos atómicos de los elementos).

H	1	despejando Peq =	$\frac{36.5}{1}$	= 36.5 grs. HCl
Cl	35.5			
36.5 P.M. _{HCl}		(1 es el único H ⁺ sustituible del compuesto).		

Por tanto: 1N --- 36.5 grs. HCl --- 1000 ml solución

2. Existen dos consideraciones más para la realización de los cálculos en este tipo de soluciones.

a) Generalmente los ácidos no tienen el 100% de pureza en los frascos reactivos de donde los utilizamos, por lo que se hace necesario que se ajuste a los cálculos, la pureza indicada en la etiqueta del frasco reactivo, por ejemplo:

$$\text{HCl } 36.5\% \text{ p/p} = 36.5 \text{ gramos HCl} \text{ --- } 100 \text{ gramos reactivo.}$$

Ahora bien, si tenemos 36.5 gramos HCl, queremos saber cuántos gramos, de acuerdo a la pureza, son totalmente puros en la cantidad inicial.

$$\begin{array}{r} 36.5 \text{ gramos HCl} \text{ --- } 100 \text{ gramos reactivo} \\ 36.5 \text{ gramos HCl} \text{ --- } X \text{ gramos reactivo} \end{array}$$

$$X = 100 \text{ gramos HCl son puros.}$$

b) Hasta aquí, corregimos un dato ; nos falta considerar la densidad del ácido, esto se debe a que HCl. del frasco reactivo viene en estado líquido, por lo que tenemos que hacer la conversión de gramos a mililitros y para esto utilizamos la densidad.

$$\rho = \frac{m}{v} \text{ despejando Volumen} = m / \rho$$

La densidad del HCl es un valor fijo que se enuncia también en la etiqueta del frasco este es igual a 1.18. gr/ml.

por tanto, $1.18 = 100 / ?$

Despejando $\text{Volumen} = \frac{100 \text{ gr}}{1.18 \text{ gr/ml}} = 84.7 \text{ ml. HCl}$

para preparar una solución 1M-HCl-1000 ml., se necesitan medir 84.7 HCl, llevarlos a un volumen final de 1 litro de solución.

Para preparar soluciones normales en sustancias alcalinas, generalmente estas ya vienen en los frascos reactivos con el 100% de pureza por lo que no hay necesidad de realizar correcciones de cálculo en este sentido. Como tampoco de densidad ya que la presentación de estas sustancias son en estado sólido.

(Consultar apéndice No. A 4)

III.3.1.d. Soluciones Molales

Una solución molar se define como el P.M. del soluto en gramos en 1000 gramos de solvente, o dicho de otra manera es el número de moles de soluto disueltas en 1000 gramos de solvente.

$$1M \text{ ----- P.M. (soluto) gramo ----- } 1000 \text{ gramos solvente.}$$

Estas soluciones tienen aplicación en al medida del punto de ebullición, de fusión y de presión osmótica.

$$m = \frac{\text{gr. de soluto } 1000 \text{ grs. solvente}}{\text{Masa molecular del soluto}} = \text{moles de soluto por Kg. de solvente.}$$

Para un mismo solvente soluciones de la misma molaridad tienen igual relación de moléculas de soluto a moléculas de solvente.

Las soluciones molales se pesan en vez de medirse, porque cuando se disuelve un cierto peso de soluto en 1000 gramos de solvente, es imposible calcular cuál va a ser el volumen final, debido a que siempre hay contracciones y expansiones, a menos que la cantidad de soluto sea mucho muy pequeña.

BIBLIOGRAFIA

1. Alcántara, B.C.: Química Inorgánica Moderna. 2a. ed. Ed. EXIALSA México, 1968.
2. Badvi, D.S.: Química de los alimentos. 1a. ed. Ed. Alhambra. México, 1981.
3. Butler, J.N.: Cálculos de pH y de solubilidad. Fondo Educativo Interamericano, México, 1968.
4. Cotton, F.A. y Wilkinson, G.: Química Inorgánica Avanzada. 2a. ed. Limusa-Wiley México, 1969.
5. Dawes, E.A.: Quantitative Problems in Biochemistry. Williams and Wilkins, 1962.
6. Eisenberg, D., Kauzmann, W.: The Structure Properties of Water. Oxford University Press, Nueva York, 1969.
7. Frey, P.R.: Química Moderna. 1a. ed. Montare y Simón. Barcelona, 1968.
8. H.S. Frank.: The Structure of Ordinary Water. Science 169:635. (1970).
9. H.S. Frank, Quist A.S.: Pauling's Model and the Thermodynamic Properties of Water, J.Chem. Phys 34:604 (1961).
10. Louisot, P.: Bioquímica Estructural. 1a. ed. Ed. A.C., Madrid, 1977.
11. Orozco, F.D.: Análisis Químico Cuantitativo. Imprenta Universitaria, 1944.
12. Waser, J.: Quantitative Chemistry. 1a. ed., Benjamín, México, 1964.

CUARTA UNIDAD

MÉTODOS USADOS EN EL LABORATORIO DE
BIOQUÍMICA GENERAL

1. INTRODUCCION
2. TITULACION
3. POTENCIOMETRIA
4. CROMATOGRAFIA
5. ELECTROFORESIS
6. FOTOCOLORIMETRIA Y ESPECTROFOTOMETRIA
7. OXIMETRIA

OBJETIVOS

Al finalizar esta unidad usted será capaz de:

1. Diferenciar y conocer los métodos de análisis más comúnmente usados en el laboratorio de bioquímica.
2. Definir qué es la Titulación y aprender sus fundamentos.
3. Conocer el principio de la Potenciometría.
4. Definir que es la Cromatografía y conocer sus fundamentos.
5. Conocer y diferenciar los diversos tipos de Cromatografía usados en Bioquímica.
6. Entender qué es la Electroforesis y la importancia de su uso en Bioquímica.
7. Conocer y diferenciar los diversos tipos de Electroforesis.
8. Comprender los principios básicos de la Fotocolorimetría y Espectrofotometría.
9. Conocer el manejo y funcionamiento del fotocolorímetro y espectrofotómetro.
10. Entender los fundamentos de Oximetría y su importancia en Bioquímica.

IV.1. INTRODUCCION (10)

Los métodos para el análisis se pueden dividir en dos grupos principales:

a) Análisis Cualitativo. Es la identificación por medios químicos de las sustancias que se encuentran en una mezcla.

b) Análisis Cuantitativo. Es la medición de la cantidad de una sustancia específica que se encuentra en la muestra.

En Bioquímica, los métodos cualitativos se utilizan para establecer la presencia de componentes anormales en sangre, orina, heces, etc., mientras que los métodos cuantitativos permiten conocer la tasa de las distintas sustancias en los líquidos orgánicos. Los métodos cuantitativos se dividen en tres grupos importantes:

b.1 Gravimétricos

La sustancia que se analiza se precipita bajo forma de sal insoluble, o se extrae con un solvente. El peso seco del precipitado o del extracto es una medida de la cantidad de sustancia que contenía la mezcla original. Estos métodos se usan rara vez en el laboratorio de Bioquímica, porque exigen grandes cantidades de material.

b.2 Volumétricos

Se mide la cantidad de sustancia presente mediante Titulación.

b.3. Colorimétricos

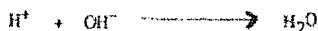
La sustancia problema se somete a una reacción cuyo producto final es coloreado. La intensidad del color de la solución final depende de la cantidad de sustancia presente en la solución original. El laboratorio de Bioquímica utiliza ampliamente los métodos volumétricos y colorimétricos.

IV.2. TITULACION (VALORACION ACIDIMETRICA Y ALCALIMETRICA) (2,8)

La neutralización que consiste en determinar las cantidades equivalentes de soluciones normales de reacción básica y reacción ácida, que reaccionan dando agua y la sal correspondiente se le llama, valoración y se puede observar mediante el uso de los indicadores al cambiar de coloración en un medio ácido o en un medio alcalino.

Esta valoración en las reacciones ácido-base en una disolución, trabajando con el número de equivalentes por litro de solución, se llaman métodos volumétricos y tienen como fundamento la acción mutua entre ácidos y bases, es decir reacciones de neutralización; mediante soluciones alcalinas de concentración conocida, al hacerlas actuar cuantitativamente sobre soluciones ácidas, se determina la cantidad de éstos (acidimetría) e inversamente, disponiendo de soluciones valoradas de ácidos, se determina la cantidad de bases que existan en la solución (alcalimetría).

Estas reacciones de neutralización están basadas en la unión de iones H^+ con iones OH^- para formar agua.



Si se conoce la cantidad de base que ha neutralizado a un ácido, es fácil conocer la cantidad de ácido que se neutralizó, si se tiene en cuenta la masa equivalente de uno y otro compuesto.

La normalidad del ácido o de la base se puede obtener mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Normalidad (ácido)} = \frac{\text{Número de moles } H^+ \text{ disponible}}{\text{Litro de disolución}} = \frac{\text{Número de equivalentes}}{\text{Litro de disolución}}$$

$$\text{Normalidad (base)} = \frac{\text{Número de moles } OH^- \text{ disponible}}{\text{Litro de disolución}} = \frac{\text{Número de equivalentes}}{\text{Litro de disolución}}$$

Para la reacción entre los iones hidrógeno y los iones hidroxilo el número de moles de ion hidrógeno añadidos debe ser igual al número de iones hidroxilo presentes; esto es, el número de equivalentes ácidos añadidos, debe ser igual al número de equivalentes básicos. De acuerdo con la definición de normalidad, el número de equivalentes es la normalidad multiplicada por el volumen de la disolución en litros.

Si añadimos suficiente ácido para neutralizar un determinado volumen de base, lo podemos expresar mediante símbolos. Representado por:

N_1 = Concentración desconocida de ácido o de base que deseamos determinar.

N_2 = Concentración conocida de ácido o base valorados utilizados para determinar la normalidad de la sustancia cuya concentración se desconoce.

V_1 = Volumen de la sustancia (ácida o alcalina) de concentración desconocida al cual se le determina su normalidad.

V_2 = Volumen gastado de la sustancia (ácida o alcalina) de concentración conocida que se utilizó para lograr la neutralización de la sustancia problema y así poder determinar su normalidad mediante la siguiente fórmula.

$$N_1 \times V_2 = N_2 \times V_1$$

despejando,

$$N_1 = \frac{N_2 \times V_2}{V_1}$$

Las soluciones normales son las que se usan para valorar ácidos, bases y sales, conociendo su normalidad y sabiendo que volúmenes iguales de dos o más soluciones de la misma normalidad son equivalentes entre sí; o bien, soluciones de la misma normalidad son equivalentes volumen a volumen. Por ejemplo: 10 ml. de una solución 2N de HCl neutralizan a 10 ml. de solución 2N de NaOH y 10 ml. de cualquier base 0.5 normal (N) neutralizan 10 ml. de cualquier ácido 0.5 N.

IV.3 POTENCIOMETRIA

Un potenciómetro es un aparato que mide el potencial eléctrico que se desarrolla entre un electrodo consistente en un tubo interno de vidrio, sellado, con un extremo metálico y un tubo externo que contiene una solución estándar.

El electrodo de vidrio es el elemento del sistema que mide; al sumergir el bulbo de vidrio en la solución por investigar, se desarrolla un potencial a través de la pared de vidrio a causa de la diferencia en actividad (concentración) de iones H^+ en las soluciones interna y externa.

Este potencial es proporcional al pH de la solución y se mide en referencia a un potencial eléctrico constante provisto por otro electrodo de metal, generalmente el electrodo de Calomel ($HgCl_2$). (Fig. IV.1.)

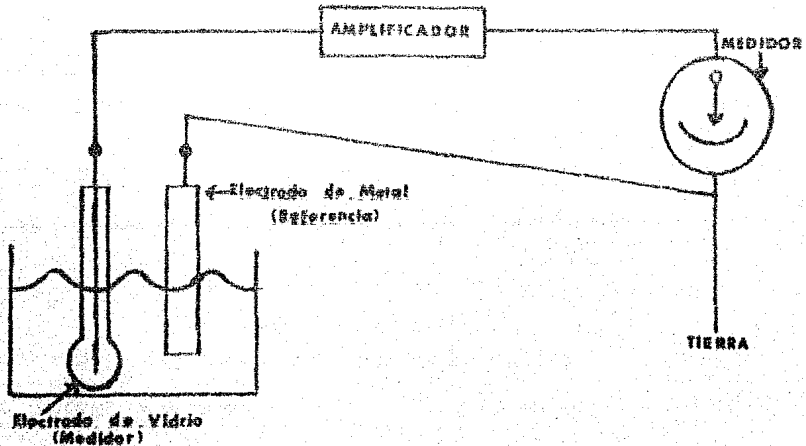


Fig.IV.1. Partes de un potenciómetro

IV.3.1. USOS DEL POTENCIOMETRO

Existen diversos modelos de potenciómetros, pero en general para usarlos adecuadamente se deben tener los siguientes cuidados:

- Calibrar el aparato usando una solución amortiguadora.
- Efectuar la medición del pH agitando la solución por investigar para prevenir errores por diferencias internas en la solución.
- Lavar los electrodos con agua destilada antes de hacer una nueva medición y si es preciso recalibrar el aparato con solución amortiguadora.

A continuación se dan las instrucciones para operar el potenciómetro Corning 610-A:

- (7)
1. Cheque la batería moviendo la perilla FUNCTION a la posición BATT CK. La aguja se moverá a la sección verde en la pantalla. Regrese la perilla a la posición OFF.
2. Lave el electrodo con un piceta, séquelo con una toalla de papel y sumérjalo en el Buffer pH 7.0.
3. Ajuste la perilla TEMPERATURE según la temperatura del Buffer y ajuste la perilla FUNCTION en posición pH.
4. Gire la perilla CALIBRATE hasta que la aguja en la pantalla marque exactamente pH 7.0.
5. Cambie la posición de la perilla NORMAL a EXPAND.
6. Gire la perilla CALIBRATE hasta que la aguja en la pantalla marque exactamente pH 7.0. Regrese la perilla de EXPAND a NORMAL y la perilla FUNCTION a OFF.
7. Retire el electrodo y lávelo con una piceta conteniendo agua bi-destilada.
8. Sumerja el electrodo en Buffer pH 4.01.
9. Repita los pasos 3,4,5 y 6 para el Buffer pH 4.01 ajustando esta vez hasta que la aguja marque pH 4.01.
10. Retire el electrodo y lávelo con agua destilada. Déjelo inmerso en agua destilada.

EL ELECTRODO ESTA CALIBRADO PARA LEER CUALQUIER pH DE 0-14.

Para leer el pH de la solución problema:

1. Introduzca el electrodo (ya calibrado) en la solución problema.
2. Coloque la perilla FUNCTION en la posición OFF.
3. Lea en la escala el valor de pH marcado por la aguja.
4. Lave el electrodo con agua destilada y sumérjalo en agua destilada para su uso posterior.

IV.4. CROMATOGRAFIA.

Este método es un tipo especial de análisis que resuelve con éxito el problema de la separación e identificación de los componentes de un grupo de sustancias químicamente parecidas o la demostración de sustancias de muy baja concentración en los líquidos biológicos.

La cromatografía forma parte del equipo habitual de casi cualquier investigador de bioquímica; su gran sencillez permite adaptarlo a los problemas de investigación química. (6)

Los fundamentos o principios básicos varían algo en función a la técnica en particular.

IV.4.1. CROMATOGRAFIA EN COLUMNA

Se llena un tubo vertical estrecho con un polvo muy fino; éste puede ser de distintas sustancias, desde yeso en polvo, (trabajo inicial de Tswett sobre clorofilas), hasta albúmina, azúcar, celulosa, gel de sílice, carbón Kieselguhr, talco y otros muchos. (El método de cromatografía debe su nombre a las distintas bandas coloreadas que obtuvo Tswett a partir de mezclas de clorofilas). El polvo representa un adsorbente que proporciona una superficie activa, frente a la cual los distintos componentes de la mezcla de sustancias tiene afinidades diferentes. Si se hace bajar una solución de la mezcla por uno de estas columnas los distintos componentes quedan adsorbidos sobre las partículas. Los componentes que se adsorben con mayor intensidad quedan en la parte superior de la columna, y los demás ocupan posiciones cada vez más inferiores, conforme disminuye su afinidad por las partículas de la columna. Si los componentes de un cierto grupo tiene color propio, forman una serie de bandas o zonas coloreadas.

Después de éste tipo de separación todos los componentes del grupo de sustancias pueden ser eluidos por separado, haciendo pasar por la columna solventes diferentes o amortiguadores de diferentes pH, o también extrayendo la columna y cortando los fragmentos que contienen las sustancias de interés. (6)

Además, es posible utilizar la columna en otra forma, basándose en el principio de repartición. Cuando una sustancia soluble en dos solventes no miscibles como el agua y cloroformo, se agita en una mezcla de dichos solventes, parte se disuelve en un solvente, y parte en el otro. Cualquiera que sea la cantidad total de la sustancia la fracción que pasa a cada solvente es constante; para ésta sustancia, respecto a un cierto par de solventes, ésta fracción se llama coeficiente de reparto. La columna de polvo puede saturarse con un miembro del par de solventes no miscibles, y la mezcla de sustancias problema se aplica a la columna disuelta en el otro miembro del par de solventes. Cuando la segunda solución (llamada fase móvil) recorre la columna, las distintas sustancias que contiene entablan una serie compleja de repartos con el otro solvente, fijado en las partículas de la columna (fase estacionaria). El resultado global de los repartos (con intervención probable de otras fuerzas físicas) es la separación de los miembros del grupo de compuestos en varias zonas de la columna. (17)

Se ha aplicado la cromatografía en columna a la separación de pigmentos, esteroides, vitaminas, hormonas y alcaloides. (10)

IV.4.2. CROMATOGRAFIA EN PAPEL.

En muchos casos el bioquímico se encuentra más interesado en buscar la presencia de una sustancia y no en medir su concentración.

La técnica en columna no se presta a la identificación rápida de los compuestos por reacciones coloreadas específicas; con éste fin; es más flexible utilizar la cromatografía en papel. (10)

La cromatografía en papel es un método en el cual se efectúa un proceso de partición basado en la separación de una mezcla de compuestos mediante el reparto existente entre una fase móvil (eluyente) y una fase estacionaria (agua) que se encuentra embebida en un soporte adecuado (celulosa). La separación de los

componentes de una mezcla depende de sus diferentes afinidades por cada una de las fases en contacto.

La sencillez de la cromatografía en papel, y el desarrollo de reacciones muy sensibles para el reconocimiento de las sustancias así separadas, permitieron su empleo, para separar e identificar azúcares, aminoácidos y sus derivados alcaloides, antibióticos, esteroides, ácidos nucleicos, porfirinas, vitaminas hidrosolubles, ácidos grasos e insecticidas. Existen diferentes tipos de técnicas de cromatografía en papel: (10)

IV.4.2.a. Cromatografía en papel ascendente. (3,6)

Este tipo de cromatografía se realiza en una cámara de vidrio cerrada herméticamente donde la atmósfera se encuentra saturada por la fase móvil. La mezcla a analizar se deposita en muy pequeña cantidad (microlitros) con un capilar, sobre un punto de partida situado en la proximidades de uno de los extremos de la hoja o tira de papel de cromatografía, que a continuación se pone en contacto con la fase móvil, es decir con el eluyente que se encuentra en el fondo de la cámara de cromatografía. Cuanto más afines en polaridad son las sustancias que constituyen la mezcla con la fase móvil, o más elevado es su R_f (factor de retardo; relación entre la distancia recorrida por la sustancia considerada y la distancia recorrida por la fase móvil) más rápidamente emigran sobre el papel, conforme la fase móvil se desplaza por capilaridad (Fig. IV.2).

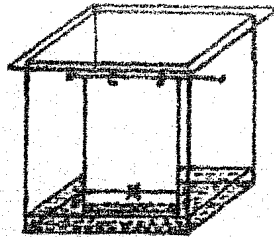


Fig. IV.2. Cromatografía ascendente

La separación de las diferentes sustancias de una mezcla se debe a que cada una posee afinidades distintas por las dos fases (móvil y estacionaria) y se reparten en cada una de ellas y se separan ya que sus coeficientes de reparto lo permiten.

Una vez que ha emigrado el eluyente hasta cerca del borde superior de la tira de papel se retira éste de la cámara y se intenta ubicar la posición de los diferentes compuestos por su coloración propia o artificial; ésta última se puede lograr utilizando reveladores como por ejemplo: la ninhidrina que tras calentamiento da manchas azul-violeta con la mayoría de aminoácidos.

Para una mejor separación de compuestos de una mezcla puede aplicarse la cromatografía bidimensional, donde la primera cromatografía lleva un eluyente (generalmente es una mezcla de varios disolventes orgánicos) y la aplicación de la muestra se efectúa en una esquina de un papel filtro cuadrado. El primer eluyente recorre el papel en cierta dirección; luego se seca el papel, se gira a 90° , y se hace pasar el segundo eluyente en una dirección perpendicular a la que siguió el primero. Escogiendo con cuidado los eluyentes, las substancias que no separan unas de otras durante el primer paso, pueden hacerlo en el segundo. Esta técnica ha resultado muy útil para el aislamiento de aminoácidos que provienen de la hidrólisis de proteínas puras, como la insulina; permitió lograr la identificación completa de los aminoácidos que constituyen dicha hormona. (10)

La siguiente figura representa el resultado obtenido en el caso de una cromatografía bidimensional en papel. (Fig. IV.3.)

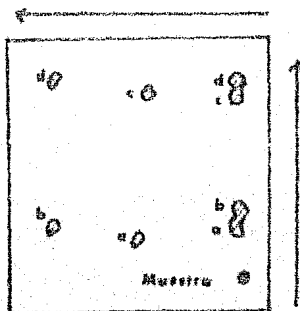


Fig.IV.3. Cromatografía bidimensional.

IV.4.2.b. Cromatografía en papel descendente (6)

En este tipo de cromatografía el eluyente baja por capilaridad y acción de la fuerza de gravedad a lo largo del papel; para lo cual se coloca una cubetilla sobre la que se inserta el papel, lo que permite que el eluyente descienda por él. (Fig. IV.4.)

IV.4.2.c. Cromatografía lateral o radial. (6)

El tipo de papel que se usa es circular y la muestra se coloca en el centro del papel, así los componentes de la mezcla se extienden en una serie de bandas circulares a partir de el origen. Al papel circular se le recorta una tira desde la orilla hacia el centro para formar un pabito. Después de aplicar la muestra en el origen se coloca el tapa de una caja de Patri invertida y el pabito se dobla de tal manera que quede sumergido en el eluyente. (Fig. IV.5)

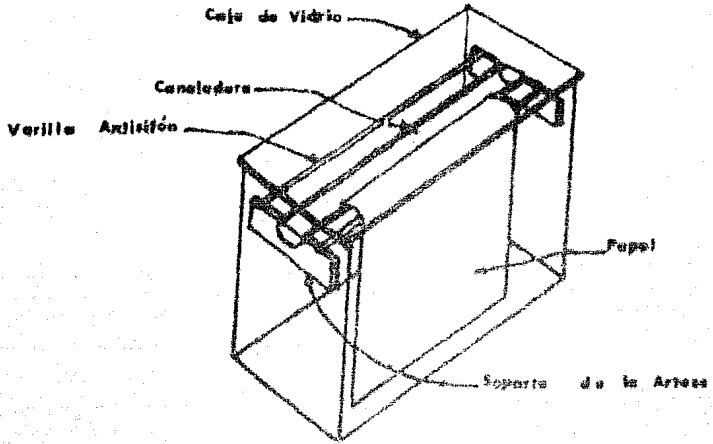


Fig. IV.4. Cromatografía descendente

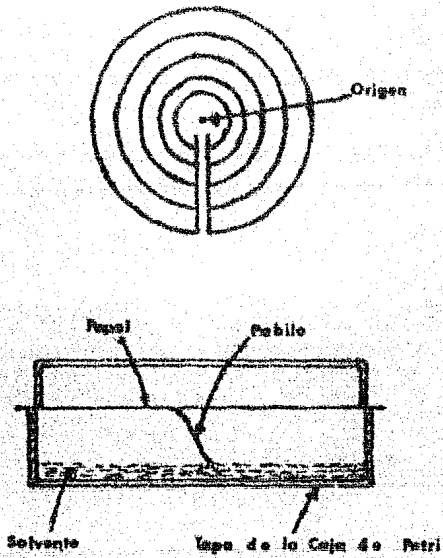


Fig. IV.5. Cromatografía lateral o radial

En cualquiera de estas técnicas conviene que el desarrollo del cromatograma dentro de la cámara (bien cerrada) se lleve a cabo en una atmósfera saturada por los vapores del eluyente para lograr el equilibrio, de otra manera el mismo se puede evaporar del papel a mayor velocidad de la que se reemplazaría por capilaridad, ocasionando una mala separación y manchas que tienden a rayar.

Una vez desarrollado el cromatograma se retira el papel de la cámara y se marca inmediatamente con lápiz el frente del eluyente y se deja secar. Como ya se hizo mención anteriormente algunos compuestos son coloridos y su localización no presenta ningún problema, pero muchos compuestos son incoloros, por lo tanto invisibles; en estos casos es necesario emplear métodos de revelado para localizar las manchas. Con el paso del tiempo las manchas coloridas del cromatograma tienden a desaparecer por lo que es conveniente trazar un círculo sobre el borde de cada mancha y marcar un punto en el centro de la misma que será la referencia para los cálculos de la distancia recorrida por un compuesto. (3,6)

Un dato característico de cada compuesto es el factor de retardo o retención (R_f) que se calcula como sigue:

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por un compuesto}}{\text{Distancia recorrida por el frente del eluyente}}$$

Tomando las medidas desde el origen en que se aplicó la muestra. Es importante hacer la observación que el R_f nunca podrá ser mayor que la unidad. En la práctica el valor de R_f no suele ser tan constante que permita una identificación segura por lo que es recomendable emplear la comparación con sustancias puras llamadas testigo o patrón pudiéndose entonces calcular el R_x como sigue:

$$R_x = \frac{\text{Distancia recorrida por un compuesto desde el origen}}{\text{Distancia recorrida por el compuesto patrón}}$$

Si el R_x es igual a la unidad, podemos estar seguros que se trata efectivamente del mismo compuesto.

Algunas desventajas de esta cromatografía, como la baja velocidad del desplazamiento del solvente, las diferencias de calidad y características del papel, las limitaciones inherentes a los reactivos que pueden emplearse para la identificación, y la falta de un control preciso sobre las capacidades de separación del medio de soporte, desaparecen con el uso de la cromatografía en capa fina. (10).

Es conveniente saber elegir el tipo de papel y el eluyente a usar para una cromatografía en papel, para esto consultar apéndices B-12, B-13.

IV.4.3. CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA. (15,17)

Se utiliza un soporte inerte, generalmente de sílice, cuyas propiedades de adsorción pueden regularse hasta cierto punto, y se acelera la separación extendiendo dicho soporte en una capa de pequeño espesor (0.25 mm.) sobre una capa de vidrio o una hoja de plástico. En esta capa delgada los solventes se desplazan rápida y homogéneamente, la dispersión de la "mancha" puede regularse, y es posible aplicar reactivos de identificación a base de ácidos y bases fuertes. (Consultar apéndice B-14)

Para preparar la gel sílice se disuelven 30 gramos del producto comercial con 60 mililitros de agua destilada (75 ml. metanol) en un mortero y batiendo continuamente durante un minuto. Alternativamente se puede usar un matraz agitando vigorosamente durante el mismo tiempo. La mezcla después de aplicación al gel de sílice, la capa delgada se adhiera firmemente a la base de vidrio o de plástico. En algunos sistemas, se incluye un indicador fluorescente en la capa delgada, lo que permite localizar la sustancias después de su separación pues aparecen como manchas oscuras cuando se ilumina la placa con luz ultravioleta de pequeña longitud de onda. Este método utilizado para conocer a que grupo pertenecen los barbitúricos, tiene la ventaja adicional de que las sustancias no son modificadas, y pueden ser recolectadas por elusión del cromatograma con vistas a realizar más pruebas. Otra variante consiste en incorporar el adsorbente a una base de fibra de vidrio parecida al papel, pero con calidades cromatográficas semejantes a la placa en capa fina, por ejemplo: derivados de la celulosa como fosfato de celulosa, la carboximetilcelulosa, la dietilamino celulosa (DEAE - Celulosa), etc.

Empleando compuestos marcados por incorporación a sus moléculas de un isótopo radioactivo, la identificación y localización pueden hacerse con un contador para radiación; es todavía más sencillo colocar el cromatograma sobre un trozo de película fotográfica o de rayos X, donde se observa la situación de las sustancias radioactivas como zonas oscuras después del revelado. Esta técnica en la cual la sustancia, "toma su propia foto" se llama autoradiografía.

También se ha podido combinar la cromatografía con la electroforesis; después de separar las sustancias por cromatografía en una dirección, por ejemplo en una placa de capa fina, se realiza una electroforesis en la placa, a ángulo recto con el primer estudio, para lograr una mejor separación de los compuestos.

IV.4.4. CROMATOGRAFIA DE GASES (19)

Es una técnica particular de cromatografía que consiste en arrastrar los productos volátiles, por ejemplo ésteres metílicos de los ácidos grasos, derivados volátiles de los aminoácidos o de azúcares. En la cromatografía de gases, la mezcla problema bajo forma de vapor, se pone en contacto íntimo con un solvente situado en un lecho granuloso, poroso e inerte. El movimiento necesario se logra por un chorro de gas inerte, como portador del vapor, por ejemplo, se pueden vaporizar por calor mezclas de hidrocarburos, que se mezclan luego con un gran volumen de nitrógeno, hidrógeno o helio y se mandan a un tubo helicoidal o en forma de U que tiene un tabique refractario en polvo, tratado previamente con escualeno o grasa apieson. Tras complicadas reacciones de intercambio entre las fases gaseosa y líquida, las distintas fracciones de la mezcla inicial permanecen en el tubo por tiempos diferentes. El gas portador que sale del tubo en espiral pasa por un detector, que produce una señal eléctrica en respuesta. Estas señales se registran en un graficador que muestra una serie de máximos correspondiendo cada uno a una fracción de hidrocarburo puro, y cuya superficies son proporcionales a las cantidades presentes. (Fig. IV.6.)

El sistema es muy sensible, y permite identificar cantidades del orden de un microgramo; puede distinguir incluso entre varios isómeros, este método se ha aplicado en los análisis clínicos, a la separación y medición de esteroides, barbitúricos y lípidos. La desventaja del método es que habrá que esperar a que los aparatos sean más baratos probablemente de funcionamiento automático.

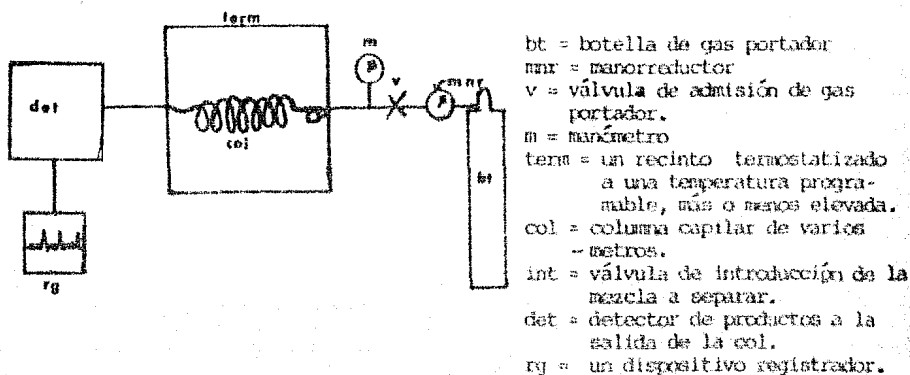


Fig. IV.6. Cromatografía de gases

IV.4.5. CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO (19)

Esta es una técnica que permite valoraciones cuantitativas con un margen de error del $\pm 3\%$. Consiste esencialmente en una filtración de la mezcla a analizar a través de una resina de poliestireno y de divinilbenceno. A un pH ácido en relación a su pI (punto isoeléctrico) los aminoácidos se encuentran en forma catiónica y se unen a los grupos $[-SO_3^-]$; cuanto más básicos son, más fuertemente se unen. Por aumento del pH y de la fuerza iónica de las soluciones amortiguadoras que pasan a través de la columna, la carga positiva de los aminoácidos se neutraliza progresivamente y se rompe su enlace con los grupo sulfónicos. Los aminoácidos eluidos de la columna en función de su acidez, se recuperan separados en el eluyente. (Fig. IV.7.) (Consultar apéndice B 15)

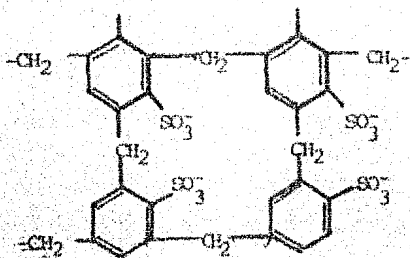


Fig. IV.7. Ejemplo de resina sulfónica

IV.4.6. CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION-DIFUSION (19)

Un método moderno muy utilizado, permite separar compuestos (como proteínas) en función de su peso molecular, es la filtración en columna de gel. Las moléculas se reparten por difusión entre dos fases acuosas, interior y exterior a los granos del gel. Quanto más grandes son, más difícil les resulta penetrar en la fase interior y más rápidamente filtran a través de la columna. En el límite, su tamaño es suficientemente grande como para que no puedan penetrar en esta fase interior y se dicen que son "excluidas".

El peso molecular de las moléculas excluidas depende del grado de reticulación del gel utilizado. Este es un método comparativo que necesita un calibrado previo con moléculas de peso molecular conocido.

Se venden dos tipos de gel: un gel de dextrano (Sephadex) y un gel de acrilamida (Biogel). Esta técnica que se basa únicamente en las diferencias de los pesos moleculares, permite separar con una fuerza iónica y un pH constantes, condiciones más que favorables para mantener la estabilidad de los compuestos estudiados. (Fig. IV.7).

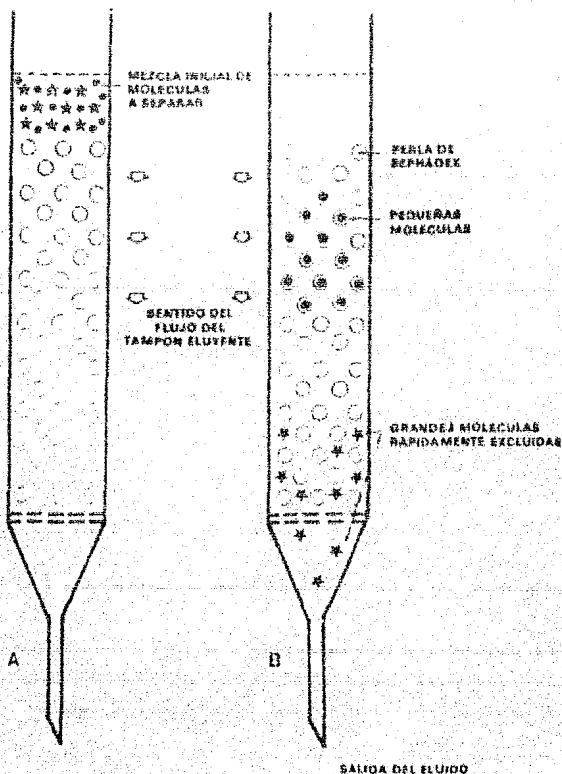


Fig. IV.7. Principio de la cromatografía de exclusión-difusión

IV.5 ELECTROFORESIS

Una partícula coloidal o un ion, provistos de carga eléctrica, emigran hacia el ánodo o el cátodo bajo la influencia de un campo eléctrico externo. Si las distintas partículas tienen diferentes velocidades de desplazamiento, puede aprovecharse esta propiedad para separar las distintas clases. El empleo de fuerzas eléctricas para lograr esta separación se llama electroforesis. Este principio se ha aplicado ampliamente a la separación de proteínas, pero también permite estudiar péptidos, ácidos orgánicos, aminoácidos, nucleótidos, ácidos fenólicos, inóles y porfirinas. Las distintas aplicaciones del principio de la electroforesis difieren principalmente por el medio en cual transcurrir la migración. A continuación se describen las principales variantes. (10)

IV.5.1 ELECTROFORESIS EN MEDIO LÍQUIDO

Este es el medio clásico de Tiselius, en el cual las proteínas en solución coloidal se depositan encima de medio amortiguador conductor, en un tubo en U. Luego, la amplitud y dirección del desplazamiento debido al voltaje que se aplica pueden seguirse por medios ópticos basados en cambios de índices de refracción del líquido. La técnica es difícil, y el método sólo puede emplearse en laboratorios de investigación. (10)

IV.5.2. ELECTROFORESIS EN GEL. (3,5)

La muestra de proteínas se coloca en un canal o pozo que se corta o se ajusta, con una capa delgada de gel (agar, almidón, agarosa o acrilamida); luego se aplica el voltaje deseado. La velocidad de migración depende del gel; en el almidón se necesitan de 16 a 20 horas para una buena separación; en el agar de 30 a 90 minutos, y en la acrilamida 30 minutos. La concentración del amortiguador para la preparación del gel es de gran importancia. Aumentando el voltaje, la separación es más rápida, pero si se pasa de 250 volts se presentan problemas de sobrecalentamiento. Para cada técnica, hay que estudiar mejor la solución intermedia, tomando en cuenta el espesor del gel, la concentración del amortiguador, el voltaje aplicado y el volumen de la muestra.

Después de la electroforesis, las fracciones proteínicas se localizan por tinción, con colorantes muy afines a las proteínas, como por ejemplo, el negro amido y el ponceau S; cuando se requiere una sensibilidad alta, se emplea la nigrosina. El gel puede secarse hasta formar una película delgada sobre un soporte transparente; luego se mide la cantidad de las distintas fracciones teñidas haciendo pasar la placa frente a una fuente de luz. Se desplaza el gel teñido, a velocidad constante, entre una hendidura que recibe una luz intensa y una fotocelda. Cuando las regiones intensamente teñidas donde se encuentran las proteínas pasan frente a la hendidura, el voltaje producido por la fotocelda varía proporcionalmente a la intensidad de la coloración, o sea a la cantidad de proteínas. La fotocelda puede conectarse al graficador que se desee. En uno de estos sistemas, se elimina la necesidad de secado y tinción, iluminando el gel que contiene la fracción proteínica con un haz de luz ultravioleta de 280 m μ (para esta longitud de onda, la absorción proteínica es intensa). También es posible el estudio cuantitativo de las distintas fracciones teñidas por elución del colorante, y medición de la absorbancia de los líquidos de elución en el espectrofotómetro.

En algunos geles (almidón y acrilamida) además del efecto separador de las fuerzas eléctricas, existe un efecto "de tamiz" a nivel molecular, pues un gel bien preparado sólo tiene poros muy pequeños. La consecuencia es una mayor discriminación de los grupos de proteínas; el suero puede dar hasta 30 fracciones diferentes, algunas de las cuales corresponden a proteínas únicas homogéneas.

Otra aplicación especial de la electroforesis en gel es la separación de las isoenzimas. Por ejemplo, se pueden separar por electroforesis las deshidrogenasa lácticas que provienen de distintos tejidos (miocardio, hígado y músculo) luego se localizan por reacciones basadas en su interacción con un tetrazolio especial, y sistemas de NAD, o la fluorescencia que producen bajo la luz ultravioleta.

También se emplea la electroforesis en agar o gel de almidón para el difícil problema que constituye la separación de las hemoglobinas. Las mejores separaciones se logran con gel de acrilamida, pero como esta sustancia es muy tóxica, sólo puede aconsejarse su empleo a técnicos de gran experiencia. La separación en agar o almidón, con distintos valores de pH, permite establecer la presencia de hemoglobinas anormales, o concentraciones anormales de un pigmento normal, como la HbA₂; para la identificación completa, se requieren técnicas muy especializadas, como estudio de la composición de ácidos aminados de las cadenas de péptidos, y cromatografía en resinas de intercambio iónico.

La electroforesis en gel de agar es la primera etapa de un método muy sensible para la investigación de proteínas, la inmunoelectroforesis.

Desde el punto de vista práctico, el empleo de geles en electroforesis requiere cierta habilidad y experiencia técnica. La aparición en el comercio de agar de gran pureza resolvió el principal problema planteado por esta sustancia. Sin embargo, con los geles de almidón, la preparación inicial de la solución de almidón todavía es bastante difícil.

La electroforesis en gel de almidón suministra principalmente información cualitativa, aunque ciertos aparatos de identificación pueden recibir accesorios especiales para lectura de geles e integración de estas lecturas. Como ejemplo, la electroforesis en gel de almidón permitió descubrir que las proteínas plasmáticas que fijan hemoglobina o heptoglobinas, se presentan en varias formas, por determinación genética; existen cinco tipos básicos: Hp 2-1, Hp 2-2, Hp 1-1, y Hp 0 (Hsia 1966). Los cuatro primeros grupos pueden dividirse en nueve subgrupos en total, tratando las muestras con urea y mercapto etanol. Algunos de estos tipos pueden presentar hasta 10 componentes y sólo es posible separarlos merced a la gran capacidad de discriminación de la electroforesis en gel de almidón. Esta técnica también se utiliza para separar las distintas hemoglobinas, aunque en este caso puede resultar más cómodo el gel en agar.

IV.5.3 ELECTROFORESIS EN PAPEL (3,10)

Las proteínas se aplican en una tira estrecha de papel filtro, humedecida con un amortiguador conveniente, y que se instala como puente eléctrico entre el ánodo y cátodo a través de un sistema de corriente continua.

Después de aplicar un voltaje constante (vecino de 120 voltios) o una corriente del orden de 2,5 miliamperios para ocho tiras durante unas 18 horas, las tiras de papel se secan y se tiñen con algún colorante (azul de bromofenol, negro amido, Ponceau S o verde lisamina). El exceso de colorante se quita con ácido acético diluido, y se investiga la cantidad de proteínas en las fracciones obtenidas, midiendo su absorción luminosa, directamente o tras elución. Cuando se emplea papel como medio de soporte, suelen obtenerse cinco fracciones con amortiguador veronal de pH 8.6; albúmina, globulina alfa 1, globulina alfa 2, y globulinas beta y gamma. Pueden obtenerse más fracciones empleando otros sistemas amortiguadores, pero su significado clínico práctico todavía no está claro. Este método utiliza un tanque tipo Durrum, en el cual las tiras de papel se disponen en forma de V invertida; ha sido el sistema más utilizado en química clínica ordinaria; pero lo están sustituyendo métodos basados en los principios descritos antes, salvo en unos cuantos casos, como la diferenciación entre lipemias exo y endógenas. (Lees y col., 1965).

IV. 5.3.a. Electroforesis en acetato de celulosa.

El papel tiene ciertos inconvenientes como medio de soporte; estructura irregular, calidad variable, y formación de "colas" en las fracciones proteínicas (esto se debe a que las proteínas no emigran como fracción compacta con lo cual se producen imágenes difusas, y se tiñen las zonas entre las distintas fracciones); estos problemas se resuelven utilizando un papel sintético, homogéneo, sin fibras, de acetato de celulosa. (13). El sistema puede emplearse para separar hemoglobinas e isoenzimas, y puede adaptarse también a algunos métodos de inmunoelectroforesis (13).

Existe una variante del acetato de celulosa, que aprovecha una forma especial gelificada del material, conservando todavía una coherencia suficiente para mantenerse en forma de cinta. Las ventajas son la nitidez y claridad de las separaciones, y una mayor transparencia. Se han utilizado otros materiales de soporte (espuma de caucho y papel de fibra de vidrio pero en menor escala.

Actualmente la electroforesis en acetato de celulosa reemplaza con ventajas a la electroforesis en papel. Se obtiene mejor resolución de las fracciones en tiempos de migración más cortos (60 minutos). El revelado de las fracciones se hace generalmente por el rojo Ponceau y la valoración planimétrica de las coloraciones da unos resultados muy similares en términos generales a los obtenidos mediante electroforesis en vena líquida.

IV.5.3.b. Electroforesis en vena líquida o electroforesis de frontera.

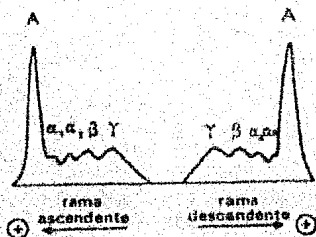
Los primeros ensayos de electroforesis fueron efectuados en solución en un tubo en U de sección cilíndrica; el poder resolutivo de tal sistema era modesto y era muy difícil de definir dónde acababa uno de los constituyentes y dónde comenzaba el siguiente. Tiselius resolvió este problema mediante su célula de sección rectangular, sumergida en un baño refrigerante regulado a + 4°C, temperatura de máxima densidad del agua. El calor producido por efecto Joule se disipa fácilmente gracias al pequeño espesor de la célula; se eliminan así las corrientes de convección.

Por otra parte, la célula está constituida por secciones que deslizan horizontalmente las unas respecto a las otras sobre las placas de vidrio lubricadas por una grasa químicamente neutra. Se puede obtener así fronteras estrechas entre el solvente (tampon) que rellena una rama de la célula y la solución de p proteína en el tampon que rellena el forro y la otra rama de la célula.

Cuando se establece un campo eléctrico continuo, las moléculas proteicas se des plazan con velocidades diferentes en las dos ramas de la célula, haciendo así aparecer diferencias en la concentración de proteínas. Un sistema óptico determina las variaciones del índice de refracción existentes entre dos regiones de una rama de la célula, localizando estas "fronteras" y permitiendo registrar un diagrama electroforético. Estas fronteras se desplazan cada una a una velocidad constante: la movilidad electroforética.

A modo de ejemplo en el siguiente esquema se presenta un diagrama electroforético del suero de humano normal. Se efectúa la electroforesis en tampon veronal sódico a pH 8.6, pH al cual todas las proteínas séricas están cargadas negativamente, es decir, migran hacia el ánodo. Cada pico corresponde a una fracción proteica caracterizada por su movilidad electroforética. Gracias a éste aparato Tiselius pudo demostrar la heterogeneidad de las globulinas del suero y establecer su clasificación fundamental en globulinas alfa 1, 2, beta y gamma. (A) representa la albúmina. Hay que destacar que los diagramas correspondientes a las ramas ascendente y descendente no son absolutamente idénticos.

En una mezcla así, la proporción de los diversos constituyentes puede determinar, si poseen velocidades de migración diferentes, por electroforesis en vena líquida. En el diagrama electroforético, la superficie de cada pico es proporcional a la concentración relativa del correspondiente constituyente proteico.



Esquema electroforético de las proteínas del suero sanguíneo.

IV.5.3.c. Electroforesis de alto voltaje.

Todavía se utiliza frecuentemente el papel en la electroforesis de alto voltaje (el campo eléctrico es superior a 20 voltios por centímetro. Esta técnica necesita un sistema de refrigeración enérgico. Se aplica, asociada a una cromatografía en una dirección perpendicular, al análisis de los aminoácidos y sobre todo de los péptidos que resultan de la hidrólisis triptica de las proteínas. Se obtiene así un mapa de los péptidos (finger-print) característico de cada proteína.

IV.5.3.d. Electroforesis en gel de almidón.

Es la técnica de Smithies. Combina dos posibilidades:

- La separación electroforética según la carga de las proteínas; pero el fenómeno de electroósmosis es importante, de manera que las gamma globulinas migran en sentido contrario.
- El tamizado molecular, puesto que el tamaño de las mallas del gel retarda la emigración de las proteínas de peso molecular elevado (peso molecular superior a unos 50 000).

En estas condiciones el fraccionamiento de las proteínas séricas es mucho más preciso. Gracias a ésta técnica, ha sido posible poner en evidencia unas fracciones proteínicas poco importantes desde el punto de vista cuantitativo, pero de gran interés biológico: orosomucoide, ceruloplasmina, heptaglobulina, alfa-2-macroglobulina, etc.

IV. 5.3.e. Electroforesis en gel de poliacrilamida.

Es una técnica reciente, simple y muy resolutiva. Se realiza en pequeños tubos cilíndricos rellenos de un gel transparente. Las bandas obtenidas tras la electroforesis son muy finas y se detectan así numerosas variedades moleculares.

El aparato es de plexiglás transparente. Se rellena de un líquido tampón adecuado y se aplica a los bordes una tensión de 300 voltios. Tras electroforesis, las proteínas separadas se sacan del aparato y se analizan por método óptico, o cortado en rodajas finas, etc.

IV.5.4. Inmunolectroforesis.

Es una combinación de la electroforesis en gel de agar con la reacción de precipitación específica antígeno-anticuerpo debida a Grabar y Williams. El principio es el siguiente:

- En un primer paso, se realiza una electroforesis en medio gelificado, a pH 8,2, sobre una placa recubierta de un gel de agar. El fenómeno de electroósmosis es importante, de manera que ciertas proteínas (por ejemplo las gammaglobulinas) migran en sentido inverso a las otras.
- En un segundo paso, se deposita en un canal central, excavado paralelamente al sentido de la migración, un inmunosero anti proteínas humanas; se deja difundir durante 24 horas. Entonces se observan arcos de precipitación muy netos, que corresponden cada uno de ellos a una fracción proteica particular; se obtienen así, a partir del suero sanguíneo, por lo menos 25 arcos de precipitación.

La interpretación de este fenómeno es la siguiente: la migración correspondiente al primer paso separa parcialmente las proteínas. El suero antiproteínas humanas puesto en el canal se prepara a partir de animales a los cuales se inyecta la mezcla de proteínas séricas (suero equino polivalente) o una proteína particular (suero de conejo monovalente) : los animales sometidos a éstos antígenos, fabrican anticuerpos específicos. Estos, posteriormente puestos en contacto con el mismo antígeno que ha emigrado por electroforesis en gel, darán tras difusión un arco local de precipitación.

Es una técnica muy buena para la detección de proteínas anormales, o por el contrario para la detección del déficit de una clase de proteína particular. Da también un fraccionamiento preciso del grupo de las gammaglobulinas, de importancia fundamental en los estudios clínicos.

IV.6. COLORIMETRÍA Y ESPECTROFOTOMETRÍA. (10).

La base de la colorimetría y la espectrofotometría es que muchas sustancias tienen color propio o pueden dar lugar a productos finales coloreados en ciertas reacciones químicas. Hay una relación entre la intensidad de éste color y la concentración del producto final o sea la concentración de uno o varios de los reactivos; de ésta manera la intensidad del color puede utilizarse para medir la concentración. Existen muchos instrumentos para la medición del color; pero antes de hablar de su funcionamiento y manejo es preciso conocer las leyes físicas sobre las cuales se basan.

IV.6.1. LUZ.

La luz es una variedad de energía radiante que forma parte del espectro electromagnético. (Cuadro IV.1). Como toda las radiaciones de ésta espectro, tiene una velocidad de 3×10^{10} cm/seg aproximadamente, y se propaga en línea recta en todas direcciones desde su fuente de origen.

IV.6.2. SOLUCIONES COLOREADAS.

Algunas soluciones tienen color, porque absorben la luz de cierta longitud de onda, y dejan pasar las de otras longitudes de onda, por onda, por ejemplo, un solución de sulfato de cobre es azul porque al incidir la radiación luminosa en las moléculas de dicha sal, se absorbe la porción del espectro que corresponde a los diferentes colores, exceptuando la combinación que produce la sensación del color azul. Una solución roja debe su color, a que transmite el color cuya longitud de onda se encuentra entre 650 y 750 m μ , en tanto que absorbe la luz de longitud de onda más cortas. Las sustancias incoloras (solución de cloruro de sodio) no absorben la energía luminosa pues ésta es reflejada completamente aunque pueden absorber en el infrarrojo o el ultravioleta.

IV.6.3. LEY DE LAMBERT Y BEER.

La ley de Lambert-Beer, relaciona la cantidad de luz absorbida con la concentración del componente coloreado. "En condiciones adecuadas, la cantidad de luz absorbida por una solución coloreada, cuando se ilumina con luz de longitud de onda conveniente, es directamente proporcional a la concentración del componente coloreado; $A = abc$, donde A es igual a absorción específica, b igual longitud del trayecto luminoso, $c = a$ concentración del componente coloreado".

Nombre	Límites aproximados de longitud de onda	
Rayos gamma	Inferior a 10^{-1}	mμ
Rayos X	10^{-1} - 1.0	mμ
Ultravioletas	1.0 - 400	mμ
Luz visible	400 - 800	mμ
Infrarrojos	0.8 - 300	μ
Microondas	0.03 - 100	cm
Ondas de radio	1.0 - 1 000	m
Ondas del sistema de distribución de C.A.	Superior a 1 000	m

Quadro IV.1. Espectro Electromagnético

IV.6.3.a. Absorción Específica.

Es una característica constante de un sistema particular soluto-solvente para una cierta longitud de onda puede desecharse en una medición dada cuando se compara el problema con un patrón.

IV.6.3.b. Longitud del Trayecto Luminoso.

Depende del tamaño del tubo o de la cubeta que se utiliza; si se emplea el mismo tubo o la misma cubeta para todas las mediciones, se puede descartar este factor también, en estas condiciones, la ley Lambert-Beer se escribe $A \propto c$ (absorbancia proporcional a concentración).

IV.6.3.c. Absorbancia.

La absorbancia puede definirse como el logaritmo negativo de la transmitancia o el logaritmo del recíproco de la transmitancia.

$$A = -\log T \quad \text{ó} \quad A = \log 1/T$$

IV.6.3.d. Transmitancia

La transmitancia puede definirse como la relación entre la luz transmitida P (luz que sale de la solución) y la luz incidente P_0 (luz que entra en la solución). En otras palabras, $T = P/P_0$.

IV.6.3.e. Transmitancia por 100

Las escalas de ciertos instrumentos están graduadas en unidades de transmitancia por 100 ($T \times 100$), lo que corresponde simplemente a unidades de transmitancia multiplicadas por 100. Cuando se hacen mediciones en unidades de transmitancia por 100, se debe emplear papel semilogarítmico, poniendo las unidades de T por 100 en el eje logarítmico y las concentración patrón en el eje aritmético.

También se puede transformar las unidades de transmitancia por 100 en unidades de absorbancia, de las siguiente manera, pasando luego los resultados en una gráfica en papel milimétrico.

Para transformar $T \times 100$ en absorbancia:

$$\begin{aligned} A &= \log 1/T, \text{ de donde} \\ A &= \log 100/T \text{ por } 100 \\ \text{ó } A &= \log 100 - \log T \text{ por } 100 \end{aligned}$$

Por ejemplo:

$$\begin{aligned} T \text{ por } 100 &= 20 \\ A &= \log 100 - \log 20 \\ A &= 2.0000 - 1.3010 = 0.699 \end{aligned}$$

IV.6.4. ESPECTROFOTOMETROS PARA LUZ ULTRAVIOLETA Y VISIBLE. (10)

Todos los instrumentos para medir absorbancia poseen los mismo componentes de base: Fuente de luz, dispositivo para monocromía, soporte para las muestras, control de sensibilidad, detectores fotosensibles, control de corriente sin luz, y aparatos de medición.

IV.6.4.a. Fuente de luz.

Cuando se trabaja con luz visible y ultravioletas largos, se emplea un foco con filamento de tungsteno. Habitualmente, se trata de una lámpara de bajo voltaje, que recibe corriente de un transformador de voltaje constante o de una batería. En la gama de los ultravioletas, se necesita una lámpara de descarga en atmósfera de hidrógeno.

IV.6.4.b. Dispositivo de monocromía.

En los medidores de absorción por filtro, de bajo costo, suelen emplearse filtros de luz, de vidrio coloreado, o de gelatina coloreada con sustancias adecuadas, entre dos placas de vidrio, los filtros de vidrio o gelatina coloreada transmiten la luz entre límites bastante amplios de longitudes de onda, y no pueden utilizarse cuando se requiere trabajar con longitudes de ondas más precisas. Existen filtros de interferencia cuya anchura de banda es de 20 m μ .

Algunos espectrofotómetros emplean rejillas de difracción. Con los adelantos recientes de los métodos de fabricación, estos artefactos son probablemente tan buenos como los prismas en general. La anchura de banda de los instrumentos que emplean rejillas suele ser del orden de 20 m μ .

Los prismas de vidrio, satisfactorios para luz visible, no pueden usarse para la luz ultravioleta, pues el vidrio absorbe casi todas estas radiaciones.

En los instrumentos de mayor costo, suele trabajarse con prismas de cuarzo que transmite con la misma eficacia el rango de los ultravioletas y en visible.

IV.6.4.c. Portamuestras.

Los portamuestras pueden ser tubos de ensayo redondos o cubetas de paredes planas. En los colorímetros y espectrofotómetros más baratos, de filtro, se emplea generalmente tubos redondos por su menor costo. Los aparatos más caros utilizan cubetas que pueden fabricarse con más precisión que los tubos, permitiendo resultados más exactos. Con ultravioletas, se necesitan cubetas de cuarzo.

IV.6.4.d. Control de sensibilidad.

A menudo se utiliza una hendidura variable o un diafragma iris para modificar la cantidad de luz que llega al elemento foto sensible. También puede ponerse en el circuito del galvanómetro una resistencia variable, que permite modificar la sensibilidad del instrumento.

IV.6.4.e. Detectores fotosensibles.

e.1. Fotoceldas de capa interpuesta. La célula fotosensible de capa interpuesta está formada por una placa metálica sobre la cual se deposita un semiconductor, como selenio u óxido cuproso. Luego, esta capa se cubre de una película transparente de otro metal, generalmente plata. Cuando llega luz a la capa semiconductor, se produce una diferencia de potencial entre la placa metálica posterior y la película metálica superficial, con polaridad aquella positiva respecto a ésta. El voltaje que produce la célula de capa interpuesta es proporcional a la cantidad de luz que le llega, y puede medirse directamente con un galvanómetro o un miliamperímetro en un circuito de baja resistencia.

e.2. Tubos fotoemisores. El tubo fotoemisor comprende una hoja metálica cubierta de una sustancia que pierde electrones bajo la influencia de la luz, y de un ánodo, que es un alambre situado por delante de cátodo, cerca de su centro. Los electrodos se encuentran en un recinto de vidrio de cuarzo, en el vacío o en atmósfera de gas inerte a baja presión. El ánodo posee un potencial positivo; cuando llega luz a la superficie fotosensible, los electrones liberados son atraídos por el ánodo positivo y aparece una corriente en el circuito. El voltaje que produce el tubo fotoemisor es proporcional a la cantidad de luz que llega a la superficie productora de electrones.

e.3. Tubos fotomultiplicadores. Los tubos fotomultiplicadores son semejantes a los fotoemisores, pero en lugar de un solo elemento fotoemisor tienen varios. La luz que llega a la superficie fotosensible primaria libera electrones, que llegan a una segunda superficie fotosensible, liberando más electrones. Pueden lograrse amplificaciones de muchas miles de veces, en función del número de elementos fotoemisores en el tubo.

IV.6.4.f. Control de corriente sin luz.

En los instrumentos que utilizan tubos fotoemisores, se encuentra un control de corriente "sin luz"; es una resistencia variable que permite corregir el voltaje del tubo cuando no llega ninguna luz al elemento fotosensible.

IV.6.4.g. Aparatos de medición.

En muchos instrumentos, se utilizan galvanómetros o miliamperímetros de lectura directa, calibrados en unidades de absorhancia o de transmitancia por 100. En otros, existe un sistema de punto cero, que utiliza un potenciómetro calibrado en absorhancia o en transmitancia por 100.

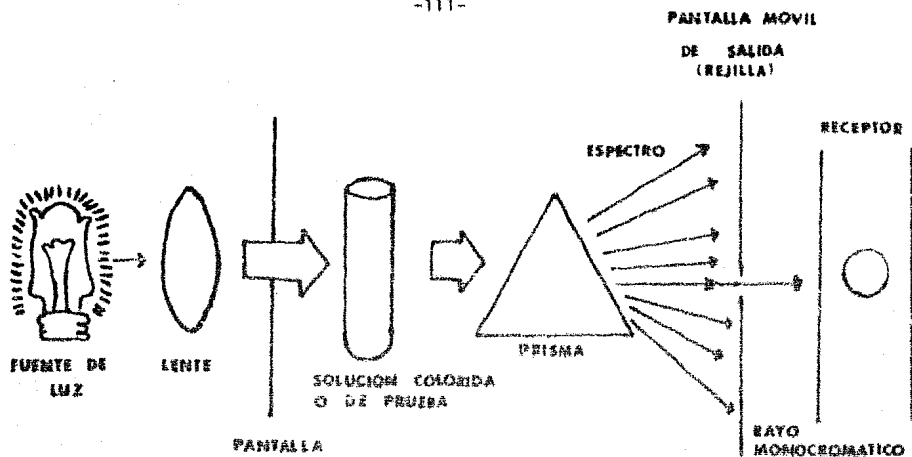


Fig. IV.8. Componentes bases de un espectrofotómetro

IV.6.5. INSTRUCCIONES PARA EL MANEJO DEL ESPECTROFOTOMETRO SPECTRONIC 20. (Fig. IV.9)

1. Instale los adaptadores que requiera y prepare sus tubos con las muestras (según los requerimientos del experimento).
2. Seleccione el fototubo.
3. Prenda el aparato por 10 minutos (perilla No. 2), se enciende el foco con el número 5 en el esquema.

Para la medición de la muestra:

1. Seleccione la longitud de onda (perilla No. 1).
2. Ajuste a cero en la escala con la perilla No. 2, teniendo vacío el compartimento para la muestra y con la tapa cubriendo (No. 4).
3. Inserte el blanco de reactivo en (4) y ajuste con la perilla No. 3 a 100% T en la escala.
4. Retire el blanco de reactivo e inserte la muestra problema. Tome la lecturas en % de T ó Absorbancia.

Indicaciones.

1. Todas las soluciones por medir deben estar libres de burbujas.
2. Todos los tubos con las muestras deben contener un volumen que cuando menos llegue a la mitad.

IV.6.6. FOTOCOLIMETRIA (9)

Los fotómetros constan en esencia de las siguientes partes (Fig. IV.10).

1. Una fuente luminosa (F) que es variable, según la zona del espectro que deseé utilizares: Lámpara de hidrógeno, de mercurio, tungsteno, halógeno, etc.
2. Un dispositivo colimador (C) para alinear los rayos luminosos, que se emiten en todas direcciones a partir del material incandescente, y puede ser un espejo curvo, una lente o ambos, formando un haz de rayos paralelos.

3. Un selector de longitud de onda, para eliminar del haz de luz las radiaciones de longitud de onda que no interesen y obtener así un haz de luz monocromática. Puede ser un filtro (M) de los colores siguientes:
 - 3a. Azul (absorbe en rango de 400 a 465 nanómetros (nm) se usa para medir soluciones rojas, naranjas, amarillas, verdes, azules y turbias.
 - 3b. Verde (absorbe en rango de 500-570 nm). Se utiliza para medir soluciones rojas, amarillas, púrpuras, naranjas y azules.
 - 3c. Rojo (absorbe en rango 640-700 nm). Utilizado para medir soluciones de color azul, verde y amarillo.
4. Una "cubeta", es un recipiente (Cu) que absorbe una cantidad de luz conocida y constante, en la cual se coloca las soluciones blanco, o problema.
5. Una fotocelda (Fc) que transforma, por efecto fotoeléctrico, la energía luminosa en energía eléctrica.
6. Un potenciómetro (P), para medir la corriente generada en la fotocelda, con escala graduada en unidades de lectura conveniente, ya sea de densidad óptica (D.O.), transmitancia (T) ó unidades klett (U.K.).

El instrumento que se utiliza con más frecuencia en el laboratorio es un fotocolorímetro Klett-Summerson de filtro con doble celda y escala graduada en unidades klett que es una escala logarítmica directamente proporcional a la concentración de la sustancia que absorbe luz colocada en la "cubeta" o tubo klett y que equivale a la densidad óptica multiplicada por 500:

$$U.K. = D.O. \times 500 \quad \text{o bien,} \quad D.O. = \frac{U. \text{ Klett}}{500}$$

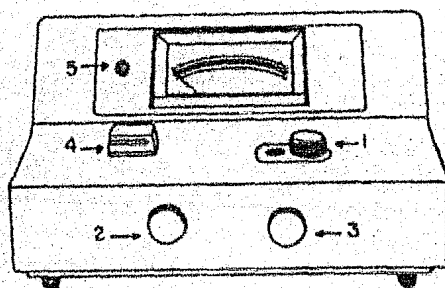


Fig.IV..9. Espectrofotómetro SPECIRONIC 20

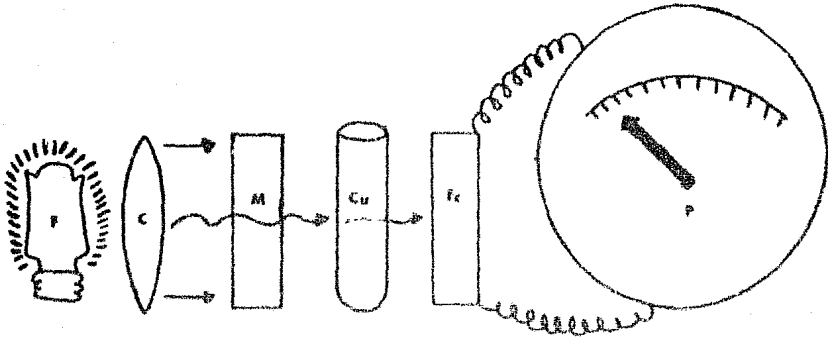


Fig. IV.10. Partes fundamentales del Fotómetro

IV.6.7. INSTRUCCIONES PARA EL MANEJO DEL FOTOCOLORÍMETRO KLETT-SUMMERSON

1. Antes de encender el fotocolorímetro, cerciórese que el filtro (F) esté en su sitio. La luz sin el filtro puede dañar la fotocelda del aparato.
2. Asegúrese que la aguja indicadora (C) esté en cero. Si no es así, ajústese a cero con la perilla (D), que sólo debe usarse cuando la lámpara del fotocolorímetro esté apagada.
3. Encienda el foco con el interruptor de la luz (I) y deje que el instrumento se caliente 5 minutos para su operación.
4. Ajuste la escala del potenciómetro (B) a cero utilizando la perilla (A).
5. Coloque el blanco de reactivo en el hueco del aparato. Encienda el interruptor (H).
6. Por medio de la perilla (G) ajuste la lectura del potenciómetro a cero; o sea, la aguja (C) coincidiendo con el trazo central y al mismo tiempo la escala (B) en cero. Hasta aquí el aparato a quedado calibrado.
7. Para leer las soluciones problema, apague el potenciómetro con el interruptor (H), retire el blanco y ponga en el hueco del instrumento el tubo con la solución problema. La aguja (C) se desviará de su posición, y por medio de la perilla (A) gire la escala (B) hasta que la aguja (C) llegue nuevamente a cero. Se anota ésta lectura de la escala (B) que corresponde a la lectura del problema.
8. Es importante que antes de retirar cada tubo, tenga cuidado de poner en CFF el interruptor (H), que regrese la escala (B) a cero y que no son confiables las lecturas menores de 25 y mayores de 500 unidades klett. (Fig. IV.11)

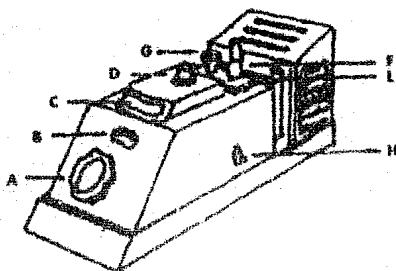


Fig. IV.11. Fotocolorímetro Klett-Summerson

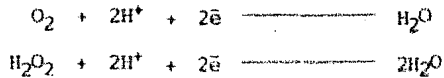
IV.7 OXIMETRÍA (14,18)

El electrodo polarográfico de oxígeno mide directamente la concentración de oxígeno disuelto en un fluido. Es de gran sensibilidad, por lo que puede emplearse para detectar cambios rápidos usando muestras pequeñas.

El método polarográfico se basa en el descubrimiento de que un sistema de electrodos inmerso en una solución al que se le aplica un voltaje de 0.5-0.8 v, la corriente que atraviesa el electrodo es proporcional a la concentración de oxígeno en la solución.

Desde 1942, los electrodos de oxígeno se han usado para medir la cantidad de éste elemento en una gran variedad de preparaciones biológicas. El electrodo más usado es el tipo Clark, que consiste de una combinación de electrodos de plata y platino montados en la base de una celda rodeada por una cubierta de agua. En la celda se coloca una solución reguladora isotónica. El medio se separa de los electrodos por una fina membrana de teflón que es permeable al oxígeno, bajo ésta hay un fragmento de papel seda humedecido en KCl saturado que actúa como electrólito. Cuando un voltaje polarizante se aplica a los electrodos, el electrodo de plata reacciona con los iones Cl y se forma AgCl, liberando electrones en el proceso. Estos electrones son utilizados por el electrodo de platino para reducir el oxígeno que difunde a través de la membrana. El proceso genera una corriente que es proporcional a la concentración de oxígeno (estrictamente la actividad) en la solución. Esta corriente se amplifica y es registrada en el graficador.

La reacción total es la siguiente:



En consecuencia, se toman 4 electrones del electrodo de platino, y la magnitud de la corriente es proporcional a la concentración (actividad) del oxígeno en solución como ya se explicó anteriormente. (Fig. IV.12)

La oximetría ha sido importante en el estudio de la propiedades oxidativas de mitocondrias aisladas empleando tejidos animales, particularmente hígado y corazón de rata. En bioquímica vegetal ha sido también importante su aplicación en experimentos sobre respiración y fosforilación oxidativa en plantas funcionales.

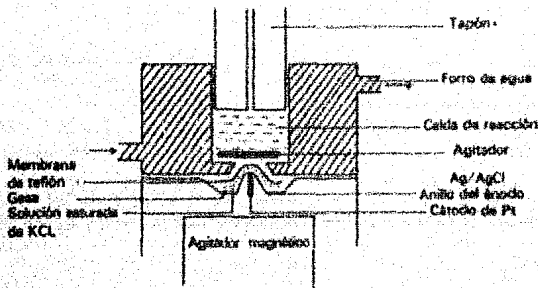


Fig. IV.12. Electrodo de oxígeno

BIBLIOGRAFIA

1. Abbott, D. and Andrews, R.S.: On Introduction to Chromatography. Longmans London, 1965.
2. Alcántara, B.V.: Química Inorgánica Moderna. 2a.ed. Ed. DELIASAS, México, 1968.
3. Block, R.J., Durrum, E.L. and Zelig G.: A Manual of Paper Chromatography and Electrophoresis. Academic Press, New York, 1955.
4. Briere, R.O. y Mull, J.D.: Electrophoresis of serum protein with cellulose acetate. Am. J. Clin Path., 42:547, 1964.
5. Cauley, L.P., y Eberhardt, L.: Simplified gel electrophoresis. Am. J. Clin Path, 5:539, 1962.
6. Edwards, D.: Cromatografía. El Manual Moderno. México, 1975.
7. González. M.S., Peñalzo, C.T.: Técnicas de Bimoléculas. INEP-1 UNAM, México.
8. Hamilton, P.; Simpson, S.: Quantitative Chemical Analysis, 12th ed, Callier-Mc.millan Student Editions, New York, 1967.
9. Klett - Summerson: Photoelectric colorimeter. Clinical manual. Klett Manufacturing Co., New York, (S.A.)
10. Lynch, J.M.; Raphael, S.S.; Moller, D.L.; Apere, D.P.; Inwood, J.H.M.: Métodos de Laboratorio. 2a.ed. Ed. Interamericana, S.A. de C.V. México, 1985.
11. Mc. Farlane, H.: A Simple Rapid Method of Concentrating Urine for Protein Electrophoresis. Clin. Chem. Acta. 9:376, 1964.
12. Morrison, R.; Boyd, R.: Organic Chemistry. 3rd.edition. Allyn and Bacon. Boston, 1976.
13. Preston, J.A., Briere, R.O. y Batsakis, J.G.: Rapid electrophoretic separation of lactate dehydrogenase isoenzymes on cellulose acetate. Am. J. Clin. Path. 43:256, 1965.
14. Rovalo Merino, M., Rojas Garcidueñas, M.: Fisiología Vegetal Experimental 1a.ed. Ed. Limusa, México 1982.
15. Smith, I.: Chromatographic and Electrophoretic Techniques, 2a.ed. Vol.1, Chromatography. William Heinemann Medical Books Ltd. London and Interscience Publishers Inc., New York, 1960.
16. Stryer, L.: Biochemistry, 2nd. edition, W.H. Freeman on Co. San Francisco 1981.
17. Waldin, D.: Chromatography, 2a. ed. E. Merck A.G. Darmstadt.

18. Whittaker, A.Peter; Danks, M.S.: Mitochondria; Estructura, Función y Formación
1a. ed. C.E.C., S.A. México, 1962.
19. Wolf, F.: Separations Methods in Organic Chemistry and Biochemistry. Academic
Press, London, 1969.

QUINTA UNIDAD

TEMAS DE BIOQUIMICA CON ALGUNAS TECNICAS DE
INTERES VETERINARIO.

1. SOLUCIONES ACUCAS, TITULACION Y pH.
2. AMINOACIDOS
3. PROTEINAS
4. ENZIMAS
5. CARBOHIDRATOS
6. LIPIDOS

OBJETIVOS

Al finalizar esta unidad usted será capaz de:

1. Demostrar en la práctica los conocimientos adquiridos en las unidades anteriores, mediante la aplicación de técnicas sencillas de laboratorio.
2. Adquirir habilidad en el manejo del material, equipo y reactivos para lograr un óptimo desarrollo de las técnicas a realizar.
3. Aprender a colaborar en equipo, ampliando ideas y/o mejorando la metodología, discusiones y conclusiones de las técnicas realizadas.
4. Intentar mediante la obtención de resultados de las técnicas aplicadas, el discernimiento que lo conduzca a relacionar e interpretar de una manera general, sobre algún padecimiento de interés veterinario.
5. Responder mediante la investigación bibliográfica una serie de cuestionarios con el fin de enriquecer más la información sobre la actividad práctica.

V.1. SOLUCIONES ACUOSAS, TITULACION Y pH.

V.1.1. INTRODUCCION

En las mediciones volumétricas se utilizan diversos tipos de material generalmente de vidrio como son:

1.a Pipetas. Las pipetas están calibradas para vaciar un volumen fijo o variable. Las primeras se denominan pipetas volumétricas y son más precisas que las segundas, las cuales se llaman graduadas. Estas últimas pueden ser terminales (pipetas serológicas) y no terminales (pipetas de mohr). El manejo incorrecto en los diferentes tipos de pipetas introduce errores serios, en el volumen del líquido a medirse. En las pipetas graduadas terminales se puede hacer ascender el líquido hasta la graduación final (cero) o hasta alguna graduación intermedia, y de igual forma al vaciarse puede hacerse hasta el final (expulso para expulsar el líquido que queda en la punta o hasta alguna de las graduaciones intermedias) Las pipetas no terminales se utilizan de manera análoga, pero no deben vaciarse más allá de la graduación terminal.

1.b Los matraces Erlenmeyer, Los vasos de precipitado y las probetas sirven para medir volúmenes variables marcados en su graduación.

1.c Matraces aforados. Son matraces redondos de fondo plano de cristal de alta calidad. Tienen una señal de calibración en la parte estrecha del cuello y siempre están calibrados para contener el volumen establecido. Se emplean para preparar soluciones muy exactas.

1.d Buretas. Las buretas son utilizadas para medir volúmenes variables. Las hay de muchos tamaños. Las de capacidad máxima de 2 ml. o menos se llaman microburetas. No deben contaminarse con grasa y su velocidad de vaciamiento debe ser bastante lenta (0.7 ml/seg.) para evitar la inexactitud inherente a la formación de la película de agua en las paredes.

Para realizar cualquier lectura en materiales con graduación, es importante lo siguiente:

1.1. En soluciones transparentes, se lee el borde inferior del menisco tangente a la línea de graduación.

1.2. En soluciones coloreadas, se lee la parte superior de la columna líquida.

1.3. Todas las lecturas deben de hacerse de frente y a la altura del nivel del menisco, para evitar el error de paralelaje.

En los animales, las sustancias químicas se encuentran en concentraciones específicas, y una de ellas es el protón o ión hidrógeno. Muchos de los mecanismos reguladores de la concentración de iones de hidrógeno de los líquidos orgánicos se han determinado con perros, como animales de experimentación. (3).

Los perros con su dieta normal de carne excretan orina con un bajo pH y éste previene la acumulación excesiva de hidrogeniones en el cuerpo. En cambio, los ruminantes excretan orina alcalina pues tienen el problema de perder cationes en exceso porque los aniones inorgánicos con los cationes se han metalizado en dióxido de carbono y agua. Se ha comprobado que en perros en los que se les ha alimentado principalmente con carbohidratos excretan entonces orina alcalina. Las especies omnívoras como el cerdo, producen orina ácida cuando la dieta contiene grandes cantidades de proteínas y orina alcalina cuando se alimenta principalmente de hidratos de carbono. (3,4).

Todas las especies de animales domésticos poseen igual mecanismo de regulación y el mismo pH en el plasma, y por lo tanto la concentración de iones hidrógeno es similar en todas. Pequeñas variaciones pueden existir según la especie en las proporciones de varios aniones y cationes que componen la relación global anión/catión. Los perros tienen mayor concentración de cloruros y menor de bicarbonato en el plasma en comparación con los bovinos; pero el pH del plasma es similar. (2,3,4).

El pH de la leche normal varía entre 6.4 y 6.6. Es importante su determinación puesto que en algunos casos, como por ejemplo la mastitis (inflamación de la glándula mamaria) está reducida la concentración de lactosa y caseína y aumentada la de cloruro y bicarbonato de sodio, produciendo que la leche sea más alcalina. Cambios similares se producen hacia el final de la lactancia. Por medio de indicadores como la púrpura de bromocresol, azul de bromotimol, etc. en forma líquida o en tiras de papel impregnado se puede hacer una determinación rápida del pH de la leche a nivel de campo. (1).

V.1.2. OBJETIVOS.

1. Aplicar los conocimientos teóricos para la preparación de soluciones Normales y Molares.
2. Conocer el manejo adecuado del material de laboratorio de uso más frecuente en Bioquímica.
3. Valorar una solución Normal de Acido Clorhídrico problema, utilizando una base fuerte.
4. Valorar una solución Molar de Hidróxido de Sodio problema, utilizando un ácido fuerte.
5. Determinar potenciométricamente el pH de muestras de plasma, orina, leche, de diferentes especies animales.

V.1.3. METODOS PARA PREPARACION DE SOLUCIONES Y TITULACION

V.1.3.a. Material y Reactivos.

Pipetas graduadas de 1 y 5 ml.	Acido Clorhídrico concentrado
2 Matraces aforados de 50 ml.	Hidróxido de Sodio 0.1 N
5 vasos de precipitado de 100 ml.	Hidróxido de Sodio (lentejas)
2 matraces Erlenmeyer de 125 ml.	Naranja de Metilo 0.04%
1 bureta de 25 ml.	Aguá destilada
1 soporte universal con pinzas para bureta	Solución amortiguadora
	Patrón (para calibrar el potenciómetro)

Material Biológico

Leche	20 ml.
Orina	20 ml.
Sangre.....	5 ml.

V.1.3.b. Preparación de una solución ácida Normal.

1. Realizar los cálculos necesarios para preparar una solución 0.1 N de Acido Clorhídrico si se sabe que su densidad es de 1.18 g/ml. y pureza de 38% p/p. Sólo se prepararán 50 ml.
2. Usar una pipeta de 1 ml. (de preferencia con perilla de hule para succión) tome la cantidad necesaria de ácido clorhídrico concentrado y vacíelo en un matraz volumétrico de 50 ml. que contenga 10 ml. de agua destilada.
3. Mezclar los dos líquidos y aforar (llevar el líquido hasta la línea de aforo) con agua destilada.
4. Rotular éste matraz como solución ácida problema (Esta solución será utilizada para la valoración acidimétrica).

V.1.3.c. Valoración Acidimétrica (Titulación)

1. Colocar la bureta de 25 ml. en el soporte con la pinza y proceda a llenarla con Hidróxido de Sodio 0.1 N sin dejar burbujas de aire en el interior (purgar).
2. En un matraz Erlenmeyer colocar 10 ml. de la solución problema de ácido, más 2 gotas de indicador (Naranja de Metilo). Anotar el color observado.
3. Colocar una hoja blanca por debajo del matraz con la solución problema que se titulará para observar perfectamente el cambio de color de la solución.
4. Abrir la llave de la bureta y en forma lenta y continua (gota por gota) deje salir el Hidróxido de Sodio para que caiga en el matraz con la solución problema. Agitar constantemente durante toda la valoración.
5. En el momento en que el color de la solución vire a canela, cierre la llave de la bureta y anote el volumen de álcali gastado. Un exceso de álcali agregado ocasionará errores en sus cálculos de la concentración del ácido.
6. Utilizar la fórmula: $N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$, Calcular la Normalidad de la solución ácida problema.

V.1.3.d. Preparación de una Solución Alcalina.

1. Realizar los cálculos necesarios para preparar una solución alcalina de Hidróxido de Sodio 0.1M. El peso molecular del NaOH es 40 y se necesitan 50 ml.
2. Pesarla cantidad necesaria de las lentejas de Hidróxido de Sodio en la balanza analítica y colóquelas en el matraz volumétrico para disolverlas en agua destilada, aforando a 50 ml.
3. Rotular ahora éste matraz como solución básica problema.

V.1.3.e. Valoración Alcalimétrica.

1. Colocar la bureta de 25 ml. (limpia) en el soporte con la pinza y proceda a llenarla con Solución Ácida Problema que se preparó en la primera parte, a la cual ya se le ha determinado su concentración Normal. Recuerde que el Acido Clorhídrico sólo tiene un equivalente químico y por lo tanto una solución 1 N es igual a 1 M.
2. En un matraz Erlenmeyer colocar 10 ml. de la Solución Básica Problema, más dos gotas del indicador. Anotar el color observado.
3. Valorar la solución de la manera descrita en la primera parte hasta que la solución de álcali vire al color canela y anotar cuántos ml. de solución ácida ha agregado de la bureta a la solución.
4. Utilizar la fórmula: $M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$, calcular la molaridad del hidróxido de sodio problema preparado.

V.1.4. MEDICION DEL pH EN MUESTRAS DE INTERES VETERINARIO.

V.1.4.a. Método.

1. Una vez obtenidas las muestras de orina, sangre y leche de cualquier especie animal, deben de usarse para su estudio el mismo día; para evitar modificaciones de algunos metabolitos que se descomponen y que ocasionan fluctuaciones en las mediciones.
2. A la orina y la leche se le puede medir el pH directamente. A la sangre suele medirse el pH como plasma. Esto es como sigue: la sangre tiene básicamente dos componentes: las células (glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas) y el fluido en el que se encuentran dichas células. Dentro de la parte fluida de la sangre, hay dos subdivisiones principales que son el suero y el plasma, que difieren en que el suero no presenta factores de coagulación y algunas proteínas.

Para obtener el plasma: La sangre extraída se vierte en un tubo que contenga una gota de solución al 1% de Heparina y se hace una mezcla invirtiendo varias veces el tubo suavemente. Para separar el plasma de las células sanguíneas, hay que centrifugar durante 15' a 10,000 x g. (Consultar apéndice B 16)

3. Para calibrar el potenciómetro, asegúrese que los dos electrodos se encuentren correctamente adaptados al aparato y proceda a enjuagarlos con agua destilada. Secándolos antes de hacer la medición.
4. Coloque en un vaso de precipitado de 100 ml., 50 ml. de la solución amortiguadora patrón a pH de 7, proceda a sumergir los electrodos en la solución y haga girar la perilla del aparato de la posición de Stand By a pH.
5. Si la aguja de la escala no marca exactamente 7, gire el botón de calibración hasta hacer coincidir la aguja con el pH señalado de 7. Enjuague y seque los electrodos.
6. Lea ahora en otro vaso de precipitado el pH correspondiente a alguna de las muestras diferentes de orina, plasma o leche que se hayan conseguido para la ocasión.
7. No olvide enjuagar con agua destilada y secar los electrodos después de cada lectura. Puede repetirse la calibración del aparato si son muchas las muestras que se desea conocer el pH.
8. Haga una tabla de los resultados de medir pH en cada una de las muestras y corrobore si estos valores son normales en las especies que se han usado en ésta práctica.

V.1.5. CUESTIONARIO

1. Que material, de los usados para mediciones volumétricas tienen mayor grado de exactitud en los volúmenes marcados? Por qué?
2. Qué es lo que indican cada uno de los colores y números marcados en cada uno de los tipos de pipetas que hay?
3. Por qué al titular un ácido fuerte se debe usar una base fuerte? Defina lo que es un ácido y una base fuerte.

4. Cómo realizaría una medición de pH si no tiene a mano un potenciómetro? Qué es más exacto y por qué?
5. Mencione algún padecimiento animal que modifique el pH de fluidos como la orina, sangre y leche.

V.2. AMINOACIDOS. SEPARACION DE AMINOACIDOS POR CROMATOGRAFIA EN PAPEL Y CAJA FINA.

V.2.1. INTRODUCCION

Los diversos métodos de separación, identificación y cuantificación de los aminoácidos, deben su grado de precisión y rapidez a las técnicas empleadas que difieren evidentemente según sea el caso de estudio teórico o diagnóstico práctico rápido.

En el primer caso se pretende determinar básicamente estructura primaria de una proteína que con estudios posteriores da idea para el modelo tridimensional de la conformación de la misma.

En el segundo caso, caracterizar los aminoácidos presentes en líquidos de importancia biológica en Bioquímica Clínica.

La cromatografía de aminoácidos en sangre y orina son frecuentemente utilizados como prueba preliminar en los humanos a nivel pediátrico. En veterinaria este tipo de análisis es muy raras veces solicitado, a menos que interese en un proyecto específico como la Cistinuria en perros (9, 10) o en estudios comparativos de excreción en mamíferos. (3)

En sangre la distribución de aminoácidos entre los eritrocitos y el plasma es desigual y no de la misma magnitud para todos los aminoácidos (4). De los 20 aminoácidos medidos, en todos la concentración fue más alta en los eritrocitos, que en el plasma.

En animales se han hecho otros estudios concernientes al efecto de la dieta en los aminoácidos plasmáticos (6,7,8 y 11)

Se sabe poco de los valores en el contenido en aminoácidos de la orina en estados patológicos en animales. En el perro se conocen bien dos defectos tubulares que dan como consecuencia la formación de cálculos de cistina y la excreción exagerada de ácido úrico en el perro Dálmata. Es probable que éstas anomalías permanezcan sin descubrirse si no dan origen a cálculos.

En perros alimentados con una dieta rica en proteína se ha observado excreción anormal de aminoácidos en cantidades excesivas de Taurina y Glutamina (2). Experimentalmente en ratas con deficiencia de Magnesio está aumentada la pérdida de aminoácidos por la orina. (1)

Todavía queda mucho por investigar para atribuir significación diagnóstica a mediciones cuantitativas en estudios de aminoácidos. En estos estudios se utilizan técnicas muy sofisticadas que requieren de un dominio completo para su interpretación antes de aplicarse a problemas clínicos.

V.2.2. OBJETIVOS.

1. Conocer y demostrar el principio de la Cromatografía en papel y en capa fina, utilizando aminoácidos como muestra.
2. Aprender la técnica de revelado con Ninhidrina para la identificación de aminoácidos.
3. Identificación de los aminoácidos de una mezcla problema.
4. Conocer la importancia de la aplicación de diferentes tipos de eluyentes para la separación de aminoácidos.

V.2.3. MÉTODOS DE SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE AMINOÁCIDOS POR CROMATOGRAFÍA EN PAPEL Y CAPA FINA.

V.2.3.a. Material y Reactivos

Papel Whatman número 3, recortado en tiras de 5 x 25 cm.

- 4 capilares.
- 1 lápiz y regla.
- 2 cámaras de cromatografía.
- 1 parrilla electrónica.
- 1 frasco aspersor o atomizador
- 5 pipetas 1, 2, 5 y 10 ml.
- 2 probetas 30 ml.
- 4 porta objetos
- 1 espátula
- 1 pinza de punta roma
- 4 frascos de vidrio con tapón de rosca de 10 cm. de altura
- 4 capilares

Solución 0.01M de Fenilalanina (No.1)

Solución 0.01M de Prolina (No.2)

Solución 0.01M de Histidina (No.3)

Mezcla de Aminoácidos Problema (No.4)

- Mezcla de Disolventes (Eluyentes):
- a. Butanol-Agua-Acido Acético.
(120-50-30)
 - b. Fenol-Amóníaco
(200-1)
 - c. Butanol-Acido Acético-Agua.
(4-1-1).

Gel de Sílice G.

Solución de Ninhidrina 0.05% disuelta en etanol.

Solución de Ninhidrina 0.01% disuelta en etanol.

Cloroforno y Metanol.

V.2.3.b. Método para separación e identificación de aminoácidos por cromatografía en papel de tipo ascendente.

1. Sujetar el papel de cromatografía siempre por los bordes; nunca las yemas de sus dedos deberán tocar la superficie del mismo.
2. A un centímetro del extremo inferior de la tira de papel Whatman, marcar con lápiz cuatro cruces (+) muy finas, indicando la numeración respectiva para cada aminoácido y la mezcla.

3. Colocar con un capilar en el centro de la cruz una gota muy pequeña del aminoácido No.1. Es muy importante que el tamaño de la aplicación una vez que ha sido absorbida en el papel no exceda de 3mm. de diámetro. Realizar la aplicación del aminoácido No.2 con otro capilar de la manera ya descrita. Proceda de igual manera con la muestra No.3 y el problema No.4.
4. Colocar la tira de papel Whatman sobre una hoja limpia en la mesa de trabajo, para evitar contaminar el mismo.
5. Ya que hayan secado, las manchas aplicadas, proceda a colocar la tira de papel dentro de la cámara de cromatografía ascendente, estabilizada con el eluyente A. El eluyente nunca debe rebasar el nivel de aplicación de la muestra antes de comenzar a ascender por capilaridad.
6. Permitir ascender al eluyente hasta dos centímetros antes de llegar al extremo superior de la tira de papel y retirarle de la cámara de cromatografía, marcando el frente del eluyente.
7. Secar con calor el cromatograma utilizando la parrilla, sin pegar el papel a la misma, ya que se quemaría.
8. Pulverizar con el revelador Ninhidrina la tira de papel hasta que esté bien cubierta toda la superficie del cromatograma.
9. Calentar nuevamente hasta que se hagan visibles las manchas de los aminoácidos.
10. Marcar los bordes de cada una de las manchas y un punto en el centro de las mismas y calcule Factor de Retardo (R_f) de las muestras 1, 2 y 3 (puras), mediante la fórmula:

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida desde el origen (+) hasta el punto central de la mancha}}{\text{Distancia recorrida desde el origen hasta el frente del eluyente.}}$$

11. Calcular el R_x comparando los componentes puros con los de la mezcla problema (No.4) utilizando la fórmula:

$$R_x = \frac{\text{Distancia recorrida por un compuesto de la mezcla problema desde el origen (+) hasta su punto central.}}{\text{Distancia recorrida por el compuesto puro desde su origen hasta el centro del mismo.}}$$

Si el R_x es aproximadamente igual a uno, podemos estar seguros que se trata del mismo compuesto.

12. De acuerdo al color, corrimiento, y valores de R_f y R_x ; identifique los aminoácidos presentes en la mezcla problema.
13. Para evaluar la importancia de la elección de un eluyente en cromatografía, se procederá a plicar una segunda mezcla de disolvente (B) de diferente polaridad, repitiendo todo el método anterior con una segunda tira de papel que contenga las mismas muestras.
14. Observar y comparar los diferentes corrimientos obtenidos en los dos sistemas.

V.2.3.c. Método para la separación e identificación de aminoácidos por cromatografía en capa fina. (5)

Preparación de placas.

1. Lavar y secar los portaobjetos y siempre manipularlos por sus bordes.
2. Hacer la mezcla de 35 g. de Gel de Sílice en 100 ml. de una mezcla de Cloroforno - Metanol (2:1) en un frasco con tapón para evitar evaporación.
3. Sujetar dos portaobjetos con las pinzas adhesivos e introducirlos al frasco con el gel ya preparado.
4. Sacar los portaobjetos de la gel, separar uno del otro, y colocarlos en un horno o estufa para que se sequen.
5. Se puede retirar el exceso del gel de los bordes con ayuda de una espátula.
6. Para activar las placas generalmente deben de ser calentadas para tirar el agua que actúa como una impureza y evita una separación adecuada. La magnitud del calor depende del tipo de separación que se requiere. Para compuestos hidrofílicos o polares, el secado al aire o con un secador de pelo son generalmente adecuados; pero para los compuestos hidrofóbicos o no polares requieren un calentamiento más intenso.

Desarrollo de la Cromatografía.

1. A una distancia de 0.5 cm. del borde inferior de la placa hacer una marca pequeña al margen, con la espátula, esto indica la línea de origen.
2. Aplicar con un capilar una muestra pequeña del aminoácido No. 1 y con otro capilar a una distancia de 1 cm. sobre la misma línea de origen, una mancha de la mezcla problema No. 4.
3. Colocar la placa dentro de un frasco de vidrio con tapa que contenga el eluyente preparado (C) y esperar a que se desarrolle el cromatograma hasta tener un frente de eluyente muy cercano al borde superior de la gel.
4. Retirar la placa y marque el frente del eluyente ligeramente.
5. Después de tener seca la placa, proceda a pulverizar con el revelador de Ninhidrina y caliente en la parrilla hasta que aparezcan las manchas.
6. Con la ayuda del estilete marque el contorno y el centro de cada aminoácido.
7. Calcular el valor de R_f para cada aminoácido;
8. Calcular el valor de R_x .
9. Comparar el tipo de separación que se obtiene por éste método con el de cromatografía en papel.

V.2.4. CUESTIONARIO

1. ¿Qué otro tipo de compuestos se pueden separar por cromatografía en papel?
2. Explique las diferencias, ventajas y desventajas de las técnicas de cromatografía en papel y en capa fina.
3. Describa cómo se llevan a cabo una cromatografía en papel:
 - a) Descendente
 - b) Radial
 - c) Bidimensional.
4. ¿Qué otro tipo de soporte utilizaría en cromatografía en capa fina?
5. ¿Por qué es importante reportar las condiciones en las cuales se ha realizado una cromatografía (eluyente, temperatura, material interferente en el equilibrio y tipo de papel usado)?

V.3. PROTEÍNAS. DETERMINACIONES CUALITATIVAS Y CUANTITATIVAS DE PROTEÍNAS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS.

V.3.1. INTRODUCCION.

Las proteínas son biopolímeros de aminoácidos y generalmente con alto peso molecular. Representan la parte principal de los tejidos del cuerpo y sus propiedades físicas (forma, tamaño, etc.) varían según su función. (3)

En el organismo las principales funciones de las proteínas son las siguientes:

- a) Estructurales: Colágena (tendones, cartílagos y huesos)
Elastina (ligamentos y vasos sanguíneos)
Queratina (piel, pelo, pluma, uñas, cuerno, lana)
Miosina y Actina (músculo)
- b) Funcionales: Enzimas (lipasas, proteasas, etc.)
Hormonas (insulina, glucagón, adrenocorticotrópicas)
Anticuerpos (gama globulinas)
Transporte de Oxígeno (hemoglobina y mioglobina)
Toxinas (Toxina Botulínica)
Regulador de Presión Osmótica (albúmina del plasma)

Generalmente en los estudios químicos y biológicos de las proteínas para lograr su separación, purificación y cuantificación se tienen en cuenta su tamaño molecular, solubilidad, carga eléctrica, diferencias en sus características de adsorción y su afinidad biológica con otras moléculas. (6)

Normalmente la orina no contiene cantidades demostrables de proteínas y dentro de los límites clínicos, esto es verdad, pues con una prueba tan simple como la del ácido sulfosalicílico se detecta 10mg/100ml. y por debajo de ésta cantidad el resultante se califica de negativo. Existen pruebas de laboratorio más sensibles que la mencionada pero carecerían de significado clínico puesto que con raras excepciones, todas las muestras contienen algunas proteínas secreciones normales de las vías urinarias. (6)

El proceso de la filtración y reabsorción de proteínas no está aclarado por completo. Todo factor que aumente la permeabilidad del glomérulo o disminuya su capacidad de reabsorción del túbulo produce proteinuria. La albúmina, con un peso molecular de 60,000, es bastante mayor que el tamaño normal de los poros del endotelio de la cápsula, algunas alfa-globulinas son de tamaño similar y de las proteínas normales del suero, la albúmina y las alfa-globulinas son las que primero aparecen en la orina en caso de daño renal. (4)

Es importante señalar que la presencia de una lesión renal no siempre está acompañada de una proteinuria y también que la proteinuria no siempre indica enfermedad renal, por ejemplo: En los becerros recién nacidos la pared intestinal es permeable a las globulinas de bajo peso molecular de 30 a 40 horas, y alguna lactoglobulina es absorbida sin alteración y excretada en la orina (7,8).

La hemoglobina es una proteína conjugada, compuesta de una cadena de aminoácidos (globina) y un grupo prostético (hemo) llamado hem para cada cadena polipeptídica. Se encuentra en el interior de los eritrocitos de la sangre de los animales, formando complejos supermoleculares (oligómeros) de cuatro cadenas polipeptídicas y cuatro hemes unidos por enlaces covalentes. El peso molecular del complejo es de 69,000. (2,3)

La hemoglobina es responsable del color rojo de la sangre, es la encargada del transporte del oxígeno de los pulmones a los tejidos y el CO_2 de estos a los pulmones, por medio de la circulación sanguínea. La magnitud de éste intercambio de gases es directamente proporcional a la concentración de la hemoglobina en la sangre. Por consiguiente, el procedimiento más directo para estimar la eficiencia de la circulación sanguínea en éste aspecto, es el determinar la concentración de hemoglobina. (3,4) (Consultar apéndice B 4)

En el sentido más amplio existe anemia, cuando el recuento de glóbulos rojos, la hemoglobina y el hematocrito (medición del paquete de glóbulos rojos comparándolo con los restantes constituyentes sanguíneos) resultan inferiores a las cifras normales. (4)

Las proteínas en la leche representan un buen porcentaje del total de la materia seca de la leche, algunas proteínas se sintetizan en la propia glándula mamaria (caseína) mientras que otras son tomadas de la sangre circulante. (1)

Las caseínas de los diferentes animales son casi iguales, contienen todos los aminoácidos esenciales, entre ellos la metionina 2%. Esta proteína representa el 80% de las proteínas de la leche madura de vaca y precipita a un pH de 4.6 (punto isoelectrico de la proteína). (1) (Consultar apéndice B 3, B 17)

La lactoalbúmina no es idéntica a la albúmina sérica, aunque presenta una composición muy semejante en aminoácidos. La lactoalbúmina representa el 12% de la proteína y es rica en triptófano. (1)

La lactoalbúmina es idéntica a la seroglobulina y se encuentra en aproximadamente el 0.02% de la proteína de la leche madura. (1)

Para el aislamiento de una proteína como la caseína de la leche, se procede a hacer una precipitación de la misma tomando en cuenta el principio de solubilidad denominado fenómeno de "Salting Out" (desalado), en el que se debe tomar en cuenta el punto isoelectrico de la proteína que se quiere precipitar. El mecanismo de este proceso es como sigue: La solubilidad de las proteínas depende de la solvatación de las moléculas de agua alrededor de los grupos iónicos hidrofílicos, por lo que la remoción de las moléculas de agua por otros iones disminuye la solubilidad de la proteína y precipita entonces. (4,1)

Para la cuantificación de proteínas existen varios métodos colorimétricos empleados con frecuencia (Lowry, Folin-Ciocalteu, Azul Coomassie, etc.) Uno de los más sencillos es el método de Biuret, cuya reacción está basado en la formación de un complejo entre los iones cobre y varias enlaces peptídicos que adquieren un color púrpura. Esta reacción puede ser medida cuantitativamente con un fotocolorímetro o un espectrofotómetro. (6)

V.3.2. OBJETIVOS.

1. Determinar cualitativamente la presencia de albúmina en orina mediante la prueba de Robert.
2. Determinar cualitativamente la presencia de proteínas en orina mediante la prueba del ácido sulfosalicílico.
3. Medición cuantitativa de proteínas en orina utilizando el método de fotocolorimetría.
4. Aprender a realizar una curva de calibración para cuantificar proteínas.
5. Medición cuantitativa de hemoglobina en sangre utilizando el método fotocolorimétrico.
6. Aislar la caseína de una muestra de leche por precipitación basándose en el principio de "Salting Out".
7. Cuantificar colorimétricamente la caseína obtenida por el método de Biuret.

V.3.3. DETERMINACION CUALITATIVA DE ALBUMINA EN URINA. PRUEBA DE ROBERT.

V.3.3.a Material y Reactivos

- | | |
|-------------------|-----------------------|
| 1 tubo de ensaye | Reactivo de Robert |
| 1 pipeta de 5 ml. | |
| 1 gotero | Material Biológico |
| | 2 ml. de orina clara. |

V.3.3.b. Método

1. Debe utilizarse orina clara para éste examen. La orina turbia u opaca puede ser clarificada por filtración o por centrifugación.
2. Colocar 2 ml. del reactivo de Robert en un tubo de ensaye.
3. Con una pipeta agregar 2 ml. de orina al reactivo en el tubo.
4. La formación de un anillo blanco o gris en el tubo de contacto de las sustancias indica la presencia de albúmina.
5. Los resultados se anotarán en la forma siguiente:

- ± huellas (anillo muy tenue)
- + anillo delgado, franco
- ++ anillo moderado
- +++ anillo intenso
- ++++ anillo sumamente grueso, casi la totalidad de la capa de orina.

V.3.4. DETERMINACION CUALITATIVA DE PROTEINAS EN URINA. PRUEBA DEL ACIDO SULFOSALICILICO (BERNARD Y SCHER, 1946).

V.3.4.a. Material y reactivos.

- 1 tubo de ensaye
- 1 pipeta de 5 ml.

Acido sulfosalicílico al 10% en alcohol metílico al 50%

Material Biológico

3 ml. de orina clara.

V.3.4.b. Método

1. Debe utilizarse orina clara. Si está turbia u opaca, clarifique por filtración o centrifugación. (5 min. a 2500 rpm).
2. Colocar 3 ml. de orina en un tubo de ensaye.
3. Agregar al tubo 3 ml. de ácido sulfosalicílico al 10%.
4. Si existen proteínas, aparece un precipitado nebuloso en la interfase.
5. Anotar , según el grado observado del modo anterior.

V.3.5. CUANTIFICACION DE PROTEINAS EN LA ORINA POR FOTOCOLORIMETRIA.

V.3.5.a. Material y Reactivos.

- 12 tubos de ensaye
- 4 pipetas de 1 ml.
- 3 pipetas de 5 ml.
- 7 vasos de precipitado
- 1 gradilla

Solución de cloruro de sodio 0.9%
Solución de ácido sulfosalicílico al 3%
Solución Patrón de proteína. Albúmina 100mg/ 100 ml.
Agua destilada

Material Biológico

2 ml. de orina.

V.3.5.b. Método

Para elaborar la curva de calibración:

1. Preparar la siguiente serie de tubos:

TUBOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Solución de Proteína Patrón	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0	ml
Agua destilada	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0.0	ml
Acido Sulfosalicílico	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	ml

2. Mezclar y dejar reposar durante 5 minutos.
3. Realizar la lectura en el fotocolorímetro, calibrando con el tubo blanco que contiene 6 ml. de agua destilada. Utilizar filtro azul o bien en el espectrofotómetro se puede leer en la banda de 420 nm.
4. Graficar densidad óptica (unidades Klett/500) vs. concentración de proteína en mg/100 ml. usando papel milimétrico.

Para cuantificar la muestra de orina problema.

1. Primero se lleva a cabo la prueba cualitativa para proteínas utilizando ácido sulfosalicílico. Si existe una cantidad considerable de proteínas, la orina se diluye uno a veinte, con solución de cloruro de sodio al 0.9%.
2. En dos tubos de ensaye limpios y secos se prepara lo siguiente:

	Blanco	Problema
Orina (o una dilución 1 a 20 de orina)	1.0 ml.	1.0 ml.
Solución de cloruro de sodio 0.9%	5.0 ml.	--
Solución de ácido sulfosalicílico 3%	--	5.0 ml.

3. Mezclar y dejar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
4. Leer en el fotocolorímetro utilizando filtro azul o en el espectrofotómetro en la banda de 420 m μ . El cero de la calibración se establece con el tubo blanco.
5. Los miligramos de proteína por 100 ml. se leen interpolando el valor de densidad óptica en la gráfica preparada para la curva de calibración. Si se utiliza orina diluida en proporción de 1 a 20, el resultado obtenido en la gráfica se multiplica por 20.

V.3.6. CUANTIFICACION DE HEMOGLOBINA EN SANGRE POR FOTOCOLORIMETRIA

V.3.6.a. Material y Reactivos.

- 7 tubos de ensaye
- 1 gradilla
- 2 pipetas de 5 ml.
- 1 jeringa estéril desechable
- 1 matraz aforado de 100 ml.

Solución de carbonato de sodio al 0.1 %
Solución Patrón de Hemoglobina al 20%

Muestra Biológica.

1.0 ml. de sangre animal (de cualquier especie)

V.3.6.b. Método

Para elaborar la curva de calibración para hemoglobina:

1. Disponer la siguiente serie de tubos (volumenes en ml.)

	1	2	3	4	5	6
Patrón de hemoglobina diluida 1:200	-	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
NaCO_3 al 0.1%	5.0	4.0	3.0	2.0	1.0	-

2. Mezclar y dejar reposar 5 minutos a temperatura ambiente.
3. Leer en el fotocolorímetro, calibrando con el tubo No.1 que es el blanco. Utilizar filtro verde o bien si usa espectrofotómetro, puede leer en la banda de 560 nm.
4. Graficar densidad óptica contra concentración de hemoglobina en miligramos/100 ml. Los tubos 2,3,4,5 y 6 valen respectivamente 4,8,12,16 y 20 gramos /100 ml. de hemoglobina.

Para cuantificar la hemoglobina de la muestra de sangre:

1. Extraer 1.0 ml. de sangre venosa animal con una jeringa estéril desechable.
2. Vaciar 0.5 ml. de sangre en un matraz Erlenmeyer que se afora a 100 ml. con carbonato de sodio al 0.1%. Agitar vigorosamente.
3. Pipetar 5 ml. de la mezcla preparada en el paso 2 y colocarla en un tubo de ensayo con la etiqueta: No. 7 (Problema).
4. Leer en el fotocolorímetro utilizando filtro verde o en el espectrofotómetro en la banda de 560 nm. El cero de la calibración se establece con el tubo No.1.
5. Los miligramos de hemoglobina por 100 ml. se leen interpolando el valor de densidad óptica en la gráfica de la curva de calibración.
6. Comparar los valores normales con los resultados de su experimento según sea la especie de la que extraje la muestra. (Consultar apéndice B 4).

V.3.7. AISLAMIENTO, PURIFICACION Y DETERMINACION DE PROTEINA

V.3.7.a. Material Y Reactivos.

1 matraz Erlenmeyer 100 ml.	HCl al 2%
3 probetas de 50 ml.	Etanol al 95%
1 varilla de vidrio	Eter
1 buchner grande	Acetona
Papel filtro de diámetro espesor	Agua destilada
1 matraz kitasato	Material Biológico
1 buchner con placa de porcelana	Leche descremada 100 ml.
1 potenciómetro	

V.3.7.b. Método

Aislamiento y Purificación de proteína

1. Diluir 100 ml. de leche descremada (1:4) con agua destilada.
2. Dejar reposar durante 10-15 minutos, y ajustar el pH a 4,8 empleando HCl al 2%. Se observa inmediatamente un precipitado, agitar durante 10 minutos.
3. Dejar sedimentar (el tiempo necesario). Decantar el sobrenadante y dividir el mismo en cuatro partes proporcionales que se colocarán a su vez en cuatro frascos rotulados con las letras a,b,c y d, ya que cada una de éstas fracciones obtenidas servirán para hacer algunas determinaciones.
4. El sedimento que se obtuvo, se filtra empleando vacío y tres capas de papel filtro.
5. El filtrado obtenido se lava dos veces con agua destilada para eliminar cloro y se debe resuspender en el mismo volumen empleando inicialmente (100ml.).
6. Lavar dos veces con 25-40 ml. de etanol en el mismo filtro.
7. Lavar dos veces con 25-40 ml. de éter
8. Lavar dos veces con 25 ml. de acetona.
9. Secar en estufa a 40°C. Se obtiene un polvo blanco (proteína aislada y pu-

- rificada) que se pesa en una balanza analítica y se anota el dato.
10. Diluir 1:1 con la solución saturada de sulfato de amonio $(NH_4)_2SO_4$ la fracción a pH 4.8, obtenida en el paso 3. Anotar lo observado.
 11. Adicionar sulfato de amonio sólido hasta saturación a la fracción b obtenido en el paso 3. Anotar lo observado.
 12. Comparar precipitados obtenidos en las fracciones a y b (paso 10 y 11) con lo que obtuvo al precipitar la caseína. ¿Qué infiere de ello?
 13. Calentar la fracción c (pH 4.8 obtenido del paso 3) a ebullición suave. Observe lo que sucede y descríba e interprete los resultados.
 14. Empleando la fracción d, una muestra de leche descremada y una muestra de leche entera, determinar proteína cuantitativamente por el método de Biuret, utilizando espectroscopía o bien un fotocolorímetro con filtro verde.

V.3.7.c. Determinación cuantitativa de proteína por el método de Biuret.

c.1 Material y Reactivos

- 8 tubos de ensayo
- 3 pipetas graduadas de 1 ml.
- 2 pipetas graduadas de 5 ml.
- 1 gradilla
- 1 fotocolorímetro con filtro verde o un espectrofotómetro.

Sol estándar de caseína de Hammerstein (2 mg/ml').

NaCl al 1%

NaOH al 2.4%

Reactivo de Biuret.

Material Biológico

Leche descremada 1 ml.

Leche entera 1 ml.

fracción d 1 ml.

c.2 Método para elaborar una curva de calibración.

1. Preparar con NaCl al 1% el patrón de caseína (con la sol. estándar de caseína) calentando también con una pequeña cantidad de NaOH al 2.4% hasta que se disuelva completamente la proteína.
2. Elaborar la curva de calibración con los siguientes datos:

Tubos	1	2	3	4	5
Sol. standards caseína 8 mg/ml.	---	0.25	0.5	0.75	1.0 ml.
NaCl 1%	6.0	5.75	5.5	5.25	5.0 ml.
Reactivo de Biuret	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0 ml.

3. Mezclar y dejar reposar por 5 minutos.
4. Utilizar el tubo 1 como tubo blanco al realizar las lecturas.
5. Pude usarse el fotocolorímetro con filtro verde o el espectrofotómetro donde puede realizar sus lecturas en la banda 540 nm.
6. Graficar densidad óptica (unidades klett/500) contra concentración de proteína en mg/100ml. usando papel milimétrico.

c.3 Método para cuantificar las muestras problemas.

Tubos	6	7	8
leche descremada	1.0	---	---
leche entera	---	1.0	---
Fracción <u>d</u>	---	---	1.0 ml.
NaCl a 1%	5.0	5.0	5.0 ml.
Reactivo de Biuret	4.0	4.0	4.0 ml.

7. Después de preparar los tubos problema, debe mezclar y posteriormente dejar reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
8. Leer en el fotocolorímetro utilizando filtro verde o en el espectrofotómetro en la banda de 540 nm. El cero de la calibración se establece con el tubo blanco.
9. Conocer los mg/ml. de proteína contenidos en las muestras problemas interpolando los valores de densidad óptica de cada muestra en la gráfica preparada para la curva de calibración.

V.3.8. CUESTIONARIO.

1. ¿Explique por qué es importante aplicar el principio de Salting Out en la precipitación de las proteínas?
2. Explique las diferencias entre los diferentes métodos (Lowry, Folín-Ciocalteu) que son utilizados para la determinación de proteínas, respecto al método de Biuret.
3. Explique los tres tipos de anemia más frecuentes en los animales domésticos.
4. ¿Qué es la policitemia? Mencione alguna de sus causas.
5. ¿Dónde se sintetiza la albúmina? Mencione alguna causa de elevación y disminución en los valores normales de cualquier especie doméstica.

6. ¿Por qué es importante la determinación de caseína? ¿Existen diferencias de porcentajes de niveles o valores de caseína entre las diferentes especies domésticas?
7. ¿Qué es la fotocolorimetría y cuales son sus fundamentos?
8. ¿Por qué se utilizan diferentes tipos de filtros en las técnicas mencionadas?
9. ¿Qué diferencias existen entre fotocolorimetría y espectrofotometría? Explique.
10. ¿Qué otros tipos de muestras biológicas se podrían utilizar para determinación de proteínas?

V.4. ENZIMAS.

V.4.1. INTRODUCCION

Para que el organismo vivo mantenga sus funciones vitales es necesario la presencia de diversos factores y uno de los más importantes corresponde a las enzimas, sin las cuales tal vez infinidad de reacciones no se llevarían a cabo y que de hacerlo, ocuparían mucho tiempo y energía.

Las enzimas son proteínas específicas que funcionan como catalizadores biológicos acelerando una reacción y no consumiéndose en ella; con la particularidad de que pueden ser reguladas sus funciones.

Para obtener el producto de una reacción bioquímica siempre se atraviesa por un estado de transición de alta energía. A la diferencia de energía del estado de transición y del reactivo inicial se le llama energía de activación. Las enzimas disminuyen la barra energética para que una reacción termodinámicamente posible ocurra más velozmente porque la intervención de la enzima hace que el mayor número de moléculas reaccionantes llenen los requerimientos de energía de activación. Las enzimas no modifican el equilibrio de una reacción, sólo disminuyen notablemente el tiempo necesario para llegar al equilibrio. (2)

La velocidad de la reacción enzimática puede estudiarse en el laboratorio y puede variarse diversos factores para modificar experimentalmente dicha velocidad de reacción, por ejemplo, temperatura, pH, concentración de la enzima, concentración de sustrato, tiempo, presencia de activadores y presencia de inhibidores (reversibles, irreversibles y alostéricos).

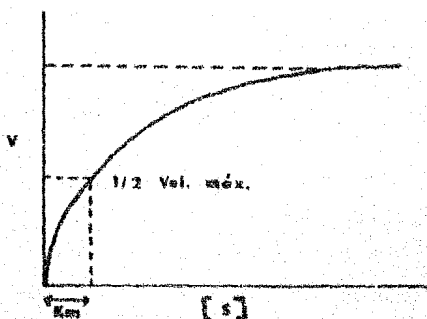
Considerando que la carga neta de las enzimas está relacionadas con el pH del medio, es lógico suponer que cuando se hacen variaciones del pH, la actividad disminuye e inclusive, la enzima puede llegar a desnaturalizarse con la pérdida irreversible de su actividad. (2)

Si se varía el tiempo de acción de una enzima, la transformación de sustrato a producto aumenta en forma directamente proporcional al tiempo de incubación.

Cuando en una reacción enzimática se mantienen constantes todos los factores y únicamente se varía la cantidad de sustrato, la velocidad de la reacción será proporcional al incremento del sustrato hasta cierto límite en el que la velocidad de reacción se mantendrá constante lo que indica que la enzima está saturada. (2)

Es importante analizar el concepto de la Constante de Michaelis (K_m), la cual se define como la concentración de sustrato necesaria para alcanzar la mitad de la velocidad máxima de una reacción enzimática. La K_m tiene un valor fijo para cada enzima y su correspondiente sustrato. Cuando la K_m tiene un valor elevado indica que para alcanzar la mitad de la velocidad máxima es necesario gran cantidad de sustrato, lo que a su vez nos señala que la afinidad de la enzima hacia el sustrato es baja. Cuando la K_m posee un valor bajo sucede lo contrario, o sea que la enzima tiene gran afinidad por su sustrato, por lo que la cantidad de sustrato necesaria para alcanzar la velocidad máxima es menor. (4)

A continuación se presenta una gráfica del efecto de la concentración del sustrato en la velocidad de reacción enzimática, en la cual se representa la forma gráfica de obtener el valor de K_m . (Gráfica V.1). (4)



Gráfica V.1.

Si en una reacción enzimática se mantiene constante la cantidad de sustrato y se incrementa paulatinamente la concentración de enzima, la velocidad de la reacción aumenta progresivamente, debido a que existe un exceso de sustrato que puede ser transformado por la enzima. Al continuar aumentando la cantidad de enzima en el medio, aumenta la formación del complejo enzima-sustrato, con lo que la velocidad de la reacción irá ascendiendo en forma directamente proporcional al incremento de la enzima, siendo la concentración de la enzima un factor limitante de esta reacción. (4)

Si las moléculas tienen suficiente energía cinética para reaccionar, las colisiones entre ellas determinan la velocidad de la reacción. Si algunas moléculas tienen insuficiente energía para reaccionar, el incremento de la temperatura, que aumenta su energía cinética, elevará la velocidad de la reacción debido al aumento en la frecuencia de las colisiones. (2,4)

Por lo general el coeficiente termico (Q 10) es alrededor de 2, o sea, se duplica la velocidad de la reacción por cada 10°C de aumento de temperatura, Sin embargo, cuando la temperatura se aumenta más allá de cierto límite se puede provocar la desnaturalización térmica de la enzima.

Desde los primeros trabajos de Wroblewsky y Lactus (9) se han empleado muchas reacciones enzimáticas para el diagnóstico de enfermedades en todas las especies animales comunes. La alteración en la concentración de una enzima, ya sea en el suero o en un tejido nos indica uno o más de uno de los siguientes procesos:

1. Elevación debida a la necrosis de las células productoras de enzimas.
2. Alteración en la permeabilidad de la membrana celular por algún accidente.
3. La elevación de una enzima indica también, carencia de facultad del cuerpo para eliminar la enzima.
4. Las células pueden ser incapaces de sintetizar la enzima.
5. Aumento en la producción de la enzima.

Cualquiera que sea la causa, las diferencias en los niveles plasmáticos o séricos ayudan a señalar el área del proceso patológico. La situación ideal desde el punto de vista diagnóstico sería encontrar una enzima específica para cada tejido, pues cualquier alteración en su concentración podría identificar el lugar de la lesión (6). Aunque la enzima se halle en muchos tejidos, puede tener en un tejido específico tan grande que cualquier lesión en él, cause una elevación mayor que en todo el resto combinado.

Para la determinación de una enzima hay tres métodos:

1. Medición de la ~~desaparición~~ desaparición del sustrato. La cantidad que desaparece en un tiempo dado se mide en condiciones adecuadas a la actividad de la enzima (amilasa).
2. Medición de un producto final. El sustrato es conjugado con algún producto final fácilmente medible o la enzima cataliza una reacción que resulta en un producto que puede valorarse también con facilidad. Esta reacción esta en condiciones tan cercanas a lo ideal como sea posible en un tiempo específico. La concentración después del tiempo predeterminado es la medida de la actividad enzimática (fosfatasa alcalina del suero, lipasa y catalasa).
3. Medición del cambio de concentración de una coenzima (molécula orgánica no proteica que actúa asociada a la enzima para que ésta pueda ejercer su acción) o cofactor (substancia que ayuda a la enzima a ejercer su acción, normalmente se trata de un inorgánico) a espacios de tiempo especificados; el grado de cambio es la medida de la actividad enzimática (deshidrogenasa isocitrica unida a NAD). (8)

En los apéndices B 10,11 se muestra una relación de las enzimas más frecuentemente determinadas en los animales y valores medios de algunas enzimas en suero de sangre normal de animales domésticos.

El jugo pancreático contiene varias peptidasas, las principales son la tripsina, quimiotripsina y carboxipeptidasa que actúan sobre las proteínas, además contiene la amilasa pancreática que desdobla los carbohidratos, y una lipasa pancreática, que actúa sobre las grasas. Otras enzimas producidas por el páncreas son la ribonucleasa, desoxiribonucleasa, colagenasa, elastasa y al menos dos ~~esterasas~~. (1)
(Consultar apéndice B 9)

La amilasa es una glucosidasa que hidroliza las uniones glucosídicas de los polisacáridos. Hay una alfa-amilasa (que rompe la unión glucosídica a la mitad de la cadena del polisacárido y se califica de endoamilasa) y la beta-amilasa (que separa unidades de maltosa, una a la vez, por el extremo no reductor de la cadena y se distingue como exoamilasa). La amilasa pancreática desdobla el almidón y el glucógeno; el producto final es el disacárido maltosa, que es convertido en el monosacárido glucosa por el jugo intestinal.

La lipasa pancreática se secreta parcialmente inactiva; las sales biliares obran como activadores, el glicocolato de sodio con mayor intensidad que el taurocolato sódico. La lipasa hidroliza los ésteres de ácidos grasos de cadena larga, originando glicerol y ácidos grasos. Con la lipasa la hidrólisis intermedia en mono y diglicéricos es común, y quizás muchos lípidos son absorbidos en esta forma especialmente como monoglicéridos. Se requiere un medio alcalino para la acción de la lipasa.

El estudio de la función hepática es complicado por las diversas actividades metabólicas y por la singular potencia regenerativa del órgano. En las enfermedades hepáticas, según el tipo y grado de lesión se alteran varias funciones del hígado y se necesitan una serie de pruebas y un examen clínico muy atento para hacer un diagnóstico.

El curso y el pronóstico de la enfermedad requiere la ejecución de pruebas seriadas, como la determinación de la concentración de enzimas séricas tales como, fosfatasa alcalina sérica (FAS), ~~transaminasas~~ (TGS, TCS), deshidrogenasa isocítica (DIC), arginasa sérica, onlinesterasa sérica, carboniltransferasa de la ornitina (CIO), deshidrogenasa del sorbitol. Dichas determinaciones requieren el uso de reactivos específicos de alto costo.

Otra enzima que se presenta en mayor cantidad en el hígado es la catalasa, cuya acción la ejerce en los organelos llamados peroxisomas presentes en el hepatocito. Durante diversos procesos como es la degradación de aminoácidos y bases púricas o en el transporte electrónico del oxígeno molecular en la cadena mitocondrial, se pueden formar ciertos productos al ocurrir reducción parcial del oxígeno. Los más importantes son el anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). (7)

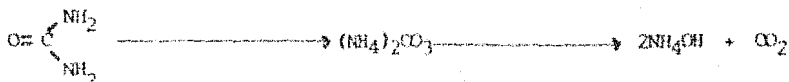
El superóxido que es altamente tóxico es degradado por la superóxido dismutasa dejando como producto H_2O_2 , el cual es atacado a su vez por la catalasa dando como productos agua más oxígeno. (7)

Los ruminantes cuentan con una microflora capaz de llevar a cabo la hidrólisis de la urea por medio de la enzima ureasa y liberan amoníaco. El amoníaco desprendido es utilizado para sintetizar aminoácidos, proteínas y otros compuestos nitrogenados en el rumen.

Las ureasa se utiliza en laboratorios clínicos para hacer la determinación cuantitativa de urea. Aunque dicha enzima no es muy común en la naturaleza, ha tenido gran importancia en el desarrollo de la enzimología moderna, las investigaciones sobre la ureasa han permitido deducir algunos principios importantes de las reacciones enzimáticas, por ejemplo: La participación de los grupos SH

(sulfhidrilos) en las catálisis; la ureasa posee tres o cuatro grupos SH activos; sólo son un representante de un gran número de enzimas cuya actividad depende de la existencia de grupos sulfhidrilos intactos en la cisteína formando parte de la cadena polipeptídica.

La ureasa también se puede aislar del frijol y haba de soya para probar su actividad en la siguiente reacción de hidrólisis:



V.4.2. OBJETIVOS

1. Aislar la enzima ureasa de frijol de soya.
2. Modificar los factores de pH , tiempo, concentración de sustrato, concentración de la enzima y temperatura para conocer sus efectos en la actividad enzimática.
3. Medir la actividad de la enzima ureasa, titulando el producto final obtenido (amoníaco) con un ácido fuerte (ácido clorhídrico).
4. Graficar los resultados obtenidos para observar el tipo de curva que se obtiene al modificar las diferentes variables.
5. Observar la influencia de inhibidores en las reacciones enzimáticas.
6. Medir colorimétricamente la amilasa en suero y orina.
7. Medir mediante titulación del ácido graso liberado (ácido oléico) la lipasa en suero.

V.4.3. ACTIVIDAD DE UREASA EN FUNCION DE: pH, TEMPERATURA, CONCENTRACION DE SUBSTRATO Y CONCENTRACION DE ENZIMA (3).

V.4.3.a. Material y Reactivos.

- | | |
|-----------------------------|---|
| 1 baño maría | Solución de urea 0.25M (250micromoles por ml). |
| 1 termómetro | Rojo de metilo 0.04% como indicador |
| 2 buretas | Buffer Tris-HCl 7.2 |
| 1 gradilla | HCl 0.1N (1ml= 50 micromolas de urea) |
| 3 pipetas de 5 y 10 ml | Extracto crudo de ureasa (extracto hidroalcalino |
| 20 tubos de ensayo | de harina de soya, alcohol al 30%. Pesar 40g., de |
| 4 matraces erlenmeyer 50 ml | harina de soya y agregar el alcohol al 30% hasta |
| 1 soporte universal | 100ml. Agitar durante una hora, decantar y/o |
| 2 pinzas para bureta | centrifugar para obtener sólo el sobrenadante |
| 1 baño de hielo | que contiene la enzima). |
| | Bicloruro de mercurio al 1% |
| | Buffers pH 5 de acetato; pH 6.0 y 7.2 de fosfato; |
| | pH 8.5 de Tris; pH 10 de carbonato. Todos :0.2M. |

V.4.3.b. Método

Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de la reacción.

1. Preparar de una serie de tubos de ensayo perfectamente lavados, como sigue:

	1	2	3	4	5	6
Urea 0.25 M (ml.)	0.5	1.0	2.0	5.0	7.5	7.5
Buffer pH 7.2	11.5	11.0	10.0	7.0	4.5	4.5
HgCl ₂ 1% gotas	---	---	---	---	---	IV

2. Incubar todos los tubos a baño maría a 50°C, 5 minutos.
3. Agregar a cada tubo 0.5 ml. de solución extracto de ureasa.
4. Incubar todos los tubos a 50 C durante 5 minutos.
5. Agregar a los tubos 1 a 5, cuatro gotas de HgCl₂.
6. Con una pipeta, pasar 5 ml. del contenido del tubo 6 (blanco) a un matraz Erlenmeyer de 50 ml. Agregar 2 gotas de indicador rojo de metilo, que vira de amarillo en medio alcalino, a rojo en medio ácido, tomando como punto final de la titulación cuando el contenido del matraz adquiera un color intermedio (canela) que debe ser igual para todas las titulaciones de la serie.
7. Titular con HCl 0.1N agregándolo de la bureta poco a poco al mismo tiempo que se mueve el matraz para mezclar. Anotar los mililitros de HCl gastados que constituyen la titulación del blanco.
8. Repetir el procedimiento descrito en los incisos, 5, 6 y 7 para los tubos 1, 2, 3, 4 y 5. Anotar los mililitros de HCl 0.1N gastados en cada caso.
9. Restaría titulación del "blanco" de cada uno de los valores obtenidos y construya una tabla con los siguientes valores.

Tubos	Conc. inicial de urea (micro moles/l. en el medio)	Valores de titulación corregidos	Micromoles de urea hidrolizada.

La solución de urea contiene 250 micromoles por mililitro por lo tanto, cada tubo tendrá en el volumen total de 12.5ml.

$$\frac{250 \times \text{ml. de sol. } 0.25M \text{ de urea}}{12.5} = \text{Micromoles de urea inicial por ml. de medio.}$$

Cada molécula de urea da origen a dos iones de amonio, que reaccionan con el HCl 0.1N que contiene 100 micromoles por ml., por lo que un ml. de esta solución sale $100/2 = 50$ micromoles de urea.

La titulación corregida se obtiene restando la "titulación del blanco" de los valores obtenidos en los demás tubos, y esta cifra multiplicada por 50 son los valores de urea hidrolizada y transformada a amoníaco.

10. Hacer la gráfica de concentración de sustrato contra velocidad de reacción (micromoles de urea hidrolizada) y determine el valor de Km.
11. Hacer la gráfica tomando los valores recíprocos. (Gráfica de Lineweaver-Burke).

Efecto de la concentración de enzima sobre la velocidad de reacción.

1. Disponer de una serie de tubos como sigue:

	1	2	3	4
Urea 0.25 (ml.)	7.5	7.5	7.5	7.5
Buffer pH 7.2 (ml.)	3.5	3.5	3.5	3.5
H ₂ O dest. (ml.)	0.9	0.7	0.5	--

2. Incubar todos los tubos en baño maría a 50 C, durante 5 minutos.
3. Agregar a cada tubo respectivamente:

Ureasa (ml.)	0.1	0.25	0.5	1.0
--------------	-----	------	-----	-----

4. Incubar todos los tubos en baño maría a 50 C, 30 minutos.
5. Agregar a cada tubo cuatrogotas de HgCl₂.
6. Titular con HCl 0.1N en la misma forma que el experimento anterior. Puede utilizarse el mismo valor de "titulación del blanco" o preparar uno expresado.
7. Realizar la gráfica de concentración de enzima (ml.) contra la velocidad de reacción.

Efecto de La temperatura sobre la velocidad de reacción.

1. Disponer de una serie de 4 tubos.

	1	2	3	4
Urea 0.25M (ml.)	7.5	7.5	7.5	7.5

Continuación

	1	2	3	4
Buffer pH 7.2(ml.)	4.5	4.5	4.5	4.5
Baño 5 minutos a temperatura °C	0°	22°	50°	80°
Ureasa (ml.)	0.5	0.5	0.5	0.5
Incubar 30 min. a	0°	22°	50°	80°
HgCl ₂ (gotas)	IV	IV	IV	IV

2. Titular como en los experimentos anteriores restando el valor del blanco, que puede ser el mismo u otro preparado expresado.
3. Hacer una gráfica de temperatura contra micromoles de urea hidrolizada y calcular el Q₁₀ para distintos intervalos de temperatura entre 10 y 20°C, entre 20 y 30°C, etc.
Coeficiente de temperatura Q₁₀ o relación de Van't Hoff, es la relación en que aumenta la actividad enzimática por cada 10°C de temperatura.

Efecto del pH sobre la velocidad de reacción enzimática.

1. Disponer de una serie de tubos como sigue:

	1	2	3	4	5
Urea 0.25 (ml.)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Buffer (7ml.)	pH 5	pH 6	pH 7.5	pH 8.5	pH 10

2. Incubar en baño maría a 50 C, 5 minutos.
3. Agregar a cada tubo 0.5 ml. de solución de ureasa.
4. Incubar todos los tubos en baño maría 50 C, 30 min.
5. Agregar a cada tubo 4 gotas de solución de HgCl₂.
6. Titular en la forma acostumbrada, restando el valor del blanco de los experimentos anteriores, despreciando las diferencias que pudieran deberse al valor de titulación de los buffers de distinto pH de 7.2.
7. Determinar las micromolas de urea hidrolizada y haga una gráfica contra pH.

V.4.4. MEDICIÓN DE LA AMILASA EN SUERO Y ORINA (SMITH Y ROC, 1957) (5)

V.4.4.a. Material y Reactivos

- 2 tubos de ensayo grandes (150 x 16 mm)
- 1 pipeta de 2 ml. y 1 de 1 ml.
- 1 micropipeta (0.1 ml.)
- 2 matraces volumétricos de 200 ml.
- 1 gradilla
- 1 baño maría
- 1 termómetro
- 1 espectrofotómetro

Solución de sustrato de almidón 300 mg.

Solución de amortiguador de fosfato con cloruro de sodio, 0.06M, pH 7.2, 0.05M respecto a cloruro de sodio.

Acido clorhídrico 1.0N

Reactivo de Yodo (yoduro de potasio puro)

Agua destilada

Material Biológico

1.0 ml. de orina o bien 1.0 ml. de suero.

V.4.4.b. Método

1. Dos tubos de ensayo de 150 x 16 mm. se rotulan problema y testigo; con una pipeta, vertir en cada tubo 2.0 ml. de sustrato de almidón caliente. Ambos tubos se ponen en el baño a 37°C hasta igualar la temperatura.
2. Con micropipeta, y una técnica de lavado cuidadoso, añadir 0.1 ml. de suero, plasma u orina al tubo problema, ambos tubos se incuban 30 minutos a 37°C.
3. Preparar dos matraces volumétricos de 200 ml., con los rótulos del caso, y añadir a cada uno 100 ml. de agua destilada y 3.0 ml. de ácido clorhídrico 1.0N. Los contenidos de los tubos se pasan a los matraces correspondientes, enjuagando cuatro veces cada tubo con agua destilada, y pasar estos lavados a los matraces.
4. Añadir 0.1 ml. de suero, plasma u orina al matraz testigo. Añadir 1.0 ml. de reactivo de yodo a ambos frascos, y se mezcla por agitación horizontal; aforar ambos matraces con agua destilada, y mezclar.
5. Esperar 15 minutos antes de leer las absorbancias del problema y del testigo a 620 m μ , estableciendo el cero de absorbancia con agua destilada.
6. Los cálculos a realizar son los siguientes:

$$\frac{\text{Absorbancia del testigo} - \text{absorbancia del problema}}{\text{Absorbancia del testigo}} \times \frac{6}{10} \times \frac{100}{0.1} =$$

$$\frac{\text{Absorbancia del testigo} - \text{absorbancia del problema}}{\text{Absorbancia del testigo}} \times 600 = \text{unidades de amilasa por 100 ml.}$$

V.4.4.c. Notas

Si la absorbancia de la solución problema se encuentra 0.1 y 0.02, se diluye la muestra con un volumen igual de solución salina y se repite la medición; el resultado final tendrá que multiplicarse por dos. Si la absorbancia es menor de 0.02 se diluye cuatro veces la muestra con solución salina, y se repite la prueba multiplicando el resultado final por cuatro.

V.4.5. MEDICION DE LA LIPASA EN SUERO (CHERRY Y CRANDALL, 1932) (5)

V.4.5.a. Material y Reactivos.

2 matraces Erlenmeyer de 125 ml.
1 pipeta de 0.5 ml., 1 de 1 ml., 1 de 2 ml. y 2 de 5 ml.
1 baño maría
1 termómetro
1 bureta de 25 ml.
1 soporte universal con pinza para bureta.
Parafilm.

Substrato de aceite de oliva
Amortiguador de fosfato, pH 7.0
Hidróxido de sodio 0.05 N.
Indicador de Timolftaleína al 1%

Material Biológico

2 ml. de suero.

V.4.5.b. Método

1. Preparar dos matraces de Erlenmeyer de 125ml, rotulados "problema" y "blanco". En el matraz problema, pipetear 1.0 ml. de suero, 0.5 ml. de amortiguador de fosfato, 2.0 ml. de substrato de aceite de oliva y 3.0 ml. de agua destilada. En el matraz blanco pipetear 1.0 ml. de suero, 0.5 ml. de amortiguador, 2.0 ml. de substrato, 3.0 ml. de agua y 3.0 ml. de alcohol etílico al 95 por 100. Se agita para mezclar, se cubre con Parafilm y se incuba en el baño maría a 37°C durante 16 a 18 horas. (Es conveniente incubar toda la noche).
2. Sacar los matraces del baño; se añaden 3.0 ml. de alcohol etílico al 95 por 100 al matraz problema; se añaden cinco gotas de indicador de timolftaleína a ambos matraces; luego se titula hasta un vire azul con solución 0.05 N de hidróxido de sodio, contenida en una bureta de 5.0 ml.
3. Los cálculos a realizar son los siguientes:

Mililitros de NaOH 0.05 N para el problema - mililitros NaOH para el blanco = unidades de actividad de lipasa.

V.4.6. CUESTIONARIO

1. ¿Qué es y cómo funciona una enzima?
2. Explique el efecto resultante en su experimento, al modificar los factores de pH, t, [s], [e], y T^o a la velocidad de reacción catalizada por la ureasa.
3. ¿Qué es un inhibidor enzimático?
4. ¿Qué tipos de inhibición enzimática conoce? Explique cada uno de ellos.
5. ¿Qué tipo de inhibición se produce con el bicloruro de mercurio?
6. ¿Cuál es el fundamento por el cual se puede realizar la medición de la amilasa ya sea en orina o en suero?
7. ¿Cuál es el fundamento por el cual se puede realizar la medición de la lipasa en suero mediante titulación?
8. En Medicina Veterinaria ¿por qué puede ser de utilidad la medición de la amilasa y la lipasa?
9. Mencione 5 enzimas que sean valor diagnóstico en Medicina Veterinaria?

V.5. CARBOHIDRATOS

V.5.1. INTRODUCCION

Los carbohidratos se pueden definir químicamente como derivados aldehídicos o cetónicos de alcoholes superiores polivalentes (con más de un grupo OH o como compuestos que por hidrólisis dan estos derivados). En las células animales los carbohidratos en la forma de glucosa y glucógeno sirven como fuente de energía para las actividades vitales. Algunos desempeñan funciones altamente específicas (la lactosa en la leche, la glicosa en ciertos lípidos y la ribosa en las nucleoproteínas de las células). (10)

La glucosa es el azúcar principal de la sangre que sirve a los tejidos como la principal fuente de energía química del organismo, circula en la sangre en forma libre y su concentración en dicho líquido constituye la glicemia, esta regulación fisiológicamente por hormonas, las cuales de acuerdo a su función se han clasificado como:

1. Hiperglucemiantes. Glucagon, adrenalina, tiroxina y glucocorticoides
2. Hipoglucemiante. Insulina.

Entre los factores que aumentan la concentración de glucosa circulantes tiene a los siguientes:

- a) La ingestión de alimentos con un alto contenido de carbohidratos.
- b) La administración de glucosa directamente al torrente circulatorio (venoclisis).
- c) El estado de stress estimula el mecanismo simpático suprarrenal que activa el proceso en cadena de la glucoenólisis.

Un ayuno prolongado produce un estado de hipoglucemia que suele provocar manifestaciones clínicas graves.

Los bovinos presentan normalmente una baja glicemia fisiológica que se debe a la fermentación microbiana de los carbohidratos en el rumen (celulosa y almidón) en ácidos grasos volátiles: Acético, propiónico y butírico, los cuales representan su principal fuente energética. (4)

La hiperglucemia permanente con 130 o más miligramos de glucosa por 100 ml. de sangre en ayunas, es característica de la Diabetes mellitus (3), enfermedad que se caracteriza también por una respuesta hiperglucémica exagerada a la glucosa exógena; esto es poca tolerancia a la glucosa.

La incidencia de la diabetes entre los animales es más alta en el perro. La frecuencia estimada es de 1:200 a 1:800 y de 1:800 a 1:1,500 en gatos. La diabetes es más común en perros obesos, viejos (8 años o más); en hembras especialmente ovariectomizadas, y en algunas razas, como: Acrocefálicas, en los dachshund (9) (11). La hiperglucemia puede caracterizar a trastornos endocrinos graves relacionados con la hipersecreción de hormona del crecimiento, adrenocorticotrópica, glucocorticoides, epinefrina o tiroxina. Un alto grado de hiperglucemia se encuentra a veces en animales moribundos como en la fase terminal de la toxemia gravídica de la oveja. Los efectos de la hiperglucemia son que al retrasar el umbral renal de la glucosa, el cual en los bovinos es de 80 a 130 mg. de glucosa por cada 100 ml. de sangre, se produce glucosuria, misma que conduce a la poliuria y la polidipsia. (8)

Los estados hipoglucémicos están asociados a una diversidad de estados patológicos en las diferentes especies domésticas. Se ha estudiado que los niveles de glucosa sanguínea en casos de acetonemia es de concentración de glucosa de menos de 45 mg. por cada 100 ml. en el 75% de los casos. (1,6)

Los efectos de la hipoglucemia son influidos por la forma en la cual ésta se origina, por ejemplo: la hipoglucemia resultante de la liberación o administración de insulina conduce a la pérdida de glucosa solamente en los tejidos insensibles a la insulina como el cerebro y la glándula mamaria en los ruminantes, mientras que las células de los tejidos sensibles como el hígado, músculo y tejido adiposo, tienen mayor absorción de glucosa. Por tanto, sólo los tejidos sensibles a la insulina manifiestan signos clínicos de función alterada (5).

Las manifestaciones clínicas de la hipoglucemia dependen no solamente del grado de intensidad, sino también de la rapidez de su curso y de su duración.

En la medición de la glucosa en sangre es necesario distinguir tres términos. Por glucosa sanguínea, se entiende la concentración en la sangre de una sustancia química específica, la glucosa. El azúcar en sangre incluye, además de glucosa otros azúcares como lactosa, fructosa y pentosas. El término que se aplica a todos los compuestos de la sangre susceptible de reducir los iones cúpricos en solución alcalina caliente es el de sustancias reductoras en sangre; incluyen no solamente azúcares, sino también glutatión y ergotina, glucuronidos, compuestos de ribosa, ácido ascórbico y ácido úrico. Con frecuencia se utilizan indistintamente los términos azúcar y sustancias reductoras en sangre, generalmente para designar lo que corresponde a la primera terminología. (2)

Aún cuando las mediciones habituales de glucemia se realizan por un método automático, se necesitan todavía un método manual rápido y exacto en caso de urgencia. En la mayor parte de los estudios clínicos puede bastar todavía algunas de las técnicas antiguas inespecíficas. El método de Folin-Wu recurre a la reducción de iones cúpricos en solución alcalina caliente, por efecto de la glucosa y otras sustancias reductoras de un filtrado de sangre sin proteínas. A su vez, el óxido cuproso que se forma durante esta reacción reduce el ácido fosfomolibdico incoloro a azul de molibdeno; el color se mide por colorimetría. (7)

Otro método para la medición de glucosa en sangre que puede ser recomendado para empleo habitual o de urgencia es el Dubowski el cual se fundamenta en lo siguiente: Se calienta con una solución de una amina aromática primaria la ortotoluidina, en ácido acético glacial, glucosa de un extracto sin proteínas preparado a partir de sangre completa, suero o plasma. Se obtiene un color verde, probablemente debido a glucosilamina, y la absorbancia de la solución presenta una relación lineal con la concentración de glucosa entre amplios límites. (7)

Para conocimiento de los niveles de glucosa sanguínea en las diferentes especies animales domésticas, ver apéndice B I.

Normalmente no pueden encontrarse cantidades manifiestas de sustancias reductoras en la orina, salvo en la glucosuria renal. La sustancia reductora más común en la orina es la glucosa; su presencia puede indicar glucosuria renal, diabetes mellitus, trastornos tiroideos, infusión intravenosa de glucosa o aumento de presión intracraneal. A veces aparecen otros azúcares en la orina como lactosa, fructosa, pentosas y galactosa. (8)

La prueba cualitativa de benedict no es una prueba específica de los azúcares, ya que resulta positiva con casi cualquier sustancia reductora si se encuentra en grandes cantidades, por lo que al usarla en exámenes de orina nos da resultados aproximados de la cantidad de azúcar u otra sustancia reductora que contenga la muestra. La presencia de glucosa u otros azúcares reductores se establecen por métodos específicos como por ejemplo:

- a) Análisis enzimático para la glucosa, utilizando tiras de papel impregnadas de las enzimas e indicadores correspondientes (oxidasa de glucosa).
- b) Análisis químico para la glucosa como la prueba de la osazona que proporciona datos confiables cuando los niveles del azúcar son superiores a 0.25 a 0.5%.
- c) Análisis químico para la fructosa con la prueba de Selivanoff con resorcinol al 0.5% en ácido clorhídrico al 33%.
- d) La prueba de Bial para las pentosas, la prueba del ácido mático tanto para la galactosa y lactosa, etc. (7)

V.5.2. OBJETIVOS

1. A partir de una muestra de sangre obtener un filtrado libre de proteínas (Filtrado de Folin).
2. Determinar la concentración de glucosa del filtrado por colorimetría con el método de Folin-Wu.
3. Determinar la concentración de glucosa del filtrado por el método de Dubowsky.
4. Verificar en apéndice B I, si los valores obtenidos corresponden a los niveles normales según la especie estudiada.

V.5.3. DETERMINACION CUANTITATIVA DE GLUCOSA POR EL METODO DE FOLIN - WU.

V.5.3.a. Material y Reactivos

1 gradilla	1 embudo
1 matraz Erlenmeyer de 125 ml.	2 pipetas de 10 ml.
1 tubo de Folin	3 pipetas de 5 ml.
1 tubo de ensaye	1 pedazo de papel filtro.

Filtrado de Folin:
Acido sulfúrico concentrado
Tungstato de sodio al 10%

Determinación:
Solución cuproalcalina
Solución fosfomolibdica

Muestra Biológica

Sangre de bovino 1 ml.

V.5.3.b. Método

Filtración de Folin.

1. Colocar en el matraz Erlenmeyer 1 ml. de sangre dejándola escurrir lentamente.
2. Añadir al matraz 8 ml. de ácido sulfúrico N/12.
3. Mezclar perfectamente para lograr la hemólisis, ésta se nota cuando aparece un color café oscuro. Deja reposar 2 minutos.
4. Agregar 1 ml. de tungstato de sodio al 10%. Mezcla suavemente hasta la aparición de un precipitado color chocolate. Deja reposar 5 minutos.
5. Tomar el papel filtro y realiza el filtrado de la solución anterior. Este debe ser completamente transparente; de no ser así, toma el filtrado, regresa al matraz y vuelve a filtrar con un pedazo nuevo de papel filtro.

En el filtrado obtenido se encuentran todos los componentes solubles de la sangre, excepto las proteínas y las grasas que precipitan junto a ellas, además de ciertos iones cuya concentración se modifica por los reactivos.

El calcio por su ionización con el anticoagulante, forma un compuesto soluble no ionizado.

Por estas razones el filtrado sólo se usa para la determinación de urea, ácido úrico, creatinina y cloruros; y en este caso, para determinar glucosa.

La cantidad del filtrado no tendrá el volumen total al que se llegó al añadir los reactivos, pues parte quedó embebido en el precipitado y el papel filtro; pero como se mezcló perfectamente antes de filtrar, el líquido obtenido es una muestra representativa de sangre diluida 1 a 10.

Determinación cuantitativa de glucosa.

1. En un tubo de Folin coloca 1 ml. del filtrado y añade 1 ml. de la solución cuproalcalina.
2. Colocar el tubo en un vaso de precipitado con agua hirviendo durante 8 minutos.
3. Después enfría el tubo al chorro de agua, cuidando de no agitarlo y que no le entre agua.
4. Agregar al tubo 1 ml. de la solución fosfomolibdica. Espera 1 minuto y añádele agua destilada hasta la marca de 12.5 ml. Mezcla perfectamente por inversión.

5. Determinar la densidad óptica de tu muestra. Podrás obtener la concentración de la glucosa en la muestra de sangre utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Lectura de la incógnita}}{\text{Lectura del patrón}} \times \text{mg. de glucosa en el patrón} \times \frac{100}{100 \text{ ml. de sangre}} = \text{mg. de glucosa en 100 ml. de sangre}$$

V.5.4. DETERMINACION CUANTITATIVA DE GLUCOSA POR EL METODO DE LUBOWSKY.

V.5.4. Material y Reactivos.

- | | |
|---------------------------|---------------------|
| 1 micropipeta de 0.1 ml. | 2 tubos centrifuga |
| 1 pipeta de 2 ml. | 1 centrífuga |
| 4 pipetas de 1.0 ml. | 1 baño maría |
| 1 pipeta de 5.0 ml. | 1 espectrofotómetro |
| 4 tubos de ensaye grandes | papel aluminio |
| 1 gradilla | |

- | | |
|--|--------------------|
| Acido Tricloracético al 3% p/v | Material Biológico |
| Reactivo de o-toluidina | |
| Solución patrón concentrada de glucosa | 1 ml. de sangre |
| Patrón diluido de glucosa | |
| Agua destilada | |

V.5.4.b.

1. Con una micropipeta de 0.1 ml. de tipo lavado, añadir 0.1 ml. de sangre completa, suero o plasma, a 1.9 ml. de ácido tricloracético al 3 por 100 p/v, en un tubo de 100 por 13 mm. Mezclar y dejar reposar cinco minutos cuando menos, y se centrifuga durante 10 minutos a 2 500 rpm.
2. Preparar tres tubos de 16 por 125 o 150 mm, que se rotulan problema, blanco y patrón
3. Con una pipeta volumétrica de 1.0 ml., pasar 1.0 ml. de sobrenadante transparente del paso 1 al tubo problema. En el tubo blanco poner 1.0 ml. de agua destilada, y en el tubo patrón, 1.0 ml. de solución patrón diluida.
4. A los tres tubos, añadir 5.0 ml. de reactivo de o-toluidina. Por la naturaleza corrosiva del reactivo, es aconsejable utilizar algún tipo de pipeta automática.
5. Mezclar por agitación lateral cuidadosa; tapar los tubos con papel de aluminio, y calentar en agua hirviendo durante 10 minutos.
6. Enfriar bajo la llave del agua durante cuatro minutos.
7. Leer las absorbancias del problema y del patrón a 630 m μ en el espectrofotómetro, estableciendo la absorbancia cero con el blanco.
8. Los cálculos a realizar son los siguientes:

$$\frac{\text{Absorbancia del problema}}{\text{Absorbancia del patrón}} \times 200 = \text{mg. de glucosa por 100 ml.}$$

V.5.5 CUESTIONARIO

1. Explique qué es glucosa y por qué es importante su medición en los animales.
2. Explique cuál es el fundamento del método Folin-Wu, para la cuantificación de glucosa.
3. Explique en qué se fundamenta el método de Dubowsky para cuantificar glucosa en sangre.
4. Mencione qué otros métodos conoce para la cuantificación de glucosa y explique brevemente.
5. Explique brevemente 2 padecimientos que estén relacionados con hiperglucemia e hipoglucemia.
6. Mencione qué otros azúcares pueden ser cuantificados por métodos sencillos de laboratorio.

V.6. LÍPIDOS

V.6.1. INTRODUCCION

Los lípidos son sustancias orgánicas insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos (éter, acetona, cloroformo). Se incluyen en el grupo las grasas los ácidos grasos, los esteroides (colesterol), las ceras, varios complejos (fosfolípidos y lipoproteínas), las vitaminas A,D,E y K, sales biliares y cuerpos cetónicos.

Las fracciones principales de los lípidos plasmáticos son los fosfolípidos, los triglicéridos, el colesterol y sus ésteres. La mayoría de ellos están asociados a globulinas alfa y beta. Una pequeña fracción, que tiene un recambio rápido, los ácidos grasos no esterificados (ácidos grasos libres), están unidos a albúmina. En los ruminantes hay ácidos grasos de cadena corta (volátiles) en forma de iones.

La determinación de grupos de lípidos, por ejemplo, los ácidos grasos libres es relativamente sencilla y ejecutada con frecuencia en los laboratorios clínicos. La diferenciación y valoración de lípidos individuales o de grupos restringidos, por ejemplo, de una serie de ácidos grasos, es mucho más difícil actualmente sólo se realiza en procesos de investigación (1,2,6,7)

El término de ácidos grasos libres puede causar confusión cuando se trata de herbívoros, especialmente ruminantes, animales en los que existe una fracción apreciable y fisiológicamente importante de ácido grasos: acético, propiónico y butírico, en forma de iones carboxílicos, libres de portadores proteínicos (13). Los ácidos grasos "libres" están unidos a la albúmina.

Para hablar con propiedad los términos ácidos grasos no esterificados, AGNE y ácidos grasos libres, AGL; no son sinónimos. La segunda designación debería reservarse a la pequeña fracción que no está unida a proteínas plasmáticas.

La concentración de AGNE plasmáticos, que indica en general la tasa de movilización de grasa del tejido adiposo disminuye si aumenta la glucosa en la ración o si se administra insulina y aumenta con la privación de alimento y con la administración de epinefrina, hormona del crecimiento, prolactina, tiroxina y heparina (4, 8, 12).

Los AGNE plasmáticos son un signo de que la grasa está siendo catabolizada disminuyendo la utilización de carbohidratos, mecanismo importante en el concepto de homeostasis calórica (3). Es, probablemente, el índice más importante del estado de nutrición de un animal.

Las concentraciones elevadas de AGNE se han asociado a diabetes mellitus, hipertiroidismo, cirrosis hepática e intoxicación con tetracloruro de carbono. Se ha encontrado que el nivel de los AGNE plasmáticos en fetos humanos y cvinos término contienen aproximadamente 1/5 del nivel materno de AGNE plasmáticos y este nivel aumenta cinco veces a los 30 minutos después del parto (14, 15).

Un sencillo método colorimétrico como el descrito por Hancock, 1964, se puede realizar la medición de los AGNE del plasma, ya que se transforman en sales de cobre, (jabones de cobre), se extraen con cloroformo, y se miden por la reacción entre el cobre que han fijado y dietilditioiocarbomato de sodio. La absorbancia del producto coloreado se compara con la que produce una solución patrón de ácido palmítico. (10)

El colesterol pertenece al grupo de los esteroides por ser derivado del perhidrociclopentano *fenestran*, abunda particularmente en el tejido nervioso. Es intermediario en la biosíntesis de hormonas esteroidales, ácidos biliares y otros esteroides. Los principales sitios de su síntesis en el organismo, en orden de importancia son: hígado, corteza adrenal, testículo, ovario, intestino, tejido muscular, aorta y cerebro. (9, 11) (Consultar apéndice B 1)

Para los fines de la patología clínica, el colesterol se valora en el plasma como colesterol total, y a veces se divide en dos fracciones: "libre" y esterificado. El colesterol "libre" está ligado a lípidos y es precipitable con *digitonina*. Para obtener el colesterol esterificado se resta el colesterol libre a la medición de colesterol total. (11)

Existen varias técnicas para determinar la presencia del colesterol en una muestra. Una de ellas es el método de Bloer, mismo que se basa en la extracción del colesterol total y la precipitación de las proteínas del suero mediante el uso de la mezcla alcohol-éter, donde el alcohol precipita las proteínas y el éter extrae al colesterol. El solvente es evaporado y el residuo del colesterol junto con otros lípidos se solubiliza con cloroformo. La solución restante es tratada con el reactivo de Liebermann-Burchard. (11, 5)

La intensidad de color verde es proporcional a la cantidad de colesterol presente. En esta técnica la reacción es una prueba específica para los tres hidro-esteroides que presentan un doble enlace en el carbono número 5. Aparece un color verde intenso que en el caso del ergosterol es precedido por un color rojo transitorio. (11)

El colesterol ha recibido gran atención en medicina humana porque se halla implicado en la arterioesclerosis, pero su importancia en las enfermedades de los animales domésticos no ha sido aún demostrada.

Los ácidos acetoacético y *beta*-hidroxibutírico y sus respectivos productos de descarboxilación, acetona e isopropanol, forman el grupo denominado cuerpos cetónicos. Los resultados "cuantitativos" difieren de método a método. La importancia del total de cuerpos cetónicos es muy semejante a la de los lípidos totales: Un aumento simplemente muestra la necesidad de una determinación más específica. (10)

Por métodos comunes son virtualmente indescubribles la acetona y el isopropanol en la sangre de animales normales.

Cuando el metabolismo de la glucosa está trastornado como en la diabetes mellitus no tratada, las fiebre, la diarrea, vómitos y el ayuno, etc. se excretan en la orina, cantidades excesivas de productos intermediarios del metabolismo de las grasas, sobre todo ácido beta-hidroxibutírico y ácido acetoacético (ácido diacético). Esta última substancia se transforma lentamente en acetona cuando la orina se deja reposar a la temperatura ambiente. Una prueba rápida semicuantitativa que determina acetona más acetoacetato es la de nitroprusiato o prueba de Rothera. (10)

La concentración de cuerpos cetónicos en la sangre de mamíferos bien alimentados no excede normalmente de un mg/100 ml. (como equivalentes de acetona). Es algo más alta que esto en los ruidantes. La pérdida por la orina es generalmente menor de un mg. por 24 horas en el hombre. Cantidades más altas que las normales presentes en la sangre constituyen la cetonemia (hipercetonemia) o en la orina (cetonuria), respectivamente. A la situación global se le llama cetosis.

Los ácidos acetoacético y beta-hidroxibutírico son ácidos relativamente fuertes y son amortiguados cuando se encuentran en la sangre o en los tejidos. Si embargo, su excreción continúa a causa cierta pérdida del catión amortiguador (a pesar de la producción de amoníaco por los riñones), la cual causa disminución progresiva de la reserva alcalina, causando cetoacidosis. En vacas con cetosis subclínica, la prueba puede mostrar desde indicios hasta 4 unidades, en casos clínicos de cetosis bovina o de toxemia de la preñez, la prueba da valores de 2 a 10 unidades, rara vez mayores. (8)

La prueba de Rothera se fundamenta en que tanto la acetona como el ácido acetoacético producen un color púrpura con el nitroprusiato de sodio alcalino. La prueba permite reconocer acetona aún en dilución de 1 a 10,000 y el ácido diacético en dilución de 1 a 125,000. (10)

V.6.2. OBJETIVOS.

1. Llevar a cabo la extracción de ácidos grasos no esterificados de una muestra de plasma libre de proteínas.
2. Medir la concentración de los AGNE mediante la técnica de Duncombe.
3. Extraer el colesterol total a partir de una muestra de suero.
4. Utilizando el reactivo de Lieberman-Buchard que da un producto colorido, hacer la determinación colorimétrica del colesterol total.
5. Mostrar la presencia de cuerpos cetónicos en una muestra de orina usando la prueba de Rothera.
6. Comparar los valores obtenidos en las pruebas anteriores con los valores normales.

V.6.3. MEDICION DE LOS ACIDOS GRASOS NO ESTERIFICADOS DEL PLASMA.

V.6.3.a. Material y Reactivos

3 tubos centrifuga	1 varilla de vidrio fina
1 gradilla	3 tubos de ensayo
2 pipetas de 5 ml.	1 centrifuga
3 pipetas de 1.0 ml.	1 espectrofotómetro
1 pipeta Pasteur	

Cloroformo (grado reactivo lo más puro que sea posible)

Reactivo de cobre

Patrón concentrado de ácido palmítico

Patrón diluido de ácido palmítico.

Reactivo de dietilditiocarbamato.

Muestra Biológica.

1 ml. de plasma.

V.6.3.b. Método

1. Preparar tres tubos de centrifuga de 15 ml. con tapón de vidrio, que se rotulan problema, patrón y blanco. En cada uno se pipetea 2.5 ml. de reactivo de cobre.
2. En el tubo problema se pipetea 5.0 ml. de cloroformo y 0.5 ml. de plasma. En el tubo patrón se ponen 5.0 ml. de patrón diluido de ácido palmítico, y 0.5 ml. de agua destilada, en tubo blanco, 5.0 ml. de cloroformo y 0.5 ml. de agua destilada.
3. Tapar los tubos y se agita fuertemente durante dos minutos. Se centrifuga cinco minutos, a 3,000 rpm.
4. La capa superior se quita con una pipeta Pasteur de punta fina, en la forma más completa posible. Se inclina cuidadosamente el tubo de centrifuga, se afloja con cuidado el disco de proteínas con una varilla de vidrio fina, y mediante un movimiento de levantamiento muy ligero, se pone en contacto con la pared inferior del tubo inclinado; de esta manera, cuando se regresa lentamente el tubo a la posición vertical, el disco de proteínas queda pegado a la pared del tubo.
5. Pasar 3.0 ml. de la base cloroformica (inferior) de cada tubo de centrifuga a tubos de ensayo limpios y secos rotulados en forma correspondiente. Es indispensable que las pipetas utilizadas en este paso entren y salgan en la capa de cloroformo sin tocar las paredes del tubo; además se limpian cuidadosamente antes de vaciarse en los tubos de ensayo limpios.
6. A los tres tubos se añaden 0.5 ml. de reactivos de dietilditiocarbamato, y se mezcla con cuidado.
7. Las absorbancia del problema y del patrón se leen en cubetas de 1 cm. en el espectrofotómetro a 440 mμ, empleando el blanco para establecer la absorbancia cero.
8. Realizar los siguientes cálculos:

$$\frac{\text{Absorbancia del problema}}{\text{Absorbancia del patrón}} \times 0.06 \times \frac{1\ 000}{1} \text{ ueq/l} = \frac{\text{Absorbancia del problema}}{\text{Absorbancia del patrón}} \times 200 \text{ ueq/l}$$

V.6.4. DETERMINACION CUANTITATIVA DE COLESTEROL TOTAL MEDIANTE EL METODO DE LIEBERMAN-BUCHARD.

V.6.4.a. Material y Reactivos.

- 1 tubo centrífuga con tapón de hule o rosca
- 2 pipetas de 1 ml.
- 4 pipetas de 5 ml.
- 1 matraz de 50 ml.
- 3 tubos de ensaye
- 1 gradilla
- 1 centrífuga
- 3 matraces de 25 ml.

Mezcla alcohol-éter

Cloroformo seco (anhidro)

Reactivo de Lieberman-Buchard (40 ml. anhídrido acético y ácido sulfúrico 2 ml.)

Acido Sulfúrico

Solución de colesterol con cloroformo (10 mg. en 100 ml.)

Material Biológico.

Suero sanguíneo 1 ml.

V.6.4.b. Método

Extracción del colesterol

1. Colocar un tubo centrífuga 5 ml. de la mezcla alcohol-éter.
2. Agregar exactamente 0.2 ml. de suero, tapa el tubo y mezcla bien por agitación. Dejar reposar el tubo durante 5 minutos.
3. Centrifugar a 2,500 rpm. durante 5 minutos.
4. El sobrenadante que obtuviste al centrifugar pásalo al matraz de 50 ml. y evapora el solvente calentando el matraz sobre una parrilla eléctrica (a seguridad completa (cuidado es flamable)).
5. Enfriar el matraz y disuelve el residuo en 8 ml. de cloroformo anhidro. Agítase con suavidad.
6. En otro matraz pipetéense 8 ml. de la solución de colesterol patrón en cloroformo (con un total de 0.8 mg. de colesterol).
7. Preparar un blanco colocando 8 ml. de cloroformo seco en un tercer matraz.
8. Con una bureta , a cada uno de los 3 matraces añádase 4 ml. de reactivo de Lieberman-Buchard.
9. Mezclar bien, tápase y déjese a obscuridad durante 10 minutos.
10. Leer fotocolorímetro las muestras patrón y problema calibrando con el blanco y utilizando filtro rojo.
11. Calcular los miligramos de colesterol por 100 ml. de extracto.

V.6.5. DETERMINACION CUALITATIVA DE CUERPOS CETONICOS EN UNA MUESTRA DE ORINA

V.6.5.a. Material y Reactivos.

1 tubo de ensayo grande	1 pipeta de 2 ml.
1 gradilla	1 pipeta de 10 ml.
1 balanza analítica	

Nitroprusiato de sodio alcalino
Sulfato de amonio
Solución concentrada de hidróxido de amonio.

Material Biológico.

10 ml. de orina.

V.6.5.b. Método

1. En un tubo de ensayo se coloca un pequeño cristal de nitroprusiato de sodio alcalino.
2. Añadir 1 gr. de sulfato de amonio y 10 ml. de orina problema.
3. Mezclar bien.
4. Añadir 2 ml. de solución concentrada de hidróxido de amonio.
5. Si están presentes grandes cantidades de acetona, ácido diacético o ambos, se desarrolla un color púrpura intenso. Un color pálido o la falta de color constituyen una reacción negativa.

V.6.6. CUESTIONARIO

1. ¿Qué son los lípidos?
2. ¿Qué lípidos son de importancia diagnóstica?
3. ¿En qué se fundamenta la reacción del colesterol con el reactivo de Lieberman-Richard?
4. Menciona 3 padecimientos en los cuales están relacionados los lípidos.
5. Explique por qué se utiliza filtro rojo para determinar el colesterol del suero.

BIBLIOGRAFIA.

Soluciones Acuosas, Titulación y pH.

1. Alais, C.H.: Ciencia de la Leche, 1a, ed, Compañía Editorial Continental, España, 1971.
2. Harper, A.H.: Manual de Química Fisiológica, 7a. ed. Ed. El Manual Moderno, S.A., México, 1980.
3. Harvey, D.G.: Bioquímica para Estudiantes de Veterinaria, 1a. Ed. UTEHA, México, 1970.
4. Peters, J.P. y Von Slyke, D.D.: Quantitative Clinical Chemistry Methods, Vol. 1 Bailliere, Trindall and Cox, London, 1956.

Aminoácidos

1. Bence, G.E., Reeves, P.G., Oba, T.S. y Sanberlich, H.S.: Influence of dietary protein level on the magnesium requirement. *J.Nutr.* 79:220, 1963.
2. Doggart, J.R., Mc. Creadie, J.A. y Welbourn, R.B.: Urinary aminoacids in normal dogs and in those with experimentally induced cirrhosis. *Vet. Rec.*, 70:279, 1958.
3. Evered, D.F.: Species differences in aminoacid excretion by Mammals. *Comp. Biochem. Physiol.* 23:163, 1957.
4. Elmyr, D.H.: Distribution of aminoacid between plasma and red blood cells in the dogs. *Fed. Proc.* 25:854, 1966.
5. González Moreno, S. y Peñalosa Castro I.: Técnicas de Bionolécular, ENEP-I UNAM. México, 1984.
6. Leibholz, J.: The free aminoacid occurring in the blood plasma and rumen liquor of the sheep. *Aust. J. Agric. Res.* 16:973, 1965.
7. Leibholz, J.: Ketone body metabolism in normal and underfed pregnant sheep and in pregnancy toxemia. *Res. Vet. Sci.* 6:433, 1965.
8. Pruser, D.B. Klopfenstein, T.J. y Cline, J.H.: Dietary and defaunation effects upon plasma, aminoacid concentrations in sheep. *J. Nutr.* 89:226 1966.
9. Treacher, R.J.: The amino-aciduria of cone cystine-stone disease. *Res. Vet. Sci.* 4:556.
10. Treacher, R.J.: The etiology of canine cystinuria. *Biochem. J.* 90:494, 1964.
11. Verbeke, R. y Peeters, G.: Uptake of free plasma aminoacids by the lactating cow's udder and aminoacid composition of udder lymph. *Biochem. J.* 94:183, 1965.

Proteínas.

1. Alais, C.H.: Ciencia de la Leche, 1a. ed. Compañía Editorial Continental España, 1971.
2. Cantarrow, A., Scheparts, B.: Bioquímica. 4a. ed. Ed. Interamericana, México, 1969.
3. Harper, H.: Química Fisiológica. 7a. ed. Ed. El Manual Moderno, México, 1980.
4. Hawk, P.B.: Physiological Chemistry. 14th. ed. Mac Graw Hill Book Company United States, 1965.
5. Lehninger, A.L.: Bioquímica 2a.ed. Ed. Omega. Barcelona, España, 1980.
6. Lynch, J.M., Raphael, S.S., Mellor, D.P., Inwood? J.H.: Métodos de Laboratorio 2a. ed. Nueva Editorial Interamericana, S.A. de C.V. México, 1985.
7. Pierce, A.F.: Studies on the proteinuria of the new born calf. J. Physiol. 148:469, 1959.
8. Pierce, A.F.: Further studies on the proteinuria of the new born calf. J. Physiol. 156:136.

Enzimas.

1. Anderson, N.V.: Laboratory diagnosis of the canine pancreatic diseases. Southwest. Vet. 19:119, 1966.
2. Bhagavan, N.V.: Bioquímica. 1a. ed. es español, Ed. Omega, Barcelona, 1980.
3. González Moreno, S. y Peñalosa Castro I.: Técnicas de Biomoléculas. FNEP-I UNAM. México, 1984.
4. Lehninger, A.L.: Bioquímica. 2a. ed. en español. Ed. Omega, Barcelona, 1980.
5. Lynch, J.M., Raphael, S.S., Mellor, D.L., Spare, D.P., Inwood J.H.: Métodos de Laboratorio. 2a. ed. Nueva Editorial Interamericana. México, 1985.
6. Malherbe, W.D.: Enzyme chemistry on aid to veterinary diagnosis. J.S. Afr. Vet. Med. Ass. 34:257, 1963.
7. Manual de Prácticas de Bioquímica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica, UNAM.
8. Wroblewski, F. y La Due, J.S.: Serum glutamic oxalacetic transaminasa activity as an index of liver cell injury: a preliminary report, Ann. Intern. Med. 43:345, 1955.

Carbohidratos.

1. Campell, E.A. y Kronfeld, D.S.: Estimation of low concentrations of plasma glucose using glucose oxidase. *Amer. J. Vet. Res.* 22:587, 1961.
2. Davidson, I., Henry, B.: *Clinical Diagnosis by Laboratory Methods*, Tood-Sanford Saunders, Co. 14th ed. Philadelphia, 1969.
3. Dunlop, G.G.: *Diseases of Metabolism*. 4th ed. W.B. Saunders Co. Philadelphia, 1959.
4. Kaneko, J. Cornelius, C.: *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 2nd. ed. Academic Press. 1971.
5. Kronfeld, S., Mayer, G.P., Robertson, J.M. y Raggi, F.: The depression of milk secretion during insulin administration. *J. Dairy Sci.* 46:559, 1963.
6. Kronfeld, D.S.: Plasma non-esterified fatty acid concentrations in the dairy cow: responses to nutritional and normal stimuli and significance in Ketosis. *Vet. Rec.* 77:30, 1965.
7. Lynch, J.M., Raphael, S.S., Mellor, D.L., Spare, D.P., Inwood, H.J.: *Métodos de Laboratorio*, 2a. ed. Nueva Editorial Interamericana, México, 1965.
8. Maxim, M.B.: *Outline of Veterinary Clinical Pathology*. 3rd. ed. Iowa State, University Press, Iowa.
9. Meier, H.: Diabetes Mellitus in animals. *Diabetes*, 9:485. 1960.
10. West, E.S., Tood, W.R., Mason, H.S. y Van Bruggen, J.T.: *Bioquímica*, 4a. ed. Ed. Interamericana. México, 1969.
11. Wilkinson, J.S.: Spontaneous diabetes in domestic animals. *Vet. Rev. Annot.* 3:69, 1957. Spontaneous diabetes in large animals and cats. *Vet. Rev. Annot.* 4:93. 1958.

Lípidos

1. Brown, W.H. y Stull, J.W.M.: Bovine serum lipid analysis. *J. Dairy Sci.* 49:639 1966.
2. Evans, L., Patton, S. y Mc. Carthy, R.D.: Fatty acid composition of the lipid fraction from bovine serum lipoprotein. *J. Dairy Sci.* 44:475. 1961.
3. Frederickson, D.S. y Gordon, R.S.: Transport of fatty acids, *Physiol. Rev.* 38:585. 1958.
4. Fritzt, I.B.: Factors influencing the rates of long-chain fatty acid oxidation and synthesis in mammalian systems. *Physiol. Rev.* 41:32. 1961.

5. González Moreno, S. y Peñaloza Castro, I.: Técnicas de Bioquímica. ENEP-I UNAM.
6. Havel, R.J., Eder, H.A. y Bragdon, J.H.: The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J. Clin. Invest.* 34:1345. 1955.
7. Hovpt, R.: Utilization of blood urea in ruminants *Amer. J. Physiol.* 197:115. 1959.
8. Kronfeld, D.S.: Plasma non-esterified fatty acid concentrations in the dairy cow: responses to nutritional and hormonal stimuli, and significance in ketosis. *Vet. Rec.* 77:30. 1965.
9. Lehninger, A.L.: Bioquímica. 2a. ed. Ed. Omega. Barcelona, España, 1960.
10. Lynch, J.M., Raphael, S.S., Mellor, D.L., Spare, D.P., Inwood, H.J.: Métodos de Laboratorio. 2a. ed. Nueva Editorial Interamericana. México, 1965.
11. Manual de Prácticas de Bioquímica. Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica. F.M.V.2. UNAM.
12. Ontko, J.A. y Zilversmit, D.B.: Correlation between concentrations of circulating free fatty acids and ketone bodies. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 121:319. 1966.
13. Patterson, D.S.P.: Some observations on the estimations of non-esterified fatty acid concentrations in cow and sheep plasma. *Res. Vet. Sci.* 4:230, 1963.
14. Von Dwyne, C.M. y Havel, R.J.: Plasma unesterified fatty acid concentration in fetal and neonatal life. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 102:599. 1959.
15. Von Dwyne, C.M., Parker, H.R. y Holm, L.W.: Metabolism of free fatty acids during perinatal life of lambs. *Amer. J. Obstet. Gynec.* 91:277. 1965.

CONCLUSIONES

El manual satisface una necesidad en varios aspectos importantes:

1. Presenta una cantidad adecuada de material para que el estudiante de Medicina Veterinaria, entienda los fundamentos sobre temas que, de acuerdo al programa teórico, se imparten en la asignatura de Bioquímica General. Esto no significa que sea un manual de consulta completo, por lo que se sugiere a quienes deseen estudiar los temas con mayor profundidad, que las referencias los dirijan a la literatura adecuada.
2. Las disciplinas implicadas son varias, pero en general incluyen procedimientos de laboratorio aplicadas al estudio de las enfermedades en los seres vivos, contribuyendo de esta manera a ser un enlace entre el clínico, el paciente, el laboratorio, y por supuesto al estudiante que está adquiriendo conocimientos en estas disciplinas.
3. El manual ofrece una variedad selecta de métodos de laboratorio, que por su simplicidad y fácil ejecución, así como por su precisión y economía, contribuyen a que el alumno adquiera habilidad y destreza durante el curso práctico de la asignatura.
4. En el campo de la Bioquímica Clínica y en general de las ciencias médicas, se ha visto que existe una proliferación muy elevada sobre material publicado y libros de texto de altos costos, propiciando que el volumen de literatura publicada no pueda llegar hasta los canales de la educación, donde es necesaria. Es por lo anteriormente expuesto que el Manual de Bioquímica Clínica presenta; para fines prácticos de consulta, una rigurosa selección de material bibliográfico que el alumno puede obtener en los centros de información adecuada.
5. Las técnicas descritas en el manual, incluyen la fundamentación teórica en que se basan, ayudando al estudiante a un mejor entendimiento e integración de los conocimientos, cumpliendo de ésta manera un objetivo primario de la asignatura de Bioquímica, dar una instrucción adecuada teórico-práctica.

APENDICE A

1. ANTICOAGULANTES
2. TEORIA DE ACIDOS Y BASES
3. ISOMERIAS
4. DATOS APROXIMADOS DE ACIDOS Y BASES CONCENTRADOS.
5. CAMBIO DE COLOR E INTERVALOS DE pH DE IMPORTANTES INDICADORES.
6. TABLA DE LOGARITMOS
7. TABLA DE ANTILOGARITMOS
8. DEFINICION DE LOGARITMO
9. CURVA DE TITULACION PARA UN ACIDO QUE TIENE UN $pK = 4.0$.

APENDICE A 1 ANTICOAGULANTES

Para casi todo el trabajo hematológico y para muchos análisis bioquímicos se requiere sangre sin coagular. Existen numerosos anticoagulantes. La mayor parte de ellos impiden que el calcio intervenga en la coagulación, bien sea precipitándolo como sal (oxalatos) o fijándolo en forma no ionizada (citrato y Sequestrene). La heparina actúa como agente antitrombínico, o sea, neutraliza la trombina. Finalmente, puede obtenerse sangre no coagulada (líquida) removiendo la fibrina que se va formando (sangre desfibrinada).

OXALATOS

Oxalatos de amonio y de potasio.

Los oxalatos de amonio y de potasio se utilizan bajo forma de la mezcla de tres partes del primero y dos partes del segundo (mezcla de Heller y Paul o de Wintrobe). La sal de amonio aumenta el volumen de los glóbulos rojos, y la de potasio lo disminuye. Con las proporciones utilizadas, los eritrocitos no se alteran.

Oxalato de amonio	1.2 g.
Oxalato de potasio	0.8 g.
Agua destilada	100 ml.

Esta mezcla se pone en tubos o frascos con tapón de rosca a razón de 0.1 ml. por cada ml. de sangre (o sea, 2 ccj. de oxalatos mezclados por ml. de sangre). Los tubos se ponen en la incubadora hasta que se evapora toda el agua y queda el polvo seco.

Las ventajas de esta mezcla de oxalatos son su precio, su facilidad de preparación y que no requieren dilución. Suministra muestras de sangre adecuadas para la medición de la hemoglobina, el recuento de los glóbulos blancos y rojos, y el hematocrito. Puede obtenerse el plasma necesario para muchos exámenes bioquímicos, pero no para el nitrógeno de urea, puesto que la sal de amonio contiene nitrógeno. Entre sus desventajas, está el que no pueden hacerse frotis después de unos cuantos minutos. El oxalato produce degeneración nuclear de los leucocitos y plasmólisis de los glóbulos rojos. Aparecen vacuolas en el citoplasma de los granulocitos, cuyos lóbulos nucleares se juntan hasta formar una masa esférica. Los núcleos de los linfocitos y monocitos pueden presentar prolongaciones y hasta dividirse en lóbulos. Los oxalatos no pueden utilizarse en las transfusiones.

Oxalato de potasio.

El oxalato de potasio sólo se utiliza frecuentemente como anticoagulante en bioquímica. Se utiliza 0.01 ml. de una solución al 30 por 100 para cada ml. de sangre. Se pone en tubos que secan en la forma mencionada.

CITRATOS

Se utilizan la sal disódica. La solución al 3.8 por 100 (p/v) es isotónica y se emplea en proporción de una parte de solución de citrato y cuatro partes de sangre para la velocidad de sedimentación glubular de Westergren; para estudiar los trastornos de la coagulación, se utiliza una parte de citrato para nueve partes de sangre.

A.C.D. (dextrosa-citrato ácida).

Esta solución se utiliza como anticoagulante para las transfusiones de sangre, y puede resultar útil en el laboratorio de hematología para preservar los antígenos de glóbulos rojos, cuando se quieren estudiar éstos.

La fórmula más sencilla es la inglesa: cubre las necesidades habituales de laboratorio.

Citrato disódico (monoácido)	2 g.
Dextrosa	3 g.
Agua destilada (sin pirógenos)	120 ml.

Se añaden 4 ml. de sangre a 1 ml. de A.C.D. y se conserva a 4°C.

Sequestrene.

Es la sal dipotásica o disódica del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Por quelación, impide que se ionice el calcio y ejerce por lo tanto una acción anticoagulante muy intensa, en cantidades de 1 a 2 mg. por ml. de snagre. Es preferible la sal dipotásica, pues resulta más soluble; pero aun así la mezcla por inversión debe ser muy cuidadosa. La substancia tiene muchas ventajas en hematología; por ejemplo, pueden hacerse recuentos de glóbulos blancos y rojos y hematócrito aun al cabo de muchas horas. Asimismo, pueden prepararse tres o cuatro horas después de la punción buenos frotis con morfología satisfactoria de leucocitos y eritrocitos. Puesto que esta substancia tiende a impedir que las plaquetas se aglutinen o se peguen a las superficies, son posibles recuentos bastante exactos de estos elementos en la sangre tratada con EDTA, muchas horas después de obtener la muestra. También puede usarse la técnica para la transfusión de sangre, ya que la toxicidad es mínima. Para las técnicas habituales de laboratorio (muestras de sangre de 5 ml.), se pone 0.1 ml. de solución acuosa al 10 por 100 de EDTA (sal potásica) en tubos o frascos de tapón de rosca, y se evapora a sequedad. Es el mejor anticoagulante para la hematología habitual, las muestras recogidas sobre EDTA se pueden conservar toda la noche a 4°C sin inconvenientes.

Fluoruro

Se combina con el calcio y actúa también como un veneno enzimático potente; por lo tanto, se utiliza no solamente como anticoagulante, sino también como conservador, sobre todo para la medición de la glucosa en sangre (y LCR) cuando se tenga que esperar más de 30 ó 50 minutos entre la toma de la muestra y el análisis. Suelen utilizarse 10 mg de fluoruro de sodio por ml. de sangre, y puede añadirse 1 mg. de timol si se quiere detener la acción bacteriana (por ejemplo, en las muestras que se envían por correo)

Heparina.

Es un anticoagulante excelente (y natural), pero es mucho más caro que los artificiales. Es mejor anticoagulante (seco) cuando se busca reducir al mínimo la hemólisis (por ejemplo, para mediciones de electrólitos y estudios de la fragilidad de glóbulos rojos). No resulta conveniente para los frotis teñidos por los métodos de Wright o Leishman, pues produce una coloración azul difusa. Puede emplearse a razón de 0.1 a 0.2 mg. por ml. de sangre. Existen en el comercio soluciones de 100, 1000 y 10,000 unidades internacionales por ml. (La heparina purificada suele tener cuatro veces 100 U.I. por mg.; pero deben consultarse las indicaciones del fabricante antes de utilizar los productos). Una vez calculado el volumen necesario de la preparación de que se dispone, se pone en tubos o frascos de tapón de rosca y se evapora a sequedad entre 37 y 56°C. Frecuentemente se utilizan bajo forma de solución, aspirando una gota en una jeringa, mojado las paredes y descartando el exceso.

DEFIBRINACION

Se lleva a cabo en un matraz Erlenmeyer de 50 a 100 ml., utilizando perlas de vidrio o un tubo cerrado o un agitador central de vidrio que lleven pegados varillitas de 0.5 cm. (pedacitos de varilla de vidrio delgada de 0.5 mm.) o de tubo capilar. El extremo del agitador se sujeta a nivel del cuello del matraz con un tapón perforado o con algodón. La sangre (de 10 a 30 ml) se pone en el matraz inmediatamente después de aspirada de la vena. El matraz se sujeta por el cuello y se hace girar describiendo ochos durante 5 a 10 minutos, al cabo de los cuales toda la fibrina se habrá pegado a las perlas o al extremo "erizado" del agitador. Se obtiene así una buena defibrinación; se conserva la morfología de los glóbulos rojos y blancos, sobre todo en los frotis de la capa de glóbulos blancos y se obtiene una gran cantidad de suero. El método más sencillo para defibrinar la sangre consiste en utilizar un palito de madera en cuyo extremo se han sujetado tres o cuatro grapas para papel, que se agita en la muestra de sangre hasta que toda la fibrina se ha adherido a las grapas.

APENDICE A 2. TEORIAS DE ACIDOS Y BASES

Los conceptos de lo que es un ácido y una base han sufrido cambios a través del tiempo, debido a que los modelos propuestos para explicar su comportamiento no aclaraban algunos fenómenos o su campo de aplicación era restringido (por ejemplo sólo a soluciones acuosas). En la tabla siguiente se notan en forma condensada las principales teorías y sus principios fundamentales.

AUTOR	ACIDOS	BASES	NEUTRALIZACION
	Soluciones acuosas de sabor ocre el color del papel tornasol de azul a rojo. Neutralizan las bases y reaccionan con los metales de los grupos I-A y II-A de la Tabla Periódica para dar hidrógeno.	Soluciones acuosas de sabor amargo. Cambian el color del papel tornasol de rojo a azul. Neutralizan los ácidos y dan sensación resbaladiza.	$HCl + NaOH \rightarrow NaCl + H_2O$
S. Arrhenius (1887)	Sustancia que al disociarse en sol. acuosa proporcionan iones hidrógeno (H^+) [*] $HCl \xrightarrow{Aq} H^+ + Cl^-$	Sustancia que al disociarse en sol. acuosa proporcionan iones oxhidrilo (OH^-) $NaOH \rightarrow Na^+ + OH^-$	$H^+ + OH^- \rightarrow H_2O$ $H^+ + Cl^- + Na^+ + OH^- \rightarrow H_2O + Na^+ + Cl^-$
Brönsted, Lowry (1923)	Donadores de protones (sol. acuosas y no acuosas). $CH_3COOH \rightarrow H^+ + CH_3COO^-$ ácido (1) base conjugada (1) par conjugado (1) <u>Comportamiento del agua</u> $H_2O \rightleftharpoons H^+ + OH^-$	Receptores de protones (sol. acuosas y no acuosas). $NH_3 + H^+ \rightarrow NH_4^+$ base (2) ácido conjugado (2) par conjugado (2) <u>Comportamiento del agua</u> $H_2O + H^+ \rightleftharpoons H_3O^+$	$CH_3COOH + NH_3 \rightarrow NH_4^+ + CH_3COO^-$ ácido conjugado (1) base conjugada (2) Si la reacción se desplaza a la derecha, ácido conjugado (1) más fuerte*** que ácido conjugado (2) y base conjugada (2) más fuerte que base conjugada (1), y a la inversa si la reacción se desplaza a la izquierda. $H_2O + H_2O \rightleftharpoons H_3O^+ + OH^-$ <u>Autodisociación del agua.</u>

G.N. Lewis
(1923)

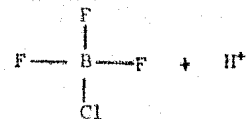
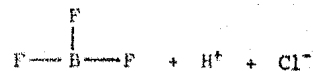
Receptores de pares electrónicos
(sol. acuosas y no acuosas) Ej:

Iones positivos: Ag^+ , Ca^{2+} , Cu^{2+}
etc. Moléculas cuyo átomo cen-
tral tiene el octeto incompleto
 BF_3

Donadores de pares electróni-
cos (sol. acuosas y no acuo-
sas) Ej:

Iones negativos: Cl^- , F^- , OH^-
etc. Moléculas con uno o dos
pares no compartidos, e):
 NH_3 , H_2O , etc.

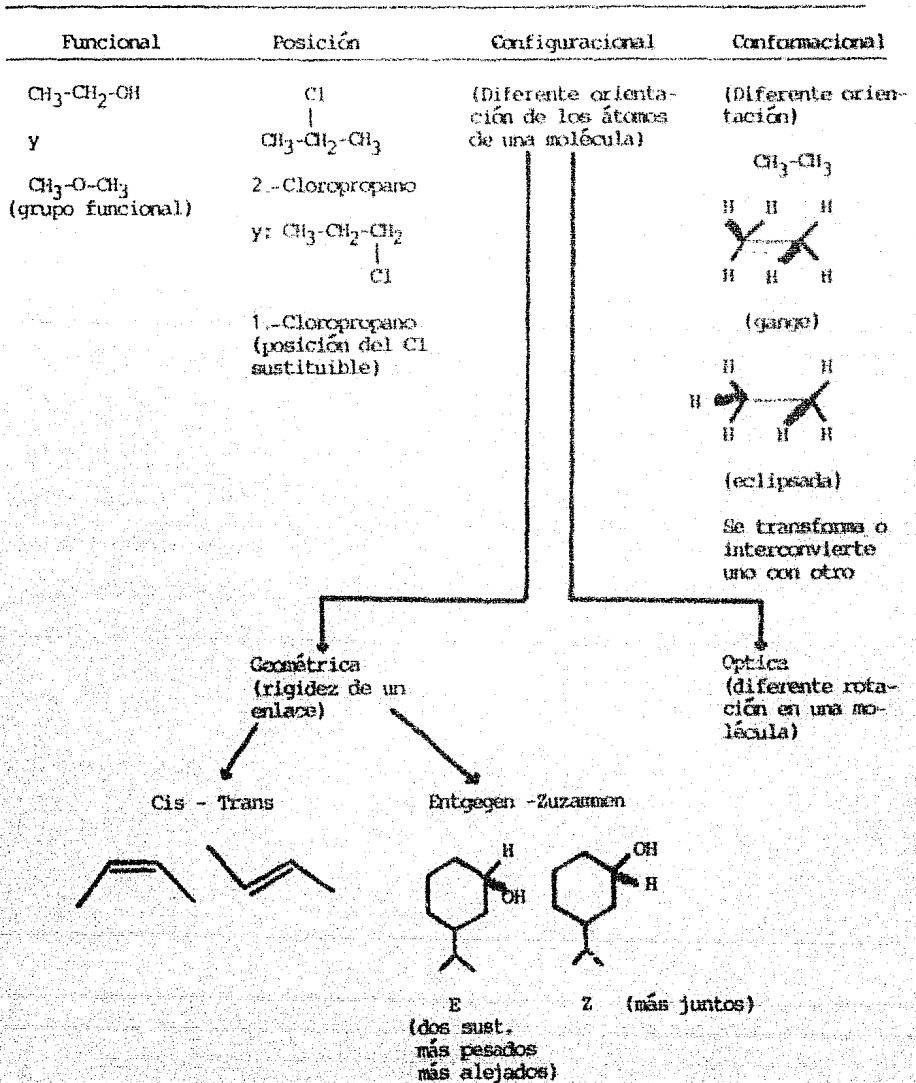
Formación de enlaces covalente
coordinado entre un ácido y una
base



*Posteriormente a Arrhenius se demostró que el protón no existe como tal en solución acuosa, debido a que su tamaño comparado con la carga que proporcionalmente es muy grande, por lo que atrae moléculas de agua formando iones complejos, por ejemplo: H_3O^+ (ión hidronio)

** Un ácido es más fuerte cuanto mayor es su capacidad para ceder iones H^+ (K_a); una base es más fuerte cuanto mayor es su capacidad para recibir iones H^+ .

APENDICE A 3. ISOMERIAS
(Son compuestos con las misma formula molecular)



APENDICE A 4. DATOS APROXIMADOS DE ACIDOS Y BASES CONCENTRADOS

<u>Compuesto</u>	<u>Densidad, g/ml</u>	<u>g/o p/p</u>	<u>Normalidad</u>
Acido Acético, glacial ($\text{CH}_3\text{-COOH}$)	1.05	99 to 100	17.4
Hidróxido de Amonio (NH_4OH)	0.90	28 to 30	14.8
Acido fórmico (HCOOH)	1.2	88	23
Acido clorhídrico (HCl)	1.18	36.5 to 38	12.2
Acido nítrico (HNO_3)	1.42	69 to 71	15.7
Acido perclórico (HClO_4)	1.6	70 to 72	11.7
Acido fosfórico (H_3FO_4)	1.7	85	14.9
Acido sulfúrico (H_2SO_4)	1.84	95 to 98	36

APENDICE A 5. CAMBIO DE COLOR E INTERVALOS DE pH DE
IMPORTANTES INDICADORES

<u>Nombre del Indicador</u>	<u>Intervalos del pH</u>	<u>Cambios de color</u>	<u>Solvente</u>
Violeta de metilo	0.2 - 3.0	Amarillo a azul a violeta	Agua
Azul de timol	1.2 - 2.8	Rojo a amarillo	Agua
Bencenopurpurina 4B	1.2 - 4.0	Violeta a rojo	20% de etanol
Anaranjado de metilo	3.1 - 4.4	Rojo a anaranjado	Agua
Azul de Bromofenol	3.0 - 4.6	Amarillo a azul violeta	Agua
Rojo congo	3.0 - 5.0	Azul a rojo	70% de etanol
Verde de Bromocresol	3.8 - 5.4	Amarillo a azul	Agua
Rojo de metilo	4.4 - 6.2	Rojo a amarillo	Agua
Rojo de clorofenol	4.8 - 6.8	Amarillo a rojo	Agua
Purpura de Bromocresol	5.2 - 6.8	Amarillo a purpura	Agua
Tornasol	4.5 - 8.3	Rojo a azul	Agua
Azul de Bromotimol	6.0 - 7.6	Amarillo a azul	Agua
Rojo fenol	6.8 - 8.2	Amarillo a rojo	Agua
Azul de timol	8.0 - 9.6	Amarillo a azul	Agua
Fenolftaleina	8.3 - 10.0	Incoloro a rojo	70% de etanol
Timolftaleina	9.3 - 10.5	Amarillo a azul	70% de etanol
Amarillo de alizarina R	10.0- 12.0	Amarillo a rojo	95% de etanol
Carmín índigo	11.4- 13.0	Azul a amarillo	50% de etanol
Trinitrobenceno	12.0- 14.0	Incoloro a naranja	70% de etanol

APENDICE A 6.

LOGARITMOS
Tabla de Mantisas.

	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9									Partes Proporcionalas									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
10	0000	0043	0086	0129	0170	0212	0253	0294	0334	0374	4	8	12	17	21	25	29	33	37
11	0414	0453	0492	0531	0569	0607	0645	0682	0719	0755	4	8	11	15	19	23	26	30	34
12	0792	0828	0864	0899	0934	0969	1004	1038	1072	1106	3	7	10	14	17	21	24	28	31
13	1139	1173	1207	1241	1274	1307	1340	1372	1404	1436	3	6	9	12	15	18	21	24	27
14	1461	1492	1523	1553	1583	1614	1644	1673	1703	1732	3	6	8	11	14	17	20	23	26
15	1761	1790	1818	1847	1875	1903	1931	1959	1987	2014	3	5	8	11	13	16	18	21	24
16	2041	2068	2095	2122	2148	2175	2201	2227	2253	2279	2	5	7	10	12	15	17	20	22
17	2304	2330	2355	2380	2405	2430	2455	2480	2504	2529	2	5	7	9	12	14	16	19	21
18	2553	2577	2601	2625	2648	2672	2695	2718	2742	2765	2	4	7	9	11	13	15	18	20
19	2788	2810	2833	2856	2878	2900	2922	2945	2967	2989	2	4	6	8	11	13	15	17	19
20	3010	3032	3054	3075	3096	3118	3139	3160	3181	3201	2	4	6	8	10	12	14	16	18
21	3222	3243	3263	3284	3304	3324	3345	3365	3385	3404	2	4	6	8	10	12	14	16	18
22	3424	3444	3464	3483	3502	3522	3541	3560	3579	3598	2	4	6	8	10	12	14	16	18
23	3617	3636	3655	3674	3692	3711	3729	3747	3766	3784	2	4	6	7	9	11	13	15	17
24	3802	3820	3838	3856	3874	3892	3909	3927	3945	3962	2	4	5	7	9	11	12	14	16
25	3979	3997	4014	4031	4048	4065	4082	4099	4116	4133	2	3	5	7	9	10	12	14	15
26	4150	4166	4183	4200	4216	4232	4249	4265	4281	4298	2	3	5	7	8	10	11	13	15
27	4314	4330	4346	4362	4378	4393	4409	4425	4440	4456	2	3	5	6	8	9	11	13	14
28	4472	4487	4502	4518	4533	4548	4564	4578	4594	4609	2	3	5	6	8	9	10	12	13
29	4624	4639	4654	4669	4683	4698	4713	4727	4742	4757	1	3	4	6	7	8	10	12	13
30	4771	4786	4800	4814	4829	4843	4857	4871	4885	4899	1	3	4	5	7	8	10	11	13
31	4914	4928	4942	4955	4969	4983	4997	5011	5024	5038	1	3	4	5	7	8	10	11	12
32	5051	5065	5079	5092	5105	5119	5132	5145	5159	5172	1	3	4	5	7	8	9	11	12
33	5185	5198	5211	5224	5237	5250	5263	5276	5289	5302	1	3	4	5	6	8	9	11	12
34	5315	5328	5340	5353	5365	5378	5391	5403	5415	5428	1	3	4	5	6	8	9	10	11
35	5441	5453	5465	5478	5490	5502	5514	5527	5539	5551	1	2	4	5	6	7	9	10	11
36	5563	5575	5587	5599	5611	5623	5635	5647	5659	5670	1	2	4	5	6	7	8	10	11
37	5682	5694	5705	5717	5728	5740	5752	5763	5775	5785	1	2	3	5	6	7	8	9	10
38	5798	5809	5821	5832	5843	5855	5866	5877	5888	5899	1	2	3	5	6	7	8	9	10
39	5911	5922	5933	5944	5955	5966	5977	5988	5999	6009	1	2	3	4	5	7	8	9	10
40	6021	6031	6042	6053	6064	6075	6085	6096	6107	6117	1	2	3	4	5	6	8	9	10
41	6128	6138	6149	6160	6170	6180	6191	6201	6212	6222	1	2	3	4	5	6	7	8	9
42	6232	6243	6253	6263	6274	6284	6294	6304	6314	6325	1	2	3	4	5	6	7	8	9
43	6335	6345	6355	6365	6375	6385	6395	6405	6415	6425	1	2	3	4	5	6	7	8	9
44	6435	6444	6454	6464	6474	6484	6493	6503	6513	6522	1	2	3	4	5	6	7	8	9
45	6532	6542	6551	6561	6571	6580	6590	6599	6609	6618	1	2	3	4	5	6	7	8	9
46	6628	6637	6646	6656	6665	6675	6684	6693	6702	6712	1	2	3	4	5	6	7	8	9
47	6721	6730	6739	6749	6758	6767	6776	6785	6794	6803	1	2	3	4	5	5	6	7	8
48	6812	6821	6830	6839	6848	6857	6865	6875	6884	6893	1	2	3	4	4	5	6	7	8
49	6902	6911	6920	6929	6937	6946	6955	6964	6972	6981	1	2	3	4	4	5	6	7	8
50	6990	6999	7007	7016	7024	7033	7042	7050	7059	7067	1	2	3	3	4	5	6	7	8
51	7076	7084	7093	7101	7110	7118	7126	7135	7143	7152	1	2	3	3	4	5	6	7	8
52	7160	7168	7177	7185	7193	7202	7210	7218	7226	7235	1	2	2	3	4	5	6	7	8
53	7243	7251	7259	7267	7275	7284	7292	7300	7308	7316	1	2	2	3	4	5	6	7	8
54	7324	7332	7340	7348	7356	7364	7372	7380	7389	7397	1	2	2	3	4	5	6	7	8
55	7405	7413	7421	7429	7437	7445	7453	7461	7469	7477	1	2	2	3	4	5	6	7	8
56	7485	7493	7501	7509	7517	7525	7533	7541	7549	7557	1	2	2	3	4	5	6	7	8
57	7565	7573	7581	7589	7597	7605	7613	7621	7629	7637	1	2	2	3	4	5	6	7	8
58	7645	7653	7661	7669	7677	7685	7693	7701	7709	7717	1	2	2	3	4	5	6	7	8
59	7725	7733	7741	7749	7757	7765	7773	7781	7789	7797	1	2	2	3	4	5	6	7	8
60	7805	7813	7821	7829	7837	7845	7853	7861	7869	7877	1	2	2	3	4	5	6	7	8
61	7885	7893	7901	7909	7917	7925	7933	7941	7949	7957	1	2	2	3	4	5	6	7	8
62	7965	7973	7981	7989	7997	8005	8013	8021	8029	8037	1	2	2	3	4	5	6	7	8
63	8045	8053	8061	8069	8077	8085	8093	8101	8109	8117	1	2	2	3	4	5	6	7	8
64	8125	8133	8141	8149	8157	8165	8173	8181	8189	8197	1	2	2	3	4	5	6	7	8
65	8205	8213	8221	8229	8237	8245	8253	8261	8269	8277	1	2	2	3	4	5	6	7	8
66	8285	8293	8301	8309	8317	8325	8333	8341	8349	8357	1	2	2	3	4	5	6	7	8
67	8365	8373	8381	8389	8397	8405	8413	8421	8429	8437	1	2	2	3	4	5	6	7	8
68	8445	8453	8461	8469	8477	8485	8493	8501	8509	8517	1	2	2	3	4	5	6	7	8
69	8525	8533	8541	8549	8557	8565	8573	8581	8589	8597	1	2	2	3	4	5	6	7	8
70	8605	8613	8621	8629	8637	8645	8653	8661	8669	8677	1	2	2	3	4	5	6	7	8
71	8685	8693	8701	8709	8717	8725	8733	8741	8749	8757	1	2	2	3	4	5	6	7	8
72	8765	8773	8781	8789	8797	8805	8813	8821	8829	8837	1	2	2	3	4	5	6	7	8
73	8845	8853	8861	8869	8877	8885	8893	8901	8909	8917	1	2	2	3	4	5	6	7	8
74	8925	8933	8941	8949	8957	8965	8973	8981	8989	8997	1	2	2	3	4	5	6	7	8
75	9005	9013	9021	9029	9037	9045	9053	9061	9069	9077	1	2	2	3	4	5	6	7	8
76	9085	9093	9101	9109	9117	9125	9133	9141	9149	9157	1	2	2	3	4	5	6	7	8
77	9165	9173	9181	9189	9197	9205	9213	9221	9229	9237	1	2	2	3	4	5	6	7	8
78	9245	9253	9261	9269	9277	9285	9293	9301	9309	9317	1	2	2	3	4	5	6	7	8
79	9325	9333	9341	9349	9357	9365	9373	9381	9389	9397	1	2	2	3	4	5	6	7	8
80	9405	9413	9421	9429	9437	9445	9453	9461	9469	9477	1	2	2	3	4	5	6	7	8
81	9485	9493	9501	9509	9517	9525	9533	9541	9549	9557	1	2	2	3	4	5	6	7	8
82	9565	9573	9581	9589	9597	9605	9613	9621	9629	9637	1	2	2	3	4	5	6	7	8
83	9645	9653	9661	9669	9677	9685	9693	9701	9709	9717	1	2	2	3	4	5	6	7	8
84	9725	9733	9741	9749	9757	9765	9773	9781	9789	9797	1	2	2	3	4	5	6	7	8
85	9805	9813	9821	9829	9837	9845	9853	9861	9869	9877	1	2	2	3	4	5	6	7	8
86	9885	9893	9901	9909	9917														

Continuación

LOGARITMOS

Tabla de Mantisas.

										Partes Proporcionalas										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
	35	7404	7412	7419	7427	7435	7443	7451	7459	7466	7474	1	2	3	4	5	6	7	8	9
36	7482	7490	7497	7505	7513	7520	7528	7535	7543	7551	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
37	7559	7566	7574	7582	7590	7597	7604	7612	7619	7627	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
38	7634	7642	7649	7657	7664	7672	7679	7687	7694	7701	1	1	2	3	4	5	6	7	8	9
39	7708	7716	7723	7731	7739	7745	7752	7760	7767	7774	1	1	2	3	4	5	6	7	8	9
40	7782	7789	7796	7803	7810	7818	7825	7832	7839	7846	1	1	2	3	4	5	6	7	8	9
41	7853	7860	7867	7875	7882	7889	7895	7902	7910	7917	1	1	2	3	4	5	6	7	8	9
42	7924	7931	7938	7945	7952	7959	7965	7972	7979	7987	1	1	2	3	4	5	6	7	8	9
43	7993	8000	8007	8014	8021	8028	8035	8041	8048	8055	1	1	2	3	4	5	6	7	8	9
44	8062	8069	8075	8082	8089	8095	8102	8109	8116	8122	1	1	2	3	4	5	6	7	8	9
45	8129	8136	8142	8149	8156	8162	8169	8176	8182	8189	1	1	2	3	4	5	6	7	8	9
46	8195	8202	8209	8215	8222	8228	8235	8241	8248	8254	1	1	2	3	4	5	6	7	8	9
47	8261	8267	8274	8280	8287	8293	8299	8305	8312	8318	1	1	2	3	4	5	6	7	8	9
48	8325	8331	8337	8344	8350	8357	8363	8370	8376	8382	1	1	2	3	4	5	6	7	8	9
49	8388	8395	8401	8407	8414	8420	8426	8432	8439	8445	1	1	2	3	4	5	6	7	8	9
50	8451	8457	8463	8470	8476	8482	8488	8494	8500	8506	1	1	2	3	4	5	6	7	8	9
51	8513	8519	8525	8531	8537	8543	8549	8555	8561	8567	1	1	2	3	4	5	6	7	8	9
52	8573	8579	8585	8591	8597	8603	8609	8615	8621	8627	1	1	2	3	4	5	6	7	8	9
53	8633	8639	8645	8651	8657	8663	8669	8675	8681	8687	1	1	2	3	4	5	6	7	8	9
54	8693	8699	8704	8710	8716	8722	8727	8733	8739	8745	1	1	2	3	4	5	6	7	8	9
55	8751	8756	8762	8768	8774	8779	8785	8791	8797	8802	1	1	2	3	4	5	6	7	8	9
56	8808	8814	8820	8825	8831	8837	8842	8848	8854	8859	1	1	2	3	4	5	6	7	8	9
57	8865	8871	8876	8882	8887	8893	8898	8904	8910	8915	1	1	2	3	4	5	6	7	8	9
58	8921	8927	8932	8938	8943	8949	8954	8960	8965	8971	1	1	2	3	4	5	6	7	8	9
59	8976	8982	8987	8993	8998	9004	9009	9015	9020	9025	1	1	2	3	4	5	6	7	8	9
60	9031	9036	9042	9047	9053	9058	9063	9069	9074	9079	1	1	2	3	4	5	6	7	8	9
61	9085	9090	9096	9101	9106	9112	9117	9122	9128	9133	1	1	2	3	4	5	6	7	8	9
62	9138	9143	9149	9154	9159	9165	9170	9175	9180	9186	1	1	2	3	4	5	6	7	8	9
63	9191	9196	9201	9206	9212	9217	9222	9227	9232	9238	1	1	2	3	4	5	6	7	8	9
64	9243	9248	9253	9258	9263	9269	9274	9279	9284	9289	1	1	2	3	4	5	6	7	8	9
65	9294	9299	9304	9309	9315	9320	9325	9330	9335	9340	1	1	2	3	4	5	6	7	8	9
66	9345	9350	9355	9360	9365	9370	9375	9380	9385	9390	0	1	1	2	3	4	4	5	5	6
67	9395	9400	9405	9410	9415	9420	9425	9430	9435	9440	0	1	1	2	2	3	3	4	4	5
68	9445	9450	9455	9460	9465	9469	9474	9479	9484	9489	0	1	1	2	2	3	3	4	4	5
69	9494	9499	9504	9509	9513	9518	9523	9528	9533	9538	0	1	1	2	2	3	3	4	4	5
70	9542	9547	9552	9557	9562	9566	9571	9576	9581	9586	0	1	1	2	2	3	3	4	4	5
71	9590	9595	9600	9605	9609	9614	9619	9624	9628	9633	0	1	1	2	2	3	3	4	4	5
72	9638	9643	9647	9652	9657	9661	9666	9671	9675	9680	0	1	1	2	2	3	3	4	4	5
73	9685	9689	9694	9699	9703	9707	9712	9717	9722	9727	0	1	1	2	2	3	3	4	4	5
74	9731	9735	9740	9745	9750	9754	9759	9763	9768	9773	0	1	1	2	2	3	3	4	4	5
75	9777	9782	9786	9791	9795	9800	9805	9809	9814	9819	0	1	1	2	2	3	3	4	4	5
76	9823	9827	9832	9837	9841	9845	9850	9854	9859	9863	0	1	1	2	2	3	3	4	4	5
77	9868	9872	9877	9881	9885	9890	9894	9899	9903	9908	0	1	1	2	2	3	3	4	4	5
78	9912	9917	9921	9925	9930	9934	9939	9943	9948	9952	0	1	1	2	2	3	3	4	4	5
79	9956	9961	9965	9969	9974	9978	9983	9987	9991	9996	0	1	1	2	2	3	3	4	4	5
80	9999																			
81	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Partes Proporcionalas									

APENDICE A 7.
ANTILOGARITMOS

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9
.00	1000	1002	1005	1007	1009	1012	1014	1016	1019	1021	0	0	1	1	1	2	2	2	2
.01	1023	1025	1028	1030	1033	1035	1038	1040	1042	1045	0	0	1	1	1	1	2	2	2
.02	1047	1050	1052	1054	1057	1059	1062	1064	1067	1069	0	0	1	1	1	1	2	2	2
.03	1072	1074	1076	1079	1081	1084	1086	1089	1091	1094	0	0	1	1	1	1	2	2	2
.04	1095	1097	1100	1101	1104	1107	1109	1112	1114	1117	0	1	1	1	1	2	2	2	2
.05	1122	1125	1127	1130	1132	1135	1138	1140	1143	1146	0	1	1	1	1	2	2	2	2
.06	1148	1151	1153	1156	1159	1161	1164	1167	1169	1172	0	1	1	1	1	2	2	2	2
.07	1175	1178	1180	1183	1186	1189	1191	1194	1197	1199	0	1	1	1	1	2	2	2	2
.08	1202	1205	1208	1211	1213	1216	1219	1222	1225	1227	0	1	1	1	1	2	2	2	2
.09	1230	1233	1236	1239	1242	1245	1247	1250	1253	1256	0	1	1	1	1	2	2	2	2
.10	1259	1262	1265	1268	1271	1274	1276	1279	1282	1285	0	1	1	1	1	2	2	2	2
.11	1288	1291	1294	1297	1300	1303	1305	1309	1312	1315	0	1	1	1	1	2	2	2	2
.12	1318	1321	1324	1327	1330	1334	1337	1340	1342	1346	0	1	1	1	1	2	2	2	2
.13	1349	1352	1355	1358	1361	1365	1368	1371	1374	1377	0	1	1	1	1	2	2	2	2
.14	1380	1384	1387	1390	1393	1396	1399	1403	1406	1409	0	1	1	1	1	2	2	2	2
.15	1413	1416	1419	1422	1426	1429	1432	1435	1439	1442	0	1	1	1	1	2	2	2	2
.16	1445	1449	1452	1455	1459	1462	1466	1469	1472	1476	0	1	1	1	1	2	2	2	2
.17	1479	1483	1486	1489	1493	1496	1500	1503	1507	1510	0	1	1	1	1	2	2	2	2
.18	1514	1517	1521	1524	1528	1531	1535	1538	1542	1545	0	1	1	1	1	2	2	2	2
.19	1549	1552	1556	1560	1563	1567	1570	1574	1578	1581	0	1	1	1	1	2	2	2	2
.20	1585	1589	1592	1596	1600	1603	1607	1611	1614	1618	0	1	1	1	1	2	2	2	2
.21	1622	1625	1629	1633	1637	1641	1644	1648	1652	1656	0	1	1	1	1	2	2	2	2
.22	1660	1663	1667	1671	1675	1679	1683	1687	1690	1694	0	1	1	1	1	2	2	2	2
.23	1698	1702	1706	1710	1714	1718	1722	1725	1730	1734	0	1	1	1	1	2	2	2	2
.24	1738	1742	1746	1750	1754	1758	1762	1765	1770	1774	0	1	1	1	1	2	2	2	2
.25	1778	1782	1786	1791	1795	1799	1803	1807	1811	1816	0	1	1	1	1	2	2	2	2
.26	1820	1824	1828	1832	1837	1841	1845	1849	1854	1859	0	1	1	1	1	2	2	2	2
.27	1862	1866	1871	1875	1879	1884	1889	1892	1897	1901	0	1	1	1	1	2	2	2	2
.28	1905	1910	1914	1919	1923	1928	1932	1936	1941	1945	0	1	1	1	1	2	2	2	2
.29	1950	1954	1959	1963	1968	1972	1977	1982	1985	1991	0	1	1	1	1	2	2	2	2
.30	1995	2000	2004	2009	2014	2018	2023	2028	2032	2037	0	1	1	1	1	2	2	2	2
.31	2042	2046	2051	2056	2061	2065	2070	2075	2080	2084	0	1	1	1	1	2	2	2	2
.32	2089	2094	2099	2104	2109	2113	2118	2123	2129	2133	0	1	1	1	1	2	2	2	2
.33	2138	2143	2148	2153	2158	2163	2168	2173	2178	2183	0	1	1	1	1	2	2	2	2
.34	2188	2193	2198	2203	2208	2214	2219	2223	2228	2234	1	1	1	1	1	2	2	2	2
.35	2239	2244	2249	2254	2260	2265	2270	2275	2280	2285	1	1	1	1	1	2	2	2	2
.36	2291	2296	2301	2307	2312	2317	2322	2328	2333	2339	1	1	1	1	1	2	2	2	2
.37	2344	2350	2355	2360	2366	2371	2377	2382	2388	2393	1	1	1	1	1	2	2	2	2
.38	2399	2404	2410	2415	2421	2427	2432	2438	2443	2449	1	1	1	1	1	2	2	2	2
.39	2455	2460	2466	2472	2477	2483	2489	2495	2500	2506	1	1	1	1	1	2	2	2	2
.40	2512	2518	2523	2529	2535	2541	2547	2553	2559	2564	1	1	1	1	1	2	2	2	2
.41	2570	2576	2582	2588	2594	2600	2606	2612	2618	2624	1	1	1	1	1	2	2	2	2
.42	2630	2636	2642	2649	2655	2661	2667	2673	2679	2685	1	1	1	1	1	2	2	2	2
.43	2692	2699	2704	2710	2716	2723	2729	2735	2742	2748	1	1	1	1	1	2	2	2	2
.44	2754	2761	2767	2773	2780	2786	2792	2799	2805	2812	1	1	1	1	1	2	2	2	2
.45	2818	2825	2831	2838	2844	2851	2858	2864	2871	2877	1	1	1	1	1	2	2	2	2
.46	2884	2891	2897	2904	2911	2917	2924	2931	2938	2944	1	1	1	1	1	2	2	2	2
.47	2951	2958	2965	2972	2979	2985	2992	2999	3005	3013	1	1	1	1	1	2	2	2	2
.48	3020	3027	3034	3041	3048	3055	3062	3069	3076	3083	1	1	1	1	1	2	2	2	2
.49	3090	3097	3105	3112	3119	3126	3133	3141	3148	3155	1	1	1	1	1	2	2	2	2
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9

Continuación

ANTILOGARITMOS

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9
55	3152	3170	3177	3184	3192	3199	3205	3214	3221	3228	1	1	2	3	4	4	5	6	7
56	3235	3243	3251	3258	3265	3273	3281	3289	3298	3304	1	2	2	3	4	5	5	5	7
57	3311	3319	3327	3334	3342	3350	3357	3365	3373	3381	1	2	2	3	4	5	5	6	7
58	3389	3395	3404	3412	3421	3429	3437	3445	3453	3461	1	2	2	3	4	5	5	6	7
59	3467	3475	3483	3491	3499	3507	3515	3523	3531	3539	1	2	2	3	4	5	5	6	7
60	3549	3556	3565	3573	3581	3589	3597	3605	3614	3622	1	2	2	3	4	5	5	6	7
61	3631	3639	3648	3656	3664	3673	3681	3689	3698	3707	1	2	3	3	4	5	5	6	7
62	3715	3724	3733	3741	3750	3758	3767	3775	3784	3793	1	2	3	3	4	5	5	6	7
63	3802	3811	3819	3828	3837	3845	3854	3862	3871	3880	1	2	3	3	4	5	5	6	7
64	3889	3898	3908	3917	3925	3934	3943	3951	3960	3969	1	2	3	3	4	5	5	6	7
65	4074	4083	4093	4102	4111	4121	4130	4140	4150	4159	1	2	3	3	4	5	5	6	7
66	4168	4178	4188	4198	4207	4217	4227	4236	4246	4255	1	2	3	3	4	5	5	6	7
67	4265	4275	4285	4295	4305	4315	4325	4335	4345	4355	1	2	3	3	4	5	5	6	7
68	4365	4375	4385	4395	4405	4416	4426	4436	4446	4457	1	2	3	3	4	5	5	6	7
69	4457	4477	4487	4499	4508	4519	4529	4539	4550	4559	1	2	3	3	4	5	5	6	7
70	4571	4581	4592	4603	4613	4624	4634	4645	4655	4667	1	2	3	3	4	5	5	6	7
71	4677	4688	4699	4710	4721	4732	4743	4753	4764	4775	1	2	3	3	4	5	5	6	7
72	4785	4797	4808	4819	4831	4842	4853	4864	4875	4887	1	2	3	3	4	5	5	6	7
73	4899	4909	4920	4932	4943	4955	4966	4977	4989	5000	1	2	3	3	4	5	5	6	7
74	5012	5023	5035	5047	5058	5070	5082	5093	5105	5117	1	2	4	4	5	6	7	8	9
75	5129	5140	5152	5164	5176	5189	5200	5212	5224	5236	1	2	4	4	5	6	7	8	10
76	5248	5259	5272	5284	5297	5309	5321	5333	5346	5358	1	2	4	4	5	6	7	8	10
77	5370	5383	5395	5408	5420	5433	5445	5458	5470	5483	1	3	4	5	6	8	9	10	11
78	5495	5509	5521	5534	5545	5559	5572	5585	5598	5610	1	3	4	5	6	8	9	10	12
79	5623	5636	5649	5662	5675	5689	5702	5715	5728	5741	1	3	4	5	7	8	9	10	12
80	5754	5768	5781	5794	5808	5821	5834	5848	5861	5875	1	3	4	5	7	8	9	11	12
81	5889	5902	5916	5929	5943	5957	5970	5984	5998	6012	1	3	4	5	7	8	10	11	12
82	6026	6039	6053	6067	6081	6095	6109	6124	6138	6152	1	3	4	5	7	8	10	11	13
83	6166	6180	6194	6209	6223	6237	6252	6265	6281	6295	1	3	4	6	7	9	10	11	13
84	6310	6324	6339	6353	6368	6383	6397	6412	6427	6442	1	3	4	6	7	9	10	12	13
85	6457	6471	6486	6501	6516	6531	6546	6561	6577	6592	2	3	5	6	8	9	11	12	14
86	6607	6622	6637	6653	6668	6683	6699	6714	6730	6745	2	3	5	6	8	9	11	12	14
87	6761	6776	6792	6808	6823	6839	6855	6871	6887	6902	2	3	5	6	8	9	11	13	14
88	6918	6934	6950	6966	6982	6998	7015	7031	7047	7063	2	3	5	6	8	10	11	13	15
89	7079	7095	7112	7129	7145	7161	7178	7194	7211	7228	2	3	5	7	8	10	12	13	15
90	7244	7261	7278	7295	7311	7328	7345	7362	7379	7396	2	3	5	7	8	10	12	13	15
91	7413	7430	7447	7464	7482	7499	7516	7534	7551	7568	2	3	5	7	9	10	12	14	16
92	7586	7603	7621	7639	7656	7674	7691	7709	7727	7745	2	4	4	7	9	11	12	14	16
93	7762	7780	7798	7816	7834	7852	7870	7889	7907	7925	2	4	5	7	9	11	13	14	16
94	7943	7962	7980	7999	8017	8035	8054	8072	8091	8110	2	4	6	7	9	11	13	15	17
95	8128	8147	8165	8185	8204	8222	8241	8259	8279	8299	2	4	6	8	9	11	13	15	17
96	8318	8337	8356	8375	8395	8414	8433	8453	8472	8492	2	4	6	8	10	12	14	15	17
97	8511	8531	8551	8570	8590	8610	8630	8650	8670	8690	2	4	6	8	10	12	14	16	18
98	8710	8730	8750	8770	8790	8810	8831	8851	8872	8892	2	4	6	8	10	12	14	16	18
99	8913	8933	8954	8974	8995	9016	9036	9057	9078	9099	2	4	6	8	10	12	15	17	19
100	9120	9141	9162	9183	9204	9226	9247	9268	9290	9311	2	4	6	8	11	13	15	17	19
101	9333	9354	9376	9397	9419	9441	9462	9484	9506	9528	2	4	7	9	11	13	15	17	20
102	9550	9572	9594	9616	9638	9661	9683	9705	9727	9750	2	4	7	9	11	13	16	18	20
103	9772	9795	9817	9840	9863	9885	9908	9931	9954	9977	2	5	7	9	11	14	16	18	20
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9

APENDICE A 8

DEFINICION DE LOGARITMO

Logaritmo es el exponente (n) al que hay que elevar la base (A) para obtener un número dado(B).

Generalmente se trabajan logaritmos con base 10.

$$\log A^n = B$$

Ejemplo 1 : $\log 10^3 = 1000$

Donde la base (A) es 10, el número (B) que se quiere expresar u obtener es 1000 y n es igual a 3 o sea el exponente al que se eleva la base, por lo que el logaritmo de 1000 es 3.

Ejemplo 2 :

Si queremos conocer el logaritmo del número 0.001, lo podemos expresar como $\log 10^{-3}$ y es igual a -3.

Ahora es evidente que hay números intermedios que no poseen un logaritmo entero y su logaritmo se calcula como sigue:

Ejemplo 3:

Log de 1987.

a) Contar el número de cifras enteras y restarle 1. Así se obtendrá la característica del Log.

$$4 - 1 = 3$$

- b) Para la mantisa del Log; buscar en la tabla de log el número que corresponda a las dos primeras cifras del número, en la primera columna de la tabla, en este caso buscar 19.
- c) Escoger ahora de las columnas verticales numeradas según lo indica la tercer cifra del número dado, o sea buscamos la columna 8 en el nivel 19 previamente ubicado y la tabla nos indica el valor 2967.
- d) A este valor encontrado le sumaremos la parte proporcional de la columna 7 (cuarta cifra del número dado) o sea el 16 (leído siempre en el mismo nivel 19 que estábamos consultando en los dos pasos anteriores y nos queda :

$$\begin{array}{r} 2967 \\ + \quad 16 \\ \hline 2986 \end{array}$$

e) Por lo que el Log de 1987 es 3. 2986.

Ejemplo 4 :

Log de 0.01987

Para obtener este log de un número , es conveniente expresarlo como potencia de 10 es decir:

$$0.01987 \text{ es } 1.987 \times 10^{-2}$$

a) La característica es el Número de enteros menos 1 o sea: $1 - 1 = 0$

b) Para la mantisa buscamos el número 19 columna 8 y su parte proporcional del número 7 y nos queda 2986.

c) Es decir que el logaritmo es igual a :

$$\begin{array}{r} 0.2986 + \log 10^{-2} \\ 0.2986 + (-2) \end{array} \qquad \begin{array}{r} -2.000 \\ +0.2986 \\ \hline -1.7014 \end{array}$$

Antilogaritmo es el número correspondiente a un logaritmo dado. Para encontrar el antilogaritmo, se busca la mantisa en las tablas, se determina el número al que corresponde y se fija la posición del punto decimal de acuerdo con la característica +1.

Así el antilogaritmo de 1.6747 es 47.29 ó el antilogaritmo de 0.6747 es 4.729.

A continuación se enuncian algunas de las propiedades de los logaritmos:

$$\log A \times \log B = \log A + \log B$$

$$\log A / \log B = \log A - \log B$$

$$\log A^n = n \log A$$

$$\log^n A = \log A / n$$

APENDICE A 9.

CURVA DE TITULACION PARA UN ACIDO DE TIPO HA QUE TIENE UN
pK= 4.0

Cuando $A^- = HA$: es porque un ácido está exactamente semineutralizado.
En estas condiciones:

$$pH = pK + \log \frac{[A^-]}{[HA]} = pK + \log \frac{1}{1} = pK + 0$$

Por lo tanto, en la semineutralización, $pH = pK$.

Cuando la relación $[A^-] / [HA] = 100$ a 1 :

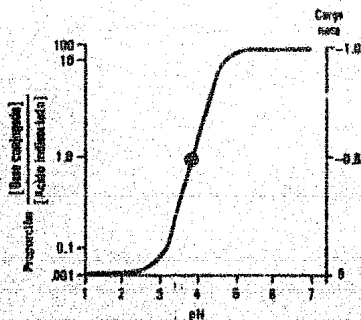
$$pH = pK + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

$$pH = pK + \log 100 / 1 = pK + 2$$

Cuando la relación $HA / A^- = 10$ a 1 :

$$pH = pK + \log 1 / 10 = pK - 1$$

Si esta ecuación es resuelta con varias relaciones de A^- / HA entre los límites 10^3 y 10^{-3} y se grafican los valores calculados del pH , el resultado obtenido describe la curva de titulación para un ácido débil.



A P E N D I C E B

1. COMPONENTES PRINCIPALES (DISTINTOS DE LAS PROTEINAS) DE LA SANGRE DE LOS ANIMALES DOMESTICOS Y DEL HOMERE (mg/ 100 ml de sangre).
2. ELECTROLITOS DE LA SANGRE (sa), SUERO (su), PLASMA (p) DE ALGUNOS ANIMALES DOMESTICOS Y DEL HOMERE EN MILLIEQUIVALENTES.
3. COMPOSICION QUIMICA DE LA LECHE DE ALGUNOS ANIMALES DOMESTICOS Y DE LA MUJER.
4. VALORES NORMALES DE Hb (HEMOGLOBINA).
5. VARIACIONES DE ALGUNOS COMPONENTES ORGANICOS DE LA SANGRE EN ALGUNAS ENFERMEDADES.
6. VALORES NORMALES DE ALGUNOS COMPONENTES BIOQUIMICOS DEL SUERO O DEL PLASMA DE ANIMALES DOMESTICOS.
7. ALGUNAS ENZIMAS MEDIDAS Y SUS PRINCIPALES FUENTES.
8. VARIACIONES EN ALGUNAS ENZIMAS DE ESCAPE EN ALGUNAS ENFERMEDADES.
9. GUIA PARA EL DIAGNOSTICO DE LABORATORIO DE LAS ENFERMEDADES PANCREATICAS EN EL PERRO.
10. NIVELES NORMALES DE ALGUNAS ENZIMAS SERICAS DE ANIMALES DOMESTICOS.
11. VALORES MEDIOS E INTERVALOS DE VALORES DE ALGUNAS ENZIMAS EN SUERO DE SANGRE NORMAL DE ANIMALES DOMESTICOS.
12. GRADOS DE PAPEL FILTRO WHATMAN PARA CROMATOGRAFIA Y SUS USOS.
13. SOLVENTES PARA CROMATOGRAFIA EN PAPEL.
14. SOLVENTES PARA CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA.
15. RESINAS DE INTERCAMBIO IONICO.
16. CENTRIFUGACION.
17. COMPARACION EN LA COMPOSICION QUIMICA DEL CALOSTRO Y LA LECHE MADURA DE VACA: PORCENTAJES Y CANTIDADES POR %g DE PRODUCTO.

APENDICE B 1.

COMPONENTES PRINCIPALES (DISTINTOS DE LAS PROTEINAS) DE LA SANGRE
DE LOS ANIMALES DOMESTICOS Y DEL HOMBRE (mg/100 ml SANGRE)

Especie	Glucosa	Nitrógeno no proteínico	N. de ácido úrico	N. de urea	Crea- tinina	Colesterol libre	Ester
Gato	74	?	?	?	?	30	73
Gallina	170	20-35	4.5	5.7	0.9-1.21	34	66
Perro	77	17-38	0.3	6-27	1-1.7	34	39
Cabra	50	43-65	0.3	13-28	0.9-1.8	?	?
Caballo	73	20-40	1.0	10-20	1.2-1.9	47	30
Hombre	90	20-50	3.2	30	3.9	46	106
Buey	46	20-40	2.5	12.9	1-2.1	37	73
Cerdo	80	20-45	1.0	8-24	1-2.17	?	?
Conejo	85	20-40	2.6	15.9	?	22	22
Oveja	35	20-38	2.5	8-20	1.2-1.9	?	?

APENDICE B 2.

ELECTROLITOS EN LA SANGRE (sa), SUERO (su), PLASMA (p) DE ALGUNOS ANIMALES
DOMESTICOS Y DEL HOMBRE EN MILIEQUIVALENTES

Especie	Calcio	Magnesio	Potasio	Sodio	Cloruro	Fosfato (inorg)	Sustrato
Gato	?	2.2 su	4.3 su	151 su	?	?	?
Gallina	5.6 su	2.3 p	6.0 p	154 p	122 p	122p	?
Perro	5.3 p	1.9 su	4.4 p	150 su	106 p	5.6 su	2.0 p
Cabra	4.5 sa	?	?	?	?	3-11 sa	?
Caballo	6.1 su	2.0 p	3.3 su	149 su	102 p	4.4 su	?
Hombre	5.2 su	1.8 p	4.2 su	138 su	102 su	2.1 su	1.2 p
Buey	5.4 su	2.3 su	4.8 su	142 su	104 su	6.1 su	?
Cerdo	5.6 su	2.2 su	5.9 su	155 su	103 su	7.4 su	?
Conejo	7.0 p	2.0 p	4.1 su	158 su	105 p	5.9 su	?
Oveja	5.7 su	1.9 p	4.8 su	160 p	116 p	6.9 su	?

APENDICE B 3.
COMPOSICION QUIMICA DE LA LECHE DE ALGUNOS ANIMALES DOMESTICOS
Y DE LA MUJER

	Agua	Proteínas	Grasas	Lactosa	Ceniza
Gata	81.6	10.1	6.3	4.4	0.75
Vaca	87.0	3.3	3.7	4.8	0.72
Perra	76.3	9.3	9.5	3.0	1.2
Cabra	87.0	3.3	4.1	4.7	0.77
Yegua	90.1	2.6	1.0	6.9	0.35
Mujer	88.0	1.2	3.8	7.0	0.21
Cerda	82.8	7.1	5.1	3.7	1.1
Coneja	71.3	12.3	13.1	1.9	2.3
Rata	72.5	9.2	12.6	3.3	1.4
Oveja	82.0	5.6	6.4	4.7	0.91

APENDICE B 4. VALORES NORMALES DE Hb

Especie	Hb gr/100ml
Bovinos	8-15
	11
Oveja	8-16
	12
Cabra	8-14
	11
Cerdo	10-16
	13
Ferreo	12-18
	15
Caballo de raza inferior	8-14
	11.5
Caballo de raza superior (de pura sangre)	11-19
	15
Gato	8-15
	12
Pollos (5)	7-13
	10
Mono, Macaca mulata (52)	11.72 ± 3.02
Conejo (5)	8-15
	12
Cobayo (5)	11-17
	14

Continuación

Especie	Hb gr/100ml
Hámster (19)	17.6 ± 1.0
Rata (5)	12-18 15
Ratón (5)	10-20 15
Visón (51)	9.6-15.6 11.9
Chinchilla (71)	11.8-14.6 13.2

APENDICE B 5. VARIACIONES DE VARIOS COMPONENTES ORGANICOS DE LA SANGRE
EN ALGUNAS ENFERMEDADES

Aumentado en	Componentes	Disminuido en
Policitemia (en el hombre) en grandes altitudes, mala circulación	HEMOGLOBINA	Anemias
	TOTAL DE PROTEINAS	Mala nutrición (efecto tardío)
A menudo cuando las globulinas disminuyen (diabetes mellitus)	ALBUMINAS	Mala nutrición y en muchas enfermedades en que hay aumento de globulinas (efecto tardío)
En muchas enfermedades infecciosas; en algunas disfunciones del hígado; cirrosis	GLOBULINAS*	Diabetes mellitus y otras enfermedades (poca resistencia a las infecciones)
Uremia grave (nefrosis, nefritis)	UREA	Mal metabolismo de las proteínas; los valores bajos son muy importantes
Hiperactividad de la hormona diabotogénica, carencia de insulina, en fermedades del páncreas, aumento transitorio después de una comida abundante en hidratos de carbono	GLUCOSA	Hipocalcemia, hiperactividad de la insulina, en algunas enfermedades bacterianas (implicación de las adrenales)
Acetonemia en la lactación; también durante trastornos patológicos metabolismo de los lípidos diabetes	CETONAS	

(Continuación)

En el ejercicio	ACIDO LACTICO	En el reposo
En varias enfermedades del hígado y de los riñones (ictericia, nefritis)	COLESTEROL	-----
Hipotiroidismo	ESTERES DEL COLESTINOL	En diabetes mellitus ictericia y algunas otras afecciones
Ictericia por obstrucción, excesiva destrucción de eritrocitos por parásitos (Babesia), ictericia hemolítica	BILIRRUBINA PREHEPATICA (unida a proteínas)	-----
Intoxicación de células hepáticas, obstrucción de vías biliares o de la vesícula biliar	BILIRRUBINA HEPATICA (la proteína es separada en el hígado)	-----

*Diferentes enfermedades alteran la concentración de diferentes globulinas. Raramente son afectadas por igual todas las globulinas.

APENDICE B 6.
VALORES NORMALES DE ALGUNOS COMPONENTES BIOQUIMICOS DEL SUERO O
DEL PLASMA DE ANIMALES DOMESTICOS

	Glucosa	NUS*	Colesterol	Acido úrico	Bilirrubina		Indice icterico	Proteínas totales	
					Directa	Total		Suero	Plasma
Caballo	60-100	10-20	51-236	mg/100 ml 1.0	0.1-0.9	0.2-6.2	7.5-20.0	6.5	6.8
Vaca	40-60	6-27	50-230	0.05-2.09	0.04-0.44	0.01-0.47	2-15	7.6	8.3
Ferreo	70-100	10-20	125-250	0-1.0	0-0.14	0.1-1.0	2-5	6.2	6.7
Gato	64-84	20-30	75-151	1-1.9	-----	0.1-1.0	2-5	5.9	6.2
Oveja	30-57	8-20	50-100	0.05-1.93	0-0.27	0-0.39	5	5.4	5.7
Cabra	30-60	13-28	80-130	0.3-1.0	-----	0-0.1	2-5	----	6.3
Cerdo	65-95	8-24	-----	0.05-1.95	0-0.10	0-0.18	5	6.3	8.7

*NUS = Nitrogeno ureico sanguíneo

APENDICE B 7.
ALGUNAS ENZIMAS MEDIDAS Y SUS PRINCIPALES FUENTES

ENZIMA	FUENTE PRINCIPAL
Fosfatasa alcalina	Hígado, hueso, riñón, mucosa intestinal
Transaminasa glutámica pirúvica (TGP)	Hígado (perro, gato)
Transaminasa glutámica oxalacética (TGO)	Músculo
Arginasa	Hígado
Ornitín-carbamil-transferasa	Hígado
Lipasa	Páncreas, mucosa intestinal
Amilasa	Páncreas, mucosa intestinal, hígado
Deshidrogenasa glutámica	Hígado (bovino, ovino) riñón (bovino)
Deshidrogenasa del sorbitol	Hígado (equino) riñón
Aldolasa	Músculo
Creatinfosfoquinas	Músculo
Deshidrogenasa isocítrica	Hígado
Deshidrogenasa láctica	Todos los tejidos

APENDICE B 8.

VARIACIONES EN ALGUNAS ENZIMAS DE ESCAPE
EN ALGUNAS ENFERMEDADES

Aumentado en	Enzima	Disminuido en
-----	COLINESTERASA	En casos graves de mala nutrición. En la intoxicación por agentes anti-colinesterásicos (DFP y anhídridos fosfóricos)
Ictericia, cirrosis, nefritis, hipoparatiroidismo	FOSFATASA ALCALINA	-----
Algunas disfunciones hepáticas, infarto de miocardio (en el Hombre)	TRANSAMINASA DE LOS ACIDOS GLUTAMICO Y OXALACETICO	-----
Algunas disfunciones hepáticas, especialmente en ciertas infecciones por virus (hepatitis contagiosa del perro)	TRANSAMINASA DE LOS ACIDOS GLUTAMICO Y PIRUVICO	-----

APENDICE B 9.

GUIA PARA EL DIAGNOSTICO DE LABORATORIO DE LAS ENFERMEDADES

PANCREATICAS DEL PERRO

Enfermedades	Prueba de laboratorio	Valor diagnóstico	Observaciones
Pancreatitis aguda	Prueba de amilasa sérica (Harding) Hiperlipemia	3200 U.H., y más. Hiperlipemia	La amilasa está elevada también en la uremia* Se puede hacer una prueba de NUS para diferenciación. La prueba de lipasa sérica puede dar apoyo adicional. Si un valor normal de amilasa se acompaña de hiperlipemia se evalúa para pancreatitis crónica y diabetes mellitus.
Pancreatitis crónica	Prueba de amilasa sérica Hiperlipemia, absorción de grasa	3200 U.H., y más. Hiperlipemia. Plasma claro en la muestra tomada después de la alimentación	Como la pancreatitis crónica tiene exacerbaciones clínicas, el valor de la amilasa puede estar elevado. Se usa esta prueba si la deficiencia digestiva domina los signos clínicos. La absorción de grasa es insignificante si no hay lipasa pancreática. En algunos perros pancreatectomizados la absorción puede ser normal
Atrofia juvenil	Prueba de absorción de grasa Prueba de absorción de grasa repetida con enzimas pancreáticas	Plasma claro después de la alimentación Plasma turbio después de la alimentación	Si se obtiene un plasma turbio, el diagnóstico no se confirma. Esto demuestra que la terapia substitutiva es probablemente beneficiosa.

Continuación

Enfermedades	Pruebas de laboratorio	Valor diagnóstico	Observaciones
Atrofia juvenil	Flotación de heces	Negativo de anguilotomas	Si hay infección por anguilotomas, se trata la parasitosis y se esperan varias semanas antes de considerar la atrofia juvenil.
Neoplasia	Radiografía	Masa en la región anterior del abdomen	Pueden estar indicadas pruebas de funcionamiento hepático. Se considera la cirugía exploratoria.
	Glucosa sanguínea	60 mg/100 ml, o menos	Adenoma funcional de los islotes. Convulsiones hipoglucémicas.

* En la pancreatitis aguda intensa, el choque puede causar elevación del nitrógeno ureico en la sangre.

APENDICE B 10.
 NIVELES NORMALES DE ALGUNAS ENZIMAS SERICAS DE ANIMALES DOMESTICOS
 (INTERVALOS DE VALORES O VALORES MEDIOS \pm D.N.)

Especies	Fosfatasa alcalina sérica	TGPS	TCOS	Arginasa ^l (28)	Deshidrogenasa isocítrica ^a (26)
Bovinos	4.7-62.4 ^a (40)	16.2 \pm 7.9 ^{ef} (27)	55.8 \pm 13.8 ^{ef} (27)	0.08-1.77 ^j	565-1314 ⁱ
	0.3-114.3 ^a (1)	2.0 \pm 2.6 ^{eg} (27)	25.0 \pm 6.5 ^{eg} (27)	0-0.17 ^k	622-1036 ^k
Oveja	3-166 ^a (1)	0.5 \pm 19.0 ^h (20)	54-128 ^h (20)	0-2.8 ^l	26-528 ^l
	14-427 ^a (38)		62-92 ^h (35)	0-1.09 ^m	106-482 ^m
Cerdo	6.7 ^{bd} (125)	27.3 \pm 7.8 ^h (27)	31.1 \pm 14.1 ^h (27)		
	1.5-1.8 ^{cd} (9125)				
Perro	8 ^a (59)	30 ^h (60)	40 ^h (60)	0-0.28	27-437
		21.0 \pm 10.7 ^e (27)	19.6 \pm 7.5 ^e (27)		
Caballo		8 \pm 5.9 ^a (27)	158 \pm 37.4 ^a (27)	0-4.2	291-1075

^a Unidades King Armstrong; ^b 2 a 9 meses de edad; ^c 16 a 40 meses de edad; ^d U/ml; ^e g de piruvato/ml; ^f bovinos adultos; ^g terneros; ^h unidades Sigma Frankel; ⁱ unidades de arginasa/ml; ^j vacas lactantes; ^k vacas no lactantes; ^l machos; ^m hembras; ⁿ unidades Wolfson Williams-Ashman/ml.

APÉNDICE B 11.
VALORES MEDIOS E INTERVALOS DE VALORES DE ALGUNAS ENZIMAS EN SUERO
DE SANGRE NORMAL DE ANIMALES DOMÉSTICOS.

	TGPS ^a	TGOS ^b	DHL ^c	OCT ^d	Arginasa	FAS ^e
				unidades/ml.		
Caballo	8 ± 6	158 ± 37	150-1000 U.B.B.	500 ^f	0.64	6-22 U.B. ^g
Vaca	16 ± 8	56 ± 14	3500 U.B.B. ^h	0.4-4.1 ⁱ	0.34	11.8 U.K.A. ^j
Perro	21 ± 11	20 ± 7	260 U.B.B.	2.2	0.03	3-6 U.B.
Gato	16	19	-----	-----	-----	0-7 U.B.
Oveja	-----	31	2000 U.B.B.	-----	0.37	14-427 U.K.A.
Cerdo	27 ± 8 ^k	31 ± 14 ^k	-----	-----	-----	-----

- a TGPS Transaminasa glutámica pirúvica del suero, microgramos de piruvato/ml.
b TGOS Transaminasa glutámica oxalacética del suero, microgramos de piruvato/ml.
c DHL Deshidrogenasa láctica.
d OCT Ornitin-carbamil-transferasa.
e FAS Fosfatasa alcalina del suero.
f Unidades Sigma, milimicromoles de NH₃ en 24 horas.
g U.B. Unidades Bodansky
h U.B.B. Unidades Berger-Broida.
i Micromoles de NH₃ por 0.50 ml. de suero en 24 horas.
j U.K.A. Unidades King Armstrong
k Medida ± desviación normal.

APENDICE B 12.
GRADOS DE PAPEL FILTRO WHATMAN PARA CROMATOGRAFIA
Y SUS USOS

Número	Velocidad de flujo	Tipo de papel	Usos
1	Mediano	Peso mediano, liso	Todos tipos de cromatografía excepto la preparatoria.
2	Lento	Peso mediano liso	Como para el 1
3 HR	Rápido	Pesado, manufacturado para cromatografía	Como para el 1. La resolución de las manchas es mejor que con cualquier otro papel.
3 MM	Rápido	Pesado y grueso suave y liso	Para cromatografía preparatoria y electroforesis. Fuerte cuando está mojado.
4	Rápido (casi el doble de la velocidad del 1)	Peso mediano entretrejidas laxamente	Principalmente para separar azúcares y aminoácidos.
17	Mediano	Muy grueso y blando	Para cromatografía preparatoria y electroforesis.
31	Rápido	Muy grueso (lavado con ácido)	Electroforesis
54	Rápido	Lavado con ácido de textura muy dura	Para separación de azúcares, también se usa para impregnación con adsorbentes. Gran fuerza al estar mojado.
540	Mediano	Doblemente lavado en ácido muy	Como para el 54
541	Rápido	duro, ausencia de impurezas metálicas.	
542	Lento		

APENDICE B 13.
SOLVENTES PARA CROMATOGRAFIA EN PAPEL

Separación	Solventes	Comentarios
Aminoácidos	n-Butanol:ácido acético-glacial: agua (120:30:50)	Produce manchas muy compactas.
	Fenol: amoniaco 0.880 (200:1)	
Azúcares	Etil acetato:piridina agua (120:50:40)	Particularmente bueno para separar galactosa y glucosa
	Isopropanol: agua (160:40)	
Acidos orgánicos	n-Butanol:ácido acético-glacial: agua (120:30:50)	Los ácidos son convertidos a sus sales de amonio.
	Etanol:amoniaco 0.92: agua (160:10:30)	
Esteroides	Metanol:éter del petróleo (100 a 120°) (1:1)	Se procesa en cuarto refrigerado de 2 a 5°C (evita la evaporación)
	Bencina: cloroforno (1:1)	
Acidos fenólicos	Isopropanol:amoniaco 0.880: agua (200:10:20)	
Purina y pirimidinas	n-Butanol:ácido acético-glacial: agua (120:30:50)	Separará mezclas de base nucleótida y nucleósida.
	n-Butanol: amoniaco 0.880: agua (172:10:18)	

APENDICE B 14.
SOLVENTES PARA CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA

Separación	Solvente	Comentarios
Aminoácidos	n-Butanol:ácido acético gálico: agua (60:20:20)	Para capas de gel de sílice
	n-Propanol: agua (64:36)	Para capas de gel de sílice buena separación, las manchas pueden ser difusas.
Azúcares	Etil acetato:isopropanol: agua (63:24:12)	Para Kieselguhr mezclado con acetato de sodio (ver notas más abajo)
	n-Propanol:amoníaco: agua (6:2:1)	Los azúcares son amirados en gel de sílice (ninhidrina positiva). Esto no sucede con Kieselguhr.
Lípidos	Eter	Separar ácidos grasos, ceto-ácidos, glicéridos y aldehídos grasos en gel de sílice
	Cloroforno: metanol: agua (65:25:4)	En gel de sílice separará esfingomielinas, cerebrósidos y lecitina de otros fosfolípidos y glucolípidos.
Esteroides	Cloroforno: acetona (3:2)	Se pueda usar el gel de sílice para separar esteroides, generalmente.
	Etanol a 2% en bencina	Separar la testosterona, androsteronas, progesterona y pregnenolona.

Nota: Las placas Kieselguhr amortiguadas con acetato son preparadas mezclando 30 g. de Kieselguhr con 60 ml. de solución 0.02 M acetato de sodio, se extiende en capas y se activa a 100°C durante 30 minutos.

APENDICE B 15.
RESINAS DE INTERCAMBIO IONICO

Nombre	Tipo	Grupo funcional	Tipo de resina	Tamaño de la cuenta
Intercambiadores de aniones:				
Amberlita IRA 400	Base fuerte	$-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	Poliestireno de enlaces transversos.	100 a 200 200 a 400
Amberlita IR 45	Base débil	$-\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_3\text{H}_7)_2$	Poliestireno de enlaces transversos.	100 a 200 200 a 400
De-acidite FF	Base fuerte	$-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	Poliestireno de enlaces transversos.	14 a 52 52 a 100 100 a 200
De-acidite Q	Base débil	$-\text{CH}_2-\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	Poliestireno de enlaces transversos.	14 a 52 52 a 100 100 a 200
De-acidite II	Base débil	Mezclado $-\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3$ y $-\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_3\text{H}_7)_2$	Poliestireno de enlaces transversos.	14 a 52 52 a 100 100 a 200
Dowex 1	Base fuerte	Trimetil benzil amonio	Poliestireno de enlaces transversos.	20 a 50 50 a 100 100 a 200 200 a 400
Dowex 2	Base fuerte	Dimetil etanol benzil amonio	Poliestireno de enlaces transversos.	20 a 50 50 a 100 100 a 200 200 a 400
Intercambiadores de cationes:				
Amberlita IR 120	Acido fuerte	$-\text{SO}_3\text{H}$	Poliestireno de enlaces transversos.	100 a 200 200 a 400 400 a 600

APENDICE B 16
CENTRIFUGACION

Determinación de la fuerza centrífuga relativa, G.

$$G = (1.118) (10^{-5}) (\text{rpm})^2 (r)$$

G = Fuerza gravitacional relativa en múltiplos de g, la constante gravitacional (980 cm/seg²).

r = Distancia radial del rotor desde el eje de rotación.

rpm = Revoluciones por minuto.

APENDICE B 17
COMPARACION EN LA COMPOSICION QUIMICA DEL CALOSTRO Y LA LECHE
MADURA DE VACA:
PORCENTAJES Y CANTIDADES POR Kg DE PRODUCTO

	Calostro	Leche Madura
Agua	73.0%	87.6%
Materia seca	27.0%	12.4%
Caseína	26 g	36 g
Albúmina	15 g	5.5 g
Globulina	151 g	0.5 g
Grasa	35 g	34 g
Azúcares	30 g	46 g
Minerales	14 g	7.5 g

APENDICE C

1. METODO SENCILLO PARA PREPARAR BUFFERS. PREPARACION DE REACTIVOS.

APENDICE C 1.
METODO SENCILLO PARA PREPARAR BUFFERS

Buffers de: Fosfatos
Acetato
Borato
Carbonato

Determinada la molaridad (M) y el pH del buffer, considere lo siguiente:



Tomando en cuenta este principio para preparar cualquiera de los buffers indicados procederá de la siguiente forma:

1. Calcule y mida el volumen o gramos del ácido que corresponden a la molaridad deseada para el buffer.
2. Disuelva en agua hasta completar aproximadamente 3/4 del volumen final.
3. Introduzca el electrodo de pH en la solución (previamente se ha calibrado el potenciómetro)
4. Prenda el potenciómetro y observe la lectura de pH que marca. (Mantenga prendido el potenciómetro).
5. Adicione solución de NaOH 1N por goteo continuo y simultáneamente, mezcle la solución hasta que el pH se acerca al deseado. Cuando esté a punto de obtener el pH, adicione más lentamente la solución de NaOH.
6. Una vez obtenido el pH deseado para el buffer, retire el electrodo, transfiera la solución a un matraz volumétrico y afore al volumen para el cual hizo los cálculos de molaridad.

El buffer está listo para utilizarse.

Ejemplo: Preparar un litro de solución buffer de fosfatos 0.1M, pH7.2.

Cálculos.

Forma ácida ----- NaH_2PO_4 (PM = 120)

1 mol de NaH_2PO_4 = 120 gramos

0.1 mol de NaH_2PO_4 = 12.0 gramos

12.0 gramos de NaH_2PO_4 /litro = 0.1M

Procedimiento

Pesar 12 gramos de NaH_2PO_4 y disolverlos en agua hasta un volumen aproximado de 750 ml.

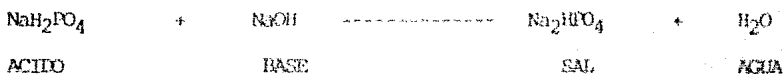
Introducir el electrodo de pH previamente calibrado.

Medir el pH y agregar por goteo una solución de NaOH 1N. Simultáneamente mezclar la solución y observar el cambio de pH. Cuando llegue al pH 7.2, retire el electrodo y afora a 1000 ml. en un matraz volumétrico.

El buffer de fosfatos 0.1M pH 7.2 está listo.

Explicación

Partimos de una solución con 0.1 moles de la forma ácida NaH_2PO_4 , este compuesto irá reaccionando a medida que agregamos NaOH.



Un incremento de NaOH implica más formación de Na_2HPO_4 (base conjugada) y a la vez mayor disminución de NaH_2PO_4 (ácido débil) lo cual implica un aumento de pH.

El momento en que se llega a pH 7.2 equivale a una proporción de NaH_2PO_4 y Na_2HPO_4 de:

$$7.2 = 7.1 + \text{Log} \frac{\text{Na}_2\text{HPO}_4}{\text{NaH}_2\text{PO}_4}$$

$$0.1 = \text{Log} \frac{\text{Na}_2\text{HPO}_4}{\text{NaH}_2\text{PO}_4}$$

$$\text{Antilog. } 0.1 = \frac{1.26}{1.0}$$

Lo cual equivale a:

$\frac{2.26}{1.26}$	-----	0.1M		X	= 0.05575 moles de Na_2HPO_4
---------------------	-------	------	--	---	--

$\frac{2.26}{1.0}$	-----	0.1M		X	= 0.04425 moles de NaH_2PO_4
--------------------	-------	------	--	---	--

$$7.2 = 7.1 + \text{Log} \frac{0.05575 \text{ moles}}{0.04425 \text{ moles}}$$

$$7.2 = 7.1 + 0.1$$

PREPARACION DE REACTIVOS

NaOH 0.1N

FM del NaOH = 40
1 EqO de NaOH = 40 gramos
0.1 EqO de NaOH = 4.0 gramos
4 de NaOH disueltos en 1 litro de solución producen una solución 0.1N.
Los 4 gramos de NaOH los disolvemos en un matraz volumétrico y aforamos con agua destilada a un litro.

Naranja de metilo 0.04 %

0.04 gramos de naranja de metilo, mezclar y aforar a 100 ml. con alcohol.

Ninhidrina 0.05%

0.05 gramos de ninhidrina más 100 ml. de etanol al 95%.

Ninhidrina 0.01%

0.01 gramos de ninhidrina más 100 ml. de etanol al 95%.

Butanol-ácido acético-agua 4:1:1

Si desea preparar un litro considere lo siguiente: 4 partes de butanol más 1 parte de ácido acético más 1 parte de agua igual a seis partes. Las 6 partes deberán sumar finalmente 1000 ml.

Por lo tanto:

$$\begin{array}{r}
 6 \text{ ----- } 1000 \\
 4 \text{ ----- } X \qquad X = 666.6 \text{ ml. de Butanol}
 \end{array}$$

Si,

$$\begin{array}{r}
 4 \text{ ----- } 666.6 \\
 1 \text{ ----- } X \qquad X = 166.6 \text{ ml. de ácido acético}
 \end{array}$$

Sumando

$$\begin{array}{r}
 666.6 \\
 +166.6 \qquad \text{y restando a } 1000 \\
 \hline
 833.2 \qquad \qquad \qquad - 833.2 \\
 \hline
 \qquad \qquad \qquad \text{corresponde a } 166.8 \text{ ml. de agua destilada} \\
 \text{que es la otra parte que se necesita para hacer la mezcla.}
 \end{array}$$

Clorofomo -Metanol 2:1

Si va a preparar un litro:

666 ml. de clorofomo más 334 ml. de metanol.

Acido sulfosalicílico al 10 %

10 gramos de ácido sulfosalicílico disolver y aforar en alcohol metílico al 50%.

Alcohol metílico al 50%

50 ml. de metanol, mezclar y aforar a 100 ml. de agua destilada

Cloruro de sodio 0.9%

Se disuelven 0.9 gramos de cloruro de sodio puro en agua destilada y se afora a 100 ml.

Acido sulfosalicílico 3%

Se disuelven 3 gramos de ácido sulfosalicílico puro en agua destilada y se afora a 100 ml.

Albumina de suero de Bovino o huevo 100 mg/100 ml.

Pesar 100 mg. de albumina de Bovino o huevo; agregar solución de NaOH 0.1N, disolver sin agitar bruscamente para no producir espuma. Aforar a 100 ml.

Reactivo de Biuret

3.0 gr. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
12.0 gr. $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ (tartrato de sodio potasio)
60.0 gr. NaOH
2 litros de agua destilada

Coloque CuSO_4 en un matraz volumétrico de 2 litros y agregue alrededor de 500 ml. de agua destilada. Disuelva el tartrato en un vaso de precipitado con 500 ml. de agua, Agregue el tartrato lentamente al sulfato de cobre y en seguida el NaOH. Mezcle bien y afore a 2 litros. Se conserva en frasco ámbar.

Carbonato de sodio al 0.1%

Pesar 0.1 gramo de carbonato de sodio. Disolver en agua y aforar a 100 ml.

Solución patrón de hemoglobina al 20%

Pesar 20 gramos de hemoglobina. Disolver y aforar a 100 ml.

Solución estándar de caseína de Hammersten (8 mg/ml.)

Pesar 800 mg. de caseína. Disolver en agua destilada y aforar a 100 ml.

NaCl al 1%

Pesar 1 gramo de NaCl. Disolver y aforar con agua destilada a 100 ml.

NaOH al 2%

Pesar 2 gramos de NaOH. Disolver y aforar con agua destilada a 100 ml.

Rojo de metilo 0.04%

0.04 gramos de rojo de metilo. Disolver y aforar a 100 ml. con alcohol.

HCl 0.1 N

PM = 36.5

1 Eq HCl = 36.5 gr.

0.1 Eq HCl = 3.65 gr.

0.1 Eq HCl/litro = 0.1 N

Si la pureza del ácido clorhídrico comercial es de 36% significa que hay 36 gramos de HCl en 100 gramos en la solución concentrada. Como requerimos 3.65 gramos debemos pesar 10.1 gramos de esta solución.

Si en lugar de pesar, medimos un volumen que contenga los 10.1 gramos, tomaremos en cuenta la densidad que es 1.18.

1 ml. de solución concentrada = 1.18 g.

Si requerimos 10.1 gramos debemos medir 0.85 ml. Una vez medido el volumen de 0.85 ml. aforamos a 1 litro con agua destilada (si cambia la pureza y la densidad, haga los calculo siguiendo el mismo plantamiento).

Extracto de Ureasa

Pesar 40 gramos de harina de soya y agregar alcohol al 30% hasta 100 ml. Agitar durante una hora, decantar y/o centrifugar a 4,000 r.p.m., para obtener el sobrenadante que contiene la enzima.

Bicloruro de mercurio 1%

1 gramo $HgCl_2$, disolver y aforar a 100 ml.

Solución de substrato de almidón

Se suspenden 300 mg. de almidón soluble en aproximadamente 10 ml. de solución fría de amortiguador de fosfato con el cloruro de sodio en un matraz volumétrico de 100 ml.; se agita hasta obtener una suspensión homogénea. Se afora con solución hirviendo de amortiguador de fosfato con cloruro de sodio, y se coloca en el baño maría a ebullición por 3'. Se pasa a un matraz de Erlenmeyer de 125 ml., para que sea más fácil el pipeteo, y se deja enfriar el substrato hasta 90°C en agua caliente, manteniéndose esta temperatura durante su uso. Se puede conservar hasta 2 meses en refrigeración y para volver a usarlo, se pasa un volumen adecuado a un tubo de ensaye grande, después mezclar cuidadosamente; se calienta en baño maría a ebullición durante 3'; se deja enfriar a 90°C manteniéndose de nuevo a esta temperatura. durante su uso.

Solución amortiguador de fosfato con cloruro de sodio 0.06M, pH 7.2 0.05M respecto a cloruro de sodio

Se disuelven 2.922 gramos de NaCl puro, 6.135 gramos de fosfato disódico anhidro (Na_2HPO_4) y 2.286 gramos de fosfato monopotásico anhidro puro (KH_2PO_4) en agua destilada en un matraz volumétrico de un litro, y se afora con agua destilada.

Reactivo de yodo

Se vierten 600 ml. de agua destilada en un matraz volumétrico de 1 litro, y se disuelven en ella 18 gramos de yoduro de potasio puro (KI). Una vez disuelta la sal, se añaden 1.8 gramos de yodo puro; se agita de vez en cuando hasta que el yodo éste disuelto por completo, y se afora con agua destilada.

HCl 1.0 N

Medir 8.5 ml. de HCl concentrado y aforar a 1 litro con agua destilada.

Substrato de aceite de oliva

Se disuelven 0.4 gramos de benzoato de sodio en 100 ml. de agua destilada. Se añaden 5.0 gramos de gomo arábigo puro y se agita hasta disolución completa. Se pasa a un homogenizador, se añaden 100 ml. de aceite de oliva puro. Se homogeniza a alta velocidad durante 10 a 15 minutos, hasta obtener una emulsión estable. Se conserva en el refrigerador hasta un mes; si se separa la fracción acuosa antes de este tiempo, puede emplearse todavía el substrato restableciendo la emulsión por agitación.

Amortiguador de fosfato pH 7.0

Se disuelven 5.785 gramos de fosfato disódico (Na_2HPO_4) y 3.532 gramos de fosfato monopotásico (KH_2PO_4) en 500 ml. de agua destilada, se transfiere a un matraz volumétrico de 1 litro, se afora con agua destilada y se mezcla.

Indicador tinolftaleína 1%

Se disuelve 1 gramo de tinolftaleína en alcohol etílico absoluto, aforar a 100 ml.

Ácido tricloroacético al 3%

Se disuelven en agua destilada 3 gramos de ácido tricloroacético puro y se afora en 100 ml. de agua destilada.

Reactivo de o-toluidina

Se disuelven 15 gramos de tiourea pura en 200 ml. de ácido acético glacial, empleando si es necesario muy poco calor. Se pasa a un matraz volumétrico de 1 litro, lavando el vaso con ácido acético glacial. Se añaden 60 ml. de o-toluidina se mezcla, y se afora a un litro con ácido acético glacial se mezcla por inversión. Se conserva en frasco ámbar.

Solución patrón concentrada de glucosa

Se disuelve 1.0 gramo de glucosa anhidra seca en una solución saturada de ácido benzoico y se afora a 100 ml.

Solución diluida de glucosa

Se diluye 1.0 ml. de patrón concentrado hasta 100 ml. con solución saturada de ácido benzoico, debe prepararse cada semana, para reducir al mínimo los cambios debidos a evaporación.

Reactivo de Lieberman-Buchard

40 ml. de anhídrido acético más 2 ml. de ácido sulfúrico. Mezclar.

Solución de colesterol (10 mg/100 ml.)

Pesar 10 mg. de colesterol, disolver y aforar a 100 ml.

Reactivo de cobre

Se pesan 4.919 gramos de trietanolamina $N(CH_2CH_2OH)_3$. Se pasan a un matraz volumétrico de 100 ml., lavando el vaso con agua destilada, y se afora con agua también. Se mezcla. Esta solución es 1M. Se disuelven 6.45 gramos de nitrato cúprico, $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$ en agua destilada, y se afora a 100 ml. Para preparar el reactivo de cobre, se mezclan inmediatamente antes de su uso 9.0 ml. de trietanolamina 1M, 1.0 ml. de ácido acético 1N y 10 ml. de solución de nitrato de cobre.

Patrón concentrado de ácido palmítico

Se pesan con todo cuidado 102.56 mg. de ácido palmítico puro, $CH_3(CH_2)_{14}COOH$, que se disuelven en cloroformo en un matraz volumétrico de 1 litro. Se afora con cloroformo y se mezcla. Esta solución contiene 400 μ eq/l.

Patrón diluido de ácido acético palmítico

Se diluyen 5.0 ml. del patrón concentrado hasta 100 ml. con cloroformo y se mezcla; esta solución contiene 0.06 μ eq en 3.0 ml.

Reactivo de dietilditiocarbamato

Se disuelve 0.1 gramos de dietilditiocarbamato de sodio $(C_2H_5)_2N \cdot CS \cdot SNa \cdot 3H_2O$, en 100 ml. de alcohol butírico secundario grado analítico.